HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	圧縮力は培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する [全文の要約]
Author(s)	宮上, 雄希
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第12147号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/62048
Type	theses (doctoral - abstract of entire text)
Note	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。
Note(URL)	https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
File Information	Yuki_Miyakami_summary.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学位論文題目

圧縮力は培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する

博士の専攻分野名称　　博士（歯学）　　氏名　宮上　雄希

【緒言】歯科矯正力が歯に加わると歯の周囲の歯槽骨に骨リモデリングが生じ、歯が移動する。歯周組織には、線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞などさまざまな細胞が存在しており、これらの矯正力などメカニカルストレスに対する反応が骨のリモデリングを生じる背景となっている。これまでにメカニカルストレスに対する歯周組織の細胞の反応に関する研究が数多く報告されてきた。 我々は破骨細胞に直接圧縮力を加えた際の影響について報告しており、破骨細胞に 24 時間圧縮力を加えると破骨細胞の分化・融合が促進したという結果を得ている。破骨細胞の寿命は短く、培養しても 7 日目以降は細胞死により減少するため、破骨細胞に圧縮力を加えた後、長期的に培養して分化誘導系に与える影響を明らかにした報告はなかった。このような背景から本研究では細胞死の影響を排除し、培養 3 日目に破骨細胞に圧縮力を加えた後、長期的に培養した場合における圧縮力が分化誘導系に与える影響を調査することを目的とした。

【材料と方法】(1) 24 穴プレート上で RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞（RAW 細胞）を培養した。培養を開始した日から 7 日目までの間、24 時間毎に破骨細胞を固定した。破骨細胞を TRAP 染色した後、総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数を計測した。

(2) 培養 3 日目までカバーガラス上で RAW 細胞を培養してから、カバーガラスを反転してあらかじめ別の 24 穴プレートに用意しておいたコラーゲンゲルの上に置いた。この状態で培養したものを対照群とした。その上に 7 枚カバーガラスを重ねた荷重を加えることで圧縮力を加えた。この状態のままで培養したものを圧縮群とした。また、これらとは別に 24 時間圧縮力を加えた後、荷重を除去して培養した。これを解放群とした。対照群、解放群および圧縮群を 24, 48 および 72 時間培養した。その後、細胞を TRAP 染色し、総破骨細胞数、2 から 7 核の小型破骨細胞数および 8 核以上の巨大破骨細胞数を計測した。

(3) 破骨細胞関連遺伝子である nuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1 (NFATc1)、receptor activator of nuclear factor-κB (RANK)、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)、dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP) および osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) について、培養 3 日目から 24、48 時間後における対照群および圧縮群の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で定量した。

【結果】(1) 培養 2 日目には破骨細胞は認められなかった。破骨細胞は 3 日目から 6 日目にかけて増加が認められたが、6 日目から 7 日目の間に減少傾向を示した。また、8 核以上の巨大破骨細胞は培養 4 日目から 6 日目にかけて増加が認められたが、6 日目から 7 日目の間に減少傾向を示した。

(2) 培養 4 日目の時点においては、対照群と比較して圧縮群で総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数が有意に増加した。培養 5 日目の時点において、圧縮群および解放群では、対照群と比較してこれらが有意に増加した。一方、圧縮群、解放群の間には有意差が認められなかった。培養 6 日目の時点において、圧縮群および解放群では、対照群と比較してこれらが有意に減少した。破骨細胞数の推移に着目すると、培養 4 日目から 5 日目の間においては、いずれの群でも総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞

数が増加した。培養 5 日目から 6 日目の間においては、これらは対照群で増加したが、他の群では減少した。

(3) 培養 3 日目から 24 時間後の時点において、mRNA 発現量は対照群と圧縮群の間に有意な差を認めなかった。培養 3 日目から 48 時間後の時点において、いずれの破骨細胞関連遺伝子の mRNA 量も対照群と比較して圧縮群で有意に抑制された。

【考察】本研究では、破骨細胞に圧縮力を加えた後、長期的に培養することに初めて成功した。RANKL が添加された RAW 細胞は培養 3 日目から破骨細胞形成を開始し、6 日目まで増加し、それ以降は減少傾向を示した。これまで我々は RAW 細胞から誘導される破骨細胞は培養 3 日目に現れ、6 日目まで増加し続け、それ以降は細胞死により減少することを報告している。最初の実験結果と過去の報告より、培養 6 日目以降において圧縮力が破骨細胞の分化・融合に与える純粋な影響を判定することが困難であると考えた。また、破骨細胞は培養 3 日目以降に細胞融合を認めるので、培養 3 日目に圧縮力を加えた後、長期的に培養した際の破骨細胞の分化・融合に与える影響を評価することが可能であると判断した。

培養 3 日目から 24 時間圧縮力を加えると、破骨細胞数は対照群より有意に増加した。この結果より 24 時間の圧縮力は破骨細胞の分化・融合を促進することが示唆された。培養 5 日目の時点において、圧縮群および解放群の破骨細胞数は対照群と比較して有意に増加した。一方、圧縮群、解放群の間に有意差は認められなかった。いずれの群でも 4 日目から 5 日目の間に破骨細胞数は同様に増加した。これらの結果から、24 時間以上圧縮力を加えても破骨細胞の分化・融合は促進しない可能性が示唆された。培養 6 日目の時点において、圧縮群および解放群の破骨細胞数は対照群と比較して有意に減少した。また、培養 5 日目から 6 日目の間において、対照群の破骨細胞数は増加したが、他の群では減少した。これらの結果から、圧縮力を加えることは培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する可能性が示唆された。

本研究ではリアルタイム PCR を行い、破骨細胞関連遺伝子の中でも、破骨細胞分化のマスター遺伝子である NFATc1、マーカー遺伝子である TRAP、RANK および融合に必要な遺伝子である DC-STAMP、OC-STAMP について mRNA の発現量の変化を調査した。培養 4 日目におけるこれらの mRNA の発現量を対照群と圧縮群とで比較したが、有意な差が認められなかった。5 日目において圧縮群では対照群と比較して、これらの mRNA の発現が有意に抑制されていた。これらの結果から圧縮力は培養後期において破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することが示唆された。

【結論】圧縮力は破骨細胞の分化・融合を促進するが、培養後期においては破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することによって分化・融合を抑制することが明らかになった。