HOKKAIDO UNIVERSITY

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_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　上村　光太郎

審査担当者
主査　特任教授　飯田順一郎
副査　特任教授　鈴木　邦明
副査　教授　土門　卓文
副査　准教授　吉村　善隆

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

審査は，審査担当者全員の出席の下，はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ，審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。はじめに申請者から本論文の概要として以下の内容について論述された。

骨の恒常性を保つために機械的刺激が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあるが，破骨細胞の分化誘導系に対し機械的刺激を直接作用させた報告は我々の研究のみである。これまで我々は破骨細胞の前駆細胞であるRAW264.7細胞に、その分化過程で周期的な機械的刺激を加えると，多核の破骨細胞への融合過程が抑制されることを報告してきた。本研究では機械的な刺激方法として，持続的な機械的伸展刺激を加えた場合の破骨細胞分化誘導系に与える影響について検討した。RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を BioFlex plate にて通法に従い培養した。破骨細胞の負荷依存的な影響を観察するために，Flexcell tension system を用いて破骨細胞数の増加が顕著に見られる培養 4 日目から 2 日間，伸展率 5，10，15%で刺激を与えると，10，15%の伸展率で破骨細胞数の有意な減少が認められ 10%の伸展率で十分な効果を得ることが示唆された。また，破骨細胞の時間依存的な影響を観察するため，1，3，6，12h/日，2 日間，伸展率 10%で持続的な機械的刺激を作用させた結果，6，12h において破骨細胞数の有意な減少が認められた。持続的な機械的伸展刺激は，周期的な機械的刺激と同様に破骨細胞分化誘導系の抑制を誘導することが認められた。TRAP 陽性破骨細胞数を 2-4 核，5 核以上で分類し計測した結果，機械的刺激により 2-4 核の破骨細胞数では経時的な減少が認められ，持続的な機械的伸展刺激による破骨細胞総数の減少は 2-4 核の破骨細胞が減少することで引き起こされていることが示唆された。また，実験群と対照群の NO 量を測定した結果，実験群で NO 量の有意な増

加が認められた。すなわち 2-4 核の破骨細胞数の減少には NO が関与している可能性が示唆された。加えて破骨細胞数の減少と NO の関係について検討するため，NO 合成酵素阻害剤（L-NMMA）で処理し，破骨細胞数の変化を観察した。結果は，非添加群，添加群共に 5 核以上の破骨細胞数に変化は認められなかったが，非添加群では，2-4 核の破骨細胞数が有意に減少した。添加群では 2-4 核の破骨細胞数は減少傾向を示すが有意な差は認められなかった。以上の結果より，破骨細胞数の減少に NO が関与することが示唆された。また，定量的 real-time-PCR 法により mRNA の発現量を測定した結果，破骨細胞の融合因子の１つである DC-STAMP の有意な減少が認められ，破骨細胞数の減少は破骨細胞の融合が抑制されることで引き起こされることが示唆された。一方で iNOS，nNOS を含む破骨細胞関連遺伝子には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伸展刺激は破骨細胞の融合を抑制させ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。

引き続き論文内容及び関連事項について，以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

（１）細胞の機械的刺激方法について
（２）２～４核の細胞が機械的刺激で減少する原因について
（３）DC-STAMP，OC-STAMP の作用について
（４）NO 産生の機序について
（５）今後の研究の展開について

本研究は，矯正力が加わった歯根膜において破骨細胞が誘導される現象に関して検討した研究である。これまでの研究では破骨細胞前駆細胞の分化の過程で，細胞に圧縮力が加えられた際には，破骨細胞への分化・誘導が促進されると報告されているが，矯正力によって逆に引っ張られる牽引側歯根膜における機械的刺激が，分化過程の破骨細胞に加わったときの反応については明確ではなかった。本研究において，破骨細胞の前駆細胞である RAW264.7 細胞に対して Flexcell tension system を用いて細胞を引き延ばす刺激を長時間，持続的に加え，破骨細胞の出現様相を検討したところ，刺激が加わると破骨細胞の出現が抑制されること，またその出現には NO の産生が関与していることが明らかにされた。

本研究成果は，最適な矯正力を考える上で重要な情報を得たものであり，歯科医学全体の発展に貢献する重要な基礎的情報を提供した成果であると，高く評価できる。加えて，質疑応答から，申請者は本研究の内容を中心とした専門分野について十分な理解と関連分野の幅広い知識を有していることを認めた。以上から，審査担当者全員は，学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。