HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	間歇的な機械的刺激は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)	加藤, 結香
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第13038号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70426
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuka_Kato_abstract.pdf, 論文内容の要旨



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

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　加　藤　結　香

学　位　論　文　題　名

間歇的な機械的刺激はRAW264.7細胞における破骨細胞分化を抑制する

歯と歯周組織は咀嚼による間歇的な強い力を受け，日常的に骨のリモデリングが引き起こされその恒常性を保っている．矯正力を加えた場合には，組織圧迫側および牽引側では，それぞれ周囲組織に存在する線維芽細胞，骨芽細胞などにメカニカルストレスとして伝達され，歯槽骨にリモデリングが引き起こされる．

破骨細胞は造血幹細胞由来の多核の巨細胞で，骨吸収能を有し，骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしている．破骨細胞はさまざまな骨疾患の標的細胞として注目されており，破骨細胞分化の制御メカニズムの解明は非常に重要であり，これまで，様々な方法で応力を加える実験系が報告がされてきた．Shibataら，Kameyamaらは，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30 cycle/分，10 %の伸展率で周期的な機械的刺激を与え，破骨細胞の増加抑制が認められたことを報告した．その後，上村らは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場合の効果的な伸展率および時間について報告した．本研究では，可撤式矯正装置の間歇的な使用による組織変化を想定し，合計刺激時間を一定とした場合に，間歇的な機械的刺激の間隔差が破骨細胞の分化に対しどのような影響を与えるのか検索した．

初めに，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変化を観察するため，無刺激状態で通法に従い培養を行った．RAW264.7細胞は RANKLの刺激により破骨細胞に分化することが可能である．RANKLを添加した日を1日目とし，2日目から7日目に，それぞれ破骨細胞をホルマリンで固定後，TRAP染色し，TRAP陽性の破骨細胞数の経時的変化を計測した．その結果，3日目から多核でTRAP陽性の破骨細胞が観察され，4日目から5日目に急激に破骨細胞数は増加後，6日目をピークに破骨細胞数は減少した．7日目以降は細胞死により細胞数が減少するため，以後の実験では培養日程は6日目を上限とし，細胞の分化融合の盛んな4日目，5日目に機械的刺激を与えることとした．

次に，破骨細胞に対して間歇的な機械的刺激を与える場合の，刺激付与時間の間隔差による影響と，そのメカニズムを解析した．上村らの結果より，伸展率は 10％とし，合計刺激時間を 24 時間として，それぞれ 12 時間，6 時間，4 時間，3 時間，2 時間，1 時間毎に機械的刺激と無刺激とを繰り返し，間歇的な機械的刺激を与え，破骨細胞への影響を観察した．機械的刺激を与えなかった群を対照群とした．その結果，対照群に比較しすべての実験群において破骨細胞の増加は有意に抑制された．核数別で分類すると，2〜4 核の破骨細胞数の増加抑制が認められた．また，12 時間群と 1 時間群とを比較すると，1 時間群において破骨細胞は有意に増加抑制を認めた．核数別では，1 時間群において 2-4 核の破骨細胞は有意に増加抑制を認めた．以上の結果から，間歇的な機械的刺激による破骨細胞数の増加抑制は 2〜4 核の破骨細胞が分化融合を抑制されることで，その総数を減少させていることが示唆された．

この間歇的な機械的刺激による少数核の破骨細胞の増加抑制の原因因子を探るために，破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP，RANK やマスター遺伝子と言われる NAFTc1 に加え，破骨細胞融合に関連する遺伝子である DC-STAMP，OC-STAMP，CD47 および syncytin-A に注目した．培養 4 日目の 1 回目の持続的刺激（12 時間および 1 時間）除去後，15 分後，30 分後に Trizol を用いて細胞から RNA を回収し，realtimePCR を行った．骨吸収を引き起こすために，破骨細胞の融合は必須の現象であり，細胞融合において最も重要な遺伝子は DC-STAMP である．DC-STAMP は細胞融合の中心的役割を担っており，その他に，CD47，syncytin-A，OC-STAMP などの複数の転写因子も関連し調節されていることが明らかとなってきた．CD47 は単核の前破骨細胞同士，および単核の前破骨細胞と 2〜5 核の少数核の破骨細胞との融合に関与し，中和抗体の添加により少数核の破骨細胞の増加が抑制されたと報告されている．一方で syncytin-A は多数核の破骨細胞同士の融合に関与しており，多核の破骨細胞数の増加および単核の前破骨細胞同士の融合の抑制に関与していると報告されている．また，OC-STAMP は 3 核以上の破骨細胞の融合への関与が報告されている．今回の結果において，12 時間群と 1 時間群との刺激除去後の変化を比較すると，TRAP，RANK，NAFTc1 および syncytin-A では両群においての差は認められず，DC-STAMP，OC-STAMP および CD47 において，1 時間群で mRNA の発現は有意に抑制された．このことから，間歇的な機械的刺激は，単核の前破骨細胞同士および単核の前破骨細胞と 2〜5 核の少数核の破骨細胞との融合に関与している CD47 の発現抑制により，2〜4 核，特に 2 核の破骨細胞数を減少させたことが示唆された．一方，OC-STAMP の発現は抑制されたものの，syncytin-A の発現は抑制されていないため，多数核の破骨細胞同士の融合は抑制されておらず，5 核以上の破骨細胞数の有意な増加抑制が認められないことが示唆された．破骨細胞の融合ではそれぞれの破骨細胞が持つ

核数には様々な組合せが考えられるが，始めに単核同士の融合が生じて 2 核の破骨細胞が生じるため，CD47 の発現抑制は破骨細胞数の増加抑制に大きく関与していることが示唆された．これらのことから，間歇的な機械的刺激は，CD47 の発現抑制に加えて，OC-STAMP，DC-STAMP の抑制を引き起こし，破骨細胞の分化・融合を抑制したことが示唆された．

以上より，破骨細胞もメカニカルストレスを感知し，Flexcell tension system による間歇的な機械的刺激の回数および時間が破骨細胞の分化・融合に影響を与えることが示された．