HOKKAIDO UNIVERSITY

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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（歯学）　氏　名　早　川　貴　子

主査　教授　飯 田 順 一 郎
審 査 担 当 者　副査　教授　鈴 木 邦 明
副査　教授　土 門 卓 文

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）

審査は主査、副査全員が一同に会して口頭で行った。はじめに申請者に対して本論文の概要の説明を求めたところ以下の内容について論述した。

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。

検討は以下の方法で行った。

⑴ RAW264.7（RAW）細胞を5日間培養し、2〜5日目までの破骨細胞数を測定した。

⑵ 24穴プレート底面のガラス板上にてRAW細胞を培養した。ガラス板を24時間あるいは48時間反転静置し、5日目に固定、染色後、破骨細胞数を計測した。

⑶ RAW細胞を24穴プレート底面に直接置いたガラス板上で72時間培養後、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た後、破骨細胞数を計測した（CF群）。反転のみのものを対照群とした。

⑷ RAW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72時間培養した後、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枚のガラス板を用いて24時間圧縮力を作用させた後、破骨細胞による吸収窩面積を計測した。

⑸ 破骨細胞関連遺伝子であるNFATc1、TRAP、ClC7、cath-K、MMP-9、ATP6i、DC-STAMP、OC-STAMP、およびintegrin-αv、β3の1、3、6、12、24時間でのmRNA発現量をリアルタイムPCR法で定量した。

結果は以下の通りであった。

⑴ RAW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、2日目に多核の破骨細胞は認められなかったが、3日目には少数核の細胞が現れ始め、4日目には少数核のものが徐々に増加し、5日目には10核以上のものも急激に増加した。

⑵ ガラス板を反転させた群とさせなかった群を比較した結果、破骨細胞数の有意な差を認めなかった。

⑶ 圧縮刺激を適用したものと対照群と比較すると、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。
⑷ 破骨細胞の吸収窩の面積は、対照群と比較して CF 群では有意に増加した。
⑸ 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。

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。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、本実験においては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、RAW 細胞は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。

ガラス板 7 枚による圧縮力が細胞数を最も増加させる至適圧縮力であることが示された。さらに骨吸収窩の面積も至適圧縮力適用時において有意に増加したことから、至適圧縮力は破骨細胞への分化融合を促進させることが示唆された。

対照群と CF 群の mRNA 発現量を比較すると、CF 群の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。

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。

引き続き審査担当者と申請者の間で、以下の内容で質疑応答がなされた。

(1) 実験方法について
(2) 圧縮刺激の妥当性について
(3) 刺激３時間後に観察されるピークの意味するところについて
(4) 今後の研究の展開について

本研究は、矯正力による歯槽骨改造現象の機構の中で、破骨細胞の誘導に対してその前駆細胞が直接矯正力に反応しており、その反応には至適な矯正力の強さがあることを明らかにしている。同時に多核の破骨細胞が誘導されるには、前駆細胞が硬い面に接着することによるシグナルが重要な役割を果たすことを示唆した。この結果は歯科矯正治療における至適矯正力を考える上で重要な情報を提供した事にとどまらず、骨代謝に関する基礎的な分野にも重要な情報を提供した研究成果と高く評価できる。加えて、申請者は質問に対して適切な回答をし、関連分野についても十分な理解と学識を有していることが確認された。本研究の内容は、歯科医学の発展に十分に貢献するものであり、申請者は本研究を基にして今後更にそれを発展させて行く可能性があるものと評価された。よって審査担当者全員は、学位申請者は博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。