



Title	RAW細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	柳澤, 瞳子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14526号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81189
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Toko_Yanagisawa_review.pdf, 審査の要旨



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 柳 澤 瞳 子

審 査 担 当 者	主査	教授	飯村	忠浩
	副査	教授	網塚	憲生
	副査	教授	佐藤	嘉晃
	副査	准教授	吉村	善隆

学 位 論 文 題 名

RAW 細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響

審査は、審査担当者全員の出席の下、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試問する形式で行われた。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

歯科矯正治療による歯の移動は、持続的な機械的刺激である圧縮力や牽引力といった、メカニカルストレスに対する歯周組織の反応として捉えることができる。歯周組織には線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などが存在しており、それらに矯正力が加わることにより、圧迫側では骨添加の抑制と骨吸収の促進が、牽引側では骨吸収の抑制と骨添加の促進が起こり、骨のリモデリングが生じる。破骨細胞は多核の巨大細胞で、RANKL が破骨細胞の細胞膜上にある RANK に結合し、細胞内シグナルを活性化し、破骨細胞関連遺伝子の発現を誘導することで骨吸収を生じる。細胞に直接的に機械的刺激を加えることで、RAW264.7 (RAW) 細胞から破骨細胞への分化誘導系に与える影響を調べようとしたところ、RAW 細胞の継代数により破骨細胞の分化・融合に違いが生じた。RAW 細胞の継代数と破骨細胞の分化誘導系の関連を検討した報告は未だないため、本研究で検討した。

継代数が 10 未満である細胞 (N10RAW) と継代数が 30 以上である細胞 (N30RAW) に対して破骨細胞誘導培地を用いて 7 日間培養し、破骨細胞数の推移を観察した。N10RAW 細胞から分化した N10 破骨細胞は 4 日目をピークとして増加し、その後減少した。N30RAW 細胞から分化した N30 破骨細胞は 6 日目をピークとして増加し、その後減少した。分化・融合した破骨細胞の核数別に見ると、N10 破骨細胞では 8 核以上の破骨細胞は 4 日

目を過ぎても増加していたが、それ以外の核数の破骨細胞は減少した。N30 破骨細胞は 8 核以上の破骨細胞も含めて 5 日目以降も増加していた。そのため、N10 破骨細胞と比較して N30 破骨細胞では細胞の分化、細胞同士の融合が遅くなっていることが示唆された。次に、RANKL 無添加の RAW 細胞増殖用培地にて細胞増殖試験を行った結果、N10RAW 細胞と N30RAW 細胞の増殖能に有意差を認めなかった。破骨細胞関連遺伝子である *TRAP*、*RANK*、*CD47*、*NFATc1*、*DC-STAMP*、*OC-STAMP*、*Integrin α V*、*Integrin β III* の発現量の差を調査するために、Real time RT-PCR 法を行った。培養 3 日目では *RANK*、*NFATc1*、*Integrin β III* では有意差を認めなかったが、細胞融合因子である *CD47*、*DC-STAMP*、*OC-STAMP*、*Integrin α V* において、N10 破骨細胞と比較して N30 破骨細胞では有意に減少した。これらの結果から培養 3 日目に N10 破骨細胞と比較して N30 破骨細胞では破骨細胞の細胞融合が抑制されることが示唆された。

株化細胞は継代により特性を変化しないと言われているが、RAW 細胞の継代数の違いによって、同様の実験においても再現性の得られない可能性があることが本研究で示唆された。以上の結果から、破骨細胞への分化が早い N10 破骨細胞と分化が遅い N30 破骨細胞を実験に用いる際には、それぞれの特性を活かした実験を行う必要性が示唆された。

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) RAW 細胞の継代数による破骨細胞の骨吸収活性の変化について
- 2) 継代数の異なる RAW 細胞の大きさや形態の相違について
- 3) 至適圧縮力とは何かについて
- 4) RAW 細胞の継代数と破骨細胞の融合能力の関連について
- 5) 破骨細胞のアポトーシスが実験結果に与える影響について
- 6) RAW 細胞の継代数とテロメアの関係性について
- 7) *Integrin β III* の遺伝子発現量が時間によって N30 破骨細胞で増加していることについて
- 8) Real time RT-PCR 法の *CD47* の結果について
- 9) *OC-STAMP*、*DC-STAMP* の遺伝子発現量が N30 破骨細胞で有意に減少している理由について

以上の質問に対して申請者からは適切かつ明快な回答が得られた。審査担当者との質疑応答を通じて、申請者が本研究ならびに関連分野に対して十分理解し、幅広い知識を有していると考えられ、本研究のさらなる発展、進展が期待された。

以上のことから、審査委員会は全員、本研究が学位論文に十分値し、申請者が博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。