



Title	持続的な機械的刺激はRAW264.7細胞における破骨細胞分化を抑制する [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	上村, 光太郎
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12589号
Issue Date	2017-03-23
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65387
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kotaro_Uemura_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 上村 光太郎

学位論文題名

持続的な機械的刺激は RAW264.7 細胞における破骨細胞分化を抑制する

歯科矯正治療において骨のリモデリングは、歯の移動に重要な役割を担っており骨芽細胞と破骨細胞の働きに深く関係している。

破骨細胞は骨の吸収能を持つ多核の巨細胞であり、破骨細胞は骨芽細胞と骨細胞等によりその分化および機能が調節されている。また、骨の恒常性を保つためには外部からの機械的な刺激が重要な役割を持つことが分かっており、これまで骨芽細胞に対して様々な方法で応力を加える実験系が報告がされてきた。芝田ら、千丈らは、いずれも、Flexcell tension system (Flexcell は 6-well の BioFlex plate と台座の間を陰圧にすることでシリコン膜を伸展させ細胞に対し機械的刺激を与える装置である) を用い 30cycle/分、10%の伸展率で周期的な機械的刺激を与えている。しかし、Flexcell を用いて持続的な機械的刺激を直接破骨細胞に与えた報告はない。本実験では、Flexcell を用い、持続的な機械的刺激を直接破骨細胞の分化誘導系に与えることで破骨細胞に及ぼす影響と、そのメカニズムを解明することを目的とした。

まず、単球マクロファージ系の細胞である RAW264.7 細胞が破骨細胞へ分化する経時的变化を観察するため、機械的刺激を与えない状態で通法に従い培養を行った。RANKL を添加した日を 1 日目とし 2-7 日毎の破骨細胞をホルマリンで固定後、TRAP 染色し測定を行った。その結果、4 日目から多核で TRAP 陽性の破骨細胞が観察され、6 日目をピークとし、その後破骨細胞数は減少した。6 日目をピークとし、その後減少するのは、過去の報告からアポトーシスが優勢になったためだと考えられた。よって、以後の実験は培養日程の上限を 6 日目までとした。

次に、破骨細胞に対して持続的な機械的刺激を与える場合、シリコン膜の伸展率が破骨細胞分化誘導系にどのような影響を与えるか観察するため、培養 4 日目から 24 時間、伸展率を 5%、10%、15%とし、0%のものを対照群として、持続的な機械的刺激を与える実験を行った。伸展率によりそれぞれ伸展率 5%群、10%群、15%群とした。結果は、対照群と比べ 5%群では破骨細胞数の有意な差は認められなかった。対照群と比べ 10%群および 15%群は破骨細胞数の有意な減少が認められた。10%群と 15%群との間に破骨細胞数の有意な差は認められなかった。以上の結果から、持続的な機械的刺激を与える場合、10%の伸展率

で十分な効果が得られることが示唆された。よって、以後の実験は伸展率を 10% とし機械的刺激を与えることとした。

次に、持続的な機械的刺激を与えている時間が破骨細胞の分化誘導系にどのような影響を与えているか観察するために、培養 4 日目から、1 日に 1h, 3h, 6h, 12h 刺激を与え、残りの時間は刺激を与えない状態とし、これを 2 日間行い 6 日目に固定した。それぞれを 1h 群, 3h 群, 6h 群, 12h 群とした。破骨細胞数の測定は破骨細胞の核数で分類し、2-7 核は各核数で測定し、残りは 8 核以上のものとした。結果は、対照群と比べ 1h 群, 3h 群では破骨細胞数の有意な差は認められなかったが、6h 群, 12h 群では有意な減少が認められた。また、変化に同様の傾向が認められた 2-4 核および 5 核以上の破骨細胞で分類した場合、対照群と比べ 5 核以上の破骨細胞数に変化は認められなかったが、2-4 核の破骨細胞は経時的な破骨細胞数の減少が認められた。以上の結果から、持続的な機械的刺激による破骨細胞数の減少は 2-4 核の破骨細胞が減少することで、その総数を減少させていることが示唆された。

さらに、過去の実験から、破骨細胞の分化誘導系に深く関係があるとされている一酸化窒素 (NO) と破骨細胞数の減少との関係について観察した。NO は非常に不安定な存在で産生後すぐに NO₂ および NO₃ に変化する。我々は Griess 法を用い NO₂ および NO₃ を測定することで NO の産生量とした。また、機械的刺激は前の実験で使用した 12h 群のものと同様の方法で与えた。結果は、対照群と比べ刺激を与えると NO₂ および NO₃ に有意な産生量の増加が認められた。よって、NO 産生量の増加が、破骨細胞数を減少させている可能性が示唆された。

また、機械的刺激による破骨細胞数の減少に NO が影響を与えているか観察するため、NO 合成酵素阻害剤 (L-NMMA) を添加し実験を行った。L-NMMA を添加した群を添加群、添加しなかった群を非添加群とした。結果は、添加群および非添加群で、機械的刺激を与えないそれぞれの対照群と比べ 5 核以上の破骨細胞数の有意な差は認められなかった。添加群では、対照群と比べ 2-4 核の破骨細胞数は、減少傾向を示したが、統計学的に有意ではなかった。非添加群では、対照群と比べ 2-4 核の破骨細胞数の有意な減少が認められた。以上の結果から、NO 産生を抑制することで機械的刺激下における破骨細胞数の減少が抑制されたことが認められ、機械的刺激が破骨細胞の NO によるシグナル伝達に何らかの影響を与え、破骨細胞数を減少させていることが示唆された。ただし、破骨細胞数の減少は抑制されたが、減少傾向を示すため、減少を引き起こす要因の 1 つであると考えられた。

最後に、持続的な機械的刺激による破骨細胞の mRNA 発現量の変化を観察するため、定量的 real-time-PCR 法を用いて破骨細胞関連遺伝子である NFATc1,

RANK, TRAP, DC-STAMP, OC-STAMP, iNOS, nNOS および GAPDH の mRNA 発現量を測定した。結果は、破骨細胞の融合因子の 1 つである

DC-STAMP に対照群と比べ mRNA 発現量の有意な減少を認めた。よって、破骨細胞の融合が抑制されることで、2-4 核の破骨細胞数が減少していることが示唆された。しかし、NO 合成酵素に関連する iNOS および nNOS を含む、それ以外の関連遺伝子で有意な発現量の変化は認められなかった。芝田らは周期的な機械的刺激により NOS の発現が増強し、NO 濃度が増加し、破骨細胞数が減少したことを報告した。本実験では NOS の発現量には有意な差が無く、NO 濃度に有意な差が認められた。これは、周期的な機械的刺激と持続的な機械的刺激という方法の違いによる可能性が示唆されるが、今後さらなる検討が必要と考えられる。

以上の結果より、Flexcell による持続的な機械的刺激は破骨細胞の融合を抑制する要因の一つであり、その一部に NO が関与していることが示唆された。