HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	RAW細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響［全文の要約］
Author(s)	柳澤, 瞳子
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/81190
Type	doctoral thesis
File Information	Toko_Yanagisawa_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要約

学　位　論　文　題　目

RAW 細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響

博士の専攻分野の名称　　博士（歯学）　　氏　名　栁　澤　瞳　子

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認められ、牽引側では骨吸収が抑制され、骨添加が促進されて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を活性化することで骨吸収を生じる。造血幹細胞から分化した単球は M-CFS の受容体である c-FMS を発現していて、M-CSF 刺激を受けることにより RANK を発現する。RANKL 刺激を受けると、単核の破骨細胞前駆細胞、前破骨細胞へと分化する。前破骨細胞は、破骨細胞の細胞融合に必要なシグナルである DC-STAMP、OC-STAMP、CD47、シンシチンなどが関与し、多核の破骨細胞が形成される。

これまで、破骨細胞の分化誘導系に対して直接機械的刺激を加え、その動態を調査した研究が報告されており、早川らは培養 4 日目から破骨細胞に 24 時間圧縮力を加えると破骨細胞の分化・融合が促進されたと報告した。また宮上らは、培養３日目に破骨細胞に圧縮力を加えた後長期的に培養した場合、培養後期において、破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することにより、破骨細胞の分化・融合を抑制することを報告した。

早川らや宮上らと同様に、破骨細胞の分化誘導系に直接的に圧縮力を加えて破骨細胞の分化・融合の動態を観察しようとしたところ、RAW264.7（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。これまで、RAW 細胞の継代数が細胞の増殖や機能にあたえる影響についての報告はなされているが、RAW 細胞の継代数

と破骨細胞の分化誘導系の関連をみた報告は未だない。本研究では、継代数が 10 未満の N10RAW 細胞から分化した N10 破骨細胞と継代数 30 以上の N30RAW 細胞から分化した N30 破骨細胞の細胞数を核数別に測定することで、RAW 細胞の継代数が破骨細胞の分化誘導系に与える影響を検討することを目的とした。また、Real time RT-PCR 法を用いて、破骨細胞関連遺伝子の発現に対する RAW 細胞の継代数の影響を検討した。

まず、単球マクロファージ系の細胞である RAW 細胞が破骨細胞へ分化する経時的変化を観察するために、N10RAW 細胞と N30RAW 細胞を破骨細胞誘導培地にて 7 日間培養を行った。N10RAW 細胞から分化した N10 破骨細胞と N30RAW 細胞から分化した N30 破骨細胞はどちらも 2 日目より 2 核以上の破骨細胞が少量観察されるようになり、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。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。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、N10RAW 細胞と N30RAW 細胞の細胞増殖能を調べるために、Cell Counting Kit-8 を用いて RAW 細胞に RANKL 無添加にて細胞増殖試験を行った。N10RAW 細胞と N30RAW 細胞の増殖能力に大きな差は認められなかった。このことから、RAW 細胞の 30 継代までの継代数は RAW 細胞の増殖能に影響を与えないことが示唆された。

本研究では、Real time RT-PCR 法によって N10RAW 細胞と N30RAW 細胞の破骨細胞関連遺伝子である TRAP、RANK、CD47、NFATc1、DC-STAMP、OC-STAMP、Integrinα

Ⅴ、Integrinβ Ⅲ、CD11a、CD11b の発現量の違いを調査した。破骨細胞のマーカー遺伝子であり、破骨細胞のマーカー酵素である TRAP は N30 破骨細胞で有意に減少していた。RANKL の添加により発現した RANK は 3、6 時間で N30 破骨細胞が有意に減少していた。破骨細胞の細胞融合に関連している CD47 は N30 破骨細胞で全ての時間で有意に発現量が減少していた。破骨細胞マスター遺伝子であり、破骨細胞の分化に必須であるといわれている NFATc1 は、今回の結果では 0 時間で N30 破骨細胞が N10 破骨細胞より有意に増加しているが、１時間で有意に減少していることが認められた。このことから、NFATc1 以外のシグナルが関与されていることが示唆された。今回、総破骨細胞数を比較したところ、N10 破骨細胞と比較して N30 破骨細胞の総破骨細胞数の減少を認めた。また、核数別破骨細胞数では N30 破骨細胞の多核化の時期の遅延を認めた。遺伝子発現解析より、破骨細胞の融合に関与している DC-STAMP、OC-STAMP は N30 破骨細胞で有意に発現量が減少しており、N30 破骨細胞では破骨細胞の融合が抑制されていることが示唆される。Integrinα Ⅴ、Integrinβ Ⅲは破骨細胞が細胞外基質である骨に接着するために必要であり、N30 破骨細胞で Integrinα Ⅴの発現量が有意に減少していた。以上の結果から、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。

RAW 細胞は RANKL を添加することによって破骨細胞に分化することが可能である。RAW 細胞から分化させた破骨細胞を用いて実験を行う際には、ある程度の細胞数が必要となり、そのためには細胞を継代して増やす必要がある。その際、実験者が注意しなくてはならないことは、一つの研究室内で、同様の実験を行うにあたり、RAW 細胞の継代数によっては実験結果に差が生じる可能性があることである。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。N10RAW 細胞は破骨細胞の増殖や、分化・融合のピークが早いため、破骨細胞数に関する実験系に用いるのが望ましいと考えらる。また、N30RAW 細胞では破骨細胞の分化・融合のピークが遅れているため、培養初期・中期・後期と分けることができる。そのため、薬物の作用や、長期的な機械的刺激を加えた際の破骨細胞の動態の変化を観察する実験に用いるのが望ましいと考えられる。以上のことから、RAW 細胞の継代数の変化によって破骨細胞の特性が異なるので、各々の特性を活かした実験を行う必要性が示唆された。