



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Release from optimal compressive force suppresses osteoclast differentiation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	池田, 真明
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11695号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58679
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Masaaki_Ikeda_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 池 田 真 明

学 位 論 文 題 名

Release from optimal compressive force suppresses
osteoclast differentiation

(至適圧縮力の解放は破骨細胞の分化を減弱する)

【緒言】 歯科矯正治療において骨のリモデリングは重要な要素である。歯科矯正力により歯根膜には牽引側では伸展力が、また圧迫側では圧縮力が作用され、同時に破骨細胞にも伸展力と圧縮力が加わる。近年、*in vitro* において破骨細胞に機械的刺激を加える方法が多く報告されている。機械的刺激には伸展力、遠心力、静水圧、荷重圧などがあり、それら刺激の違いによって破骨細胞の分化融合は促進、または抑制される。これまでに破骨細胞に伸縮装置(Flexercell tension system)を用い伸展力を加えると分化融合が抑制されるが、その力を解放すると促進されると報告されている。また、至適圧縮力の作用により破骨細胞の分化融合が促進すると報告されているが、圧縮力の解放に関する報告はない。本研究では至適圧縮力の解放が破骨細胞の分化誘導系に与える影響について検討した。

【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 6 日間培養し、2～6 日目まで毎日固定した。TRAP 染色にて染色後、総破骨細胞数(2 核以上)、小型破骨細胞数(2～7 核)および巨大破骨細胞数(8 核以上)を測定した。また核数別破骨細胞数を測定した。

(2)RAW264.7 細胞を RANKL 添加培養液を用いて 24 穴プレート底面に置いたガラス板上で 72 時間培養した。その後、別の 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し静置した。この上に荷重として早川らの報告による至適圧縮力(約 280 mg)を 24 時間作用させた。反転のみの群を対照群とし、圧縮力を加えた群を圧縮群とした。TRAP 染色後、総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数を測定した。

(3)前述の至適圧縮力を作用した後、荷重を除去し、ガラス板を反転することで圧縮力を解放した。圧縮力解放後さらに 24 時間培養し、固定し TRAP 染色した。反転のみの群を対照群とした。染色後、総破骨細胞数、小型破骨細胞数および

巨大破骨細胞数を測定した。

(4)前述の至適圧縮力を解放した後、0、1、3、6、12 および 24 時間後における破骨細胞のマスタースイッチである nuclear factor of activated T cell 1 (NFATc1)、破骨細胞のマーカー遺伝子である tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)、receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK)、骨吸収に関与する matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、cathepsin-K (Cath-K)、chloride channel 7 (ClC7)、ATPase H⁺ transporting vacuolar proton pump member I (ATP6i)、および細胞融合に関わる dendritic cell specific trans membrane protein (DC-STAMP)、osteoclast stimulatory trans membrane protein (OC-STAMP) の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量した。

【結果】(1)RAW264.7 細胞を、RANKL 添加培養液を用いて 24 穴プレートで 6 日間培養し、2～6 日目の日数毎の破骨細胞数を計測した結果、4～5 日目にかけて全ての核数において破骨細胞数は急激に増加した。また 5～6 日目にかけては、2～3 核の破骨細胞数は減少し、4～7 核の破骨細胞数は変化がなく、8 核以上の巨大破骨細胞数は増加した。

(2)破骨細胞の分化融合が最も進行する培養 4 日目に至適圧縮力を 24 時間作用させた圧縮群と作用させない対照群の破骨細胞数を測定すると、総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は全てにおいて、対照群に比べ圧縮群で有意に増加した。

(3)破骨細胞に圧縮力を 24 時間作用させ、その後圧縮力を解放し 24 時間培養した後の総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数を測定した結果、培養 5～6 日目にかけて両群ともに増加するが、対照群では圧縮群以上に有意に増加し、培養 6 日目で比較すると対照群に比べ圧縮群で破骨細胞数の増加は有意に抑制された。

(4)破骨細胞のマスタースイッチである NFATc1 の mRNA 発現量は圧縮力解放 6 時間まで圧縮群で減少した。また破骨細胞の細胞融合に必須の遺伝子である DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量は、圧縮力解放後 3 時間で対照群では増加したが、圧縮群では増加しなかった。破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP、RANK の mRNA 発現量も圧縮力解放後 3 時間で対照群では増加したが、圧縮群では増加しなかった。さらに、骨吸収に関わる遺伝子である MMP-9、Cath-K、ClC7、ATP6i の mRNA 発現量も同様に圧縮力解放後 3 時間で対照群では増加したが、圧縮群では増加しなかった。

【考察】破骨細胞数は培養 4～5 日目にかけて急増し、5～6 日目にかけて減少しないことから、破骨細胞の分化融合は培養 4～5 日目にかけて急速に進行し、その後も融合は進行することが示唆された。また、培養 4 日目に至適圧縮力を加えると、対照群に比べ圧縮群で破骨細胞数が有意に増加したことにより、至適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。一方、至適圧縮力を解放すると、対照群に比べ圧縮群で破骨細胞数の増加は有意に抑制されたことから、圧縮力の解放は細胞の分化融合を減弱することが示唆された。NFATc1 の mRNA 発現量が圧縮力解放 6 時間まで圧縮群で減少し、その他の遺伝子の mRNA 発現量が圧縮力解放後 3 時間で対照群では増加したが、圧縮群では増加しなかったことから、マスタースイッチである NFATc1 の mRNA 発現量が至適圧縮力の解放で抑制されたことにより、その他の遺伝子の mRNA 発現量が抑制され、破骨細胞の分化融合は減弱することが示唆された。

これまで、破骨細胞に伸展力を加えると破骨細胞の分化および融合は抑制されるが、その力を解放すると促進することが報告されており、また、至適圧縮力の作用により破骨細胞の分化および融合が促進すると報告されている。本実験で、至適圧縮力の解放が破骨細胞の分化融合を抑制することが示唆された。このことにより歯科矯正治療における動的治療の後戻りのメカニズムが歯根膜の影響や頬舌的なバクシネーターメカニズムの影響以外に矯正力の解放に対する破骨細胞の増減の機構も関与することが示唆された。

【結論】24 時間至適圧縮力を加えると破骨細胞の分化誘導は促進されるが、至適圧縮力の解放により、破骨細胞関連遺伝子の発現が低下し、破骨細胞の分化および細胞融合が減弱することが示唆された。