



Title	Optimal compressive force accelerates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	早川, 貴子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11249号
Issue Date	2014-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/55749
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Takako_Hayakawa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 早 川 貴 子

学 位 論 文 題 名

Optimal compressive force accelerates osteoclastogenesis
in RAW264.7 cells

（至適圧縮力は RAW264.7 細胞において破骨細胞形成を促進する）

【緒言】 歯科矯正治療において歯を移動させる際、歯根膜中や顎骨表面に存在する線維芽細胞、骨芽細胞、破骨細胞などの歯根膜細胞群は圧縮力や牽引力などの機械的刺激を受ける。骨リモデリングにおいて機械的刺激が重要な役割を果たしており、歯根膜細胞群と機械的刺激との関連について、多くの研究報告がある。歯根膜に存在する線維芽細胞や骨芽細胞等に機械的刺激を加えると、PGE₂、IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、RANKL、M-CSF 等の破骨細胞への分化誘導因子である炎症性サイトカインが増加することが明らかとなっている。しかしながら、破骨細胞に対して圧縮力を直接作用させた報告はほとんどない。

本研究では、様々な重さの圧縮力が破骨細胞分化誘導系へ与える影響を検討し、破骨細胞の分化誘導を最も促進させる至適圧縮力を破骨細胞数や mRNA 発現量を計測し検討することを目的とした。

【材料と方法】 (1) RAW264.7 細胞を、RANKL 添加培養液を用いて 24 穴プレートで 5 日間培養し、2～5 日目まで毎日固定した。TRAP 染色にて染色後、核数別破骨細胞数を測定した。

(2) 24 穴プレート底面のシリコンチューブ上に置いたガラス板上にて RAW264.7 細胞を培養した。2 日間培養後シリコンチューブ上でガラス板を反転、静置し、さらに 48 時間培養したものを反転 48 時間培養群、あるいは 3 日間培養後反転、静置し、さらに 24 時間培養したものを反転 24 時間培養群とした。反転させないものを対照群とした。5 日目に全ての細胞を固定後、TRAP 染色し、2 核以上 7 核以下の破骨細胞数、および 8 核以上の巨大破骨細胞数をそれぞれ計測した。

(3) RAW264.7 細胞を、24 穴プレート底面に直接置いたガラス板上にて 72 時間培養した。その後、別な 24 穴プレートに準備したコラーゲンゲルの層上に、ガラス板上で培養した細胞を反転、静置した。この上に荷重として 3、5、7、9、14 枚のガラス板を重ね、24 時間圧縮力を作用させ固定、染色し、破骨細胞数および巨大破骨細胞数を測定した。反転のみのものを対照群とした。

(4) RAW264.7 細胞を、24 穴プレート底面に置いたリン酸カルシウムコートされたガラス板上で RANKL 添加培養液を用いて 72 時間培養した後、別なプレートに準備したコラーゲンゲルの層上に培養した細胞を反転させた。さらに、その上から 7 枚のガラス板を荷重として重ねたものを compressive force (CF) 群として 24 時間圧縮力を作用させ、破骨細胞による吸収窩面積を計測した。反転のみのものを対照群とし、どちらも 5 日目に細胞を固定観察した。

(5) 破骨細胞関連遺伝子である nuclear factor of activated T cell c1 (NFATc1)、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)、chloride channel 7 (ClC7)、cathepsin-K (cath-K)、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、ATPase H⁺ transporting vacuolar proton pump member I (ATP6i)、dendritic cell specific trans membrane protein (DC-STAMP)、osteoclast stimulatory trans membrane protein (OC-STAMP)、integrin- α v、および

integrin- β 3 の 1、3、6、12、24 時間での CF 群と対照群それぞれの mRNA 発現量を、リアルタイム PCR 法で定量した。

【結果】(1) RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を 5 日間培養し、2～5 日目までそれぞれの日数毎の破骨細胞数を計測した。その結果、培養 2 日目には 2 核以上の破骨細胞は認められなかったが、培養 3 日目から 4 日目にかけて徐々に増加し始め、培養 5 日目に細胞数が急激に増加した。核数別の破骨細胞数を計測した結果、2 日目に多核の細胞は認められなかったが、3 日目には 2～4 核のものが現れ始め、4 日目には 5 核以上の細胞が徐々に増加し、5 日目には 10 核以上のものが急激に増加した。

(2) ガラス板を 24、48 時間反転させた群の破骨細胞数と反転させなかった対照群の細胞数を比較した結果、ガラス板の反転による破骨細胞数、および巨大破骨細胞数への有意な差は認められなかった。

(3) コラーゲンゲル上にガラス板を反転させた破骨細胞に、3、5、7、9 および 14 枚に重ねたガラス板で圧縮刺激を適用したものと、ガラス板を反転させたのみの対照群と比較した結果、ガラス板 7 枚時に破骨細胞数は有意に増加し、特に巨大破骨細胞数において有意に増加した。

(4) リン酸カルシウムコートされたガラス板上で破骨細胞の吸収窩の面積を計測すると、対照群と比較して CF 群では有意に増加した。

(5) 破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量は、対照群では全て 24 時間で最大となったのに対し、CF 群は 3 時間であった。

【考察】本実験では、破骨細胞へ直接圧縮力を加えることに成功した。培養日数毎の破骨細胞数を計測したところ、破骨細胞は培養 3 日目から徐々に増加し始め、培養 4 日目から 5 日目に細胞数が急増した。この結果から破骨細胞の分化誘導は 4～5 日目にかけて急速に進行することが示されたため、本実験の圧縮刺激の適用時期を 4～5 日目の 24 時間と設定した。

また、破骨細胞の培養方法を検索するために様々な場所で培養したところ、RAW264.7 細胞はコラーゲンゲル上やゲル中などの軟らかい場所では破骨細胞へ分化できず、硬い面上でのみ分化誘導できる足場依存性を持つことが示されたことから、接着によるシグナルが破骨細胞への分化に重要な役割を果たしていることが示唆された。

コラーゲンゲルの層を介して破骨細胞に圧縮力を適用する方法によって、破骨細胞の分化融合を最も促進させる至適圧縮力を検索した結果、ガラス板 7 枚による圧縮力が細胞数を最も増加させた。さらに骨吸収窩の面積も対照群と比較すると至適圧縮力適用時において有意に増加した。至適圧縮力によって、破骨細胞への分化誘導、特に巨大破骨細胞への融合を促進させることが示唆された。

破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量について計測した結果、全ての遺伝子において対照群では圧縮刺激開始後 24 時間で最大となったのに対し、CF 群では 3 時間で最大となり、発現のピークが早められていることと発現量の有意な増加が示された。このことから、至適圧縮力が破骨細胞の分化融合を早めることが示唆された。

【結論】至適圧縮力によって、破骨細胞数、特に巨大破骨細胞数が増加した。これは、圧縮刺激が破骨細胞関連遺伝子群の発現量を増加し発現時期を早めたことにより、破骨細胞への分化融合を促進した結果であることが示唆された。

従って、従来研究されてきた骨芽細胞や歯根膜細胞群だけではなく、破骨細胞への直接的かつ至適圧縮力は破骨細胞の分化誘導を促進する可能性が示された。