

論文の要約

氏名：高橋 康代

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The effect of high-magnitude mechanical strain on bone nodule formation by rat calvarial progenitor cells

（強い機械的伸展力がラットカルバリア細胞の骨様結節形成に与える影響）

歯科矯正治療における歯の移動は、矯正力が歯槽骨に伝達され骨吸収と骨形成による骨リモデリングによって起こるとされ、これまで効率的な歯の移動をもたらす至適矯正力について多くの研究が行われてきた。これまで、過度な矯正力は圧迫側歯根膜の硝子様変性を引き起こし、歯の移動遅滞を起こすと報告されているがその詳細は明らかにされていない。*in vivo*の研究では、歯槽骨に負荷されたメカニカルストレス（MS）が bone morphogenetic protein (BMP)-2 発現を誘導し骨リモデリングを促進する、またそれは骨芽細胞分化に必須の転写因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2) 発現の増加によることが明らかにされている。強力な骨芽細胞分化促進因子である BMPs は骨形成や骨リモデリング調節に重要な役割を担っており、BMP-2はSmad1/Smad5を介してRunx2発現を誘導することが知られている。これまで *in vitro*の研究において、様々な強度のMSを骨芽細胞に負荷し、骨芽細胞分化に与える影響について検討されており、骨芽細胞への弱いMS負荷は骨形成に重要である、BMP-2 や転写因子である Runx2 などの骨形成関連因子の発現を増加させ骨芽細胞分化を促進させることが明らかにされている。一方、強いMS負荷は prostaglandin E₂ (PGE₂) などの炎症促進因子の発現を増大し破骨細胞分化促進による骨吸収を誘導することも明らかにされている。しかし強いMS負荷が骨芽細胞分化や骨形成関連因子に与える影響については明らかにされていない。そこで、本研究は強いMS負荷が骨芽細胞分化に与える影響を明らかにすることを目的とし、第一章では強い周期的伸展力（TF）を rat calvarial cell に負荷し、bone nodule 形成と骨形成関連因子の発現に与える影響について、さらに第二章では強い

TFを加えた rat calvarial cell より産生される PGE₂の骨形成関連因子発現に与える影響について検討を行った。

第一章では Bellows らの方法に従いにより rat calvarial cell を得た。細胞を 6 well Bioflex plate (Corning) に 1.0×10^4 cell/cm² の密度で播種し、 α -minimal essential medium に 15% fetal calf serum (JRH Biosciences) と 1% antibiotic-antimycotic mixture (Gibco) を添加した培養液にて 24 時間培養した。その後アスコルビン酸 (50 μ g/mL)、 β -グリセロフォスフェイト (10 mmol/L) を含む上記培養液に交換し、Flexercell strain unit (Dunn Labortechnik GmbH) にて 18%, 6 cycle/min の TF を 48 時間負荷し、その後静置培養した。試料は対象群 (Control 群)、18%の TF を負荷した群 (TF 群) とした。TF 負荷後 1, 4, 7 日目に細胞を Trizol reagent (Gibco) にて回収し、細胞から全 RNA を抽出後、逆転写酵素により mRNA から cDNA を作成し real-time PCR 法にて骨形成関連因子である BMP-2, Runx2, Msx2 の遺伝子発現について検討した。培養 14 日目に 0.5 M HCl 添加により石灰化物を溶解、回収後、Calcium E-Test kit (Wako) を用いて Ca²⁺量を定量した。培養 21 日目に 4%ホルムアルデヒドにて細胞の固定を行った後、5%硝酸銀液、3%チオ硫酸ナトリウム液を用いて von Kossa 染色を行った。染色後各 well をデジタルカメラ (GX200; Ricoh) にて撮影し、5.7 倍に拡大して最も小さい bone nodule の大きさを基準として 3 群; S サイズ: 直径 180-359 μ m, M サイズ: 直径 360-719 μ m, L サイズ: 直径 720-1620 μ m に分類した。はじめに、calvarial cell における 18% TF 負荷後の bone nodule 数, 大きさ, Ca²⁺量に与える影響を検討した。S サイズ bone nodule 数は Control 群と TF 群で有意差はなかったが、M および L サイズ bone nodule 数は Control 群は 310 個であったが TF 群では 87 個となり、nodule の数は有意に減少した。また Ca²⁺も TF 群では Control 群と比較し有意に減少しており Control 群の 42%となった。次に、18% TF 負荷の骨形成関連因子の遺伝子

発現に与える影響について検討した。TF 群の BMP-2, Runx2, Msx2 発現は TF 負荷後 1, 4 日目において Control 群と比較して有意に減少し, 7 日目においてその差はなくなった。BMP-2 発現は 1 日目で 43%, 4 日目で 51%, Runx2 発現は 1 日目で 39%, 4 日目で 37%, また, Msx2 発現は 1 日目で 50%, 4 日目で 64%であった。以上のことから, 18% TF 負荷は骨形成関連因子の遺伝子発現の低下を介して骨芽細胞の分化を抑制しており, さらに TF 負荷の影響は負荷後 4 日間以上持続されることが示唆された。

第二章では 18%TF により産生される PGE₂ の骨形成や骨形成関連因子に与える影響について検討した。第一章と同様の方法にて細胞採取, 培養を行い, cyclooxygenase-2 選択的阻害剤である NS-398 (10⁻⁶ M; Merck) 添加・非添加の条件で, 第一章と同様の方法にて機械的伸展力負荷を行った。試料は対象群 (Control 群), NS-398 を添加した対象群 (Control+NS 群), 18%の TF を負荷した群 (18% TF 群), NS-398 を添加後 18%の TF を負荷した群 (18% TF+NS 群) とした。18%TF 負荷直後の PGE₂ 産生量を ELISA 法にて検討を行った。さらに第一章と同様の方法にて, 18%TF 負荷後 1 日目に遺伝子を回収し BMP-2, Runx2, Msx2 の遺伝子発現について検討を行い, また培養 21 日目に von Kossa 染色を行い bone nodule の面積について検討を行った。Bone nodule の面積は, 撮影した各 well の画像を ImageJ ソフトウェア (NIH) にて閾値 60 で二値化し, 閾値 0 から 60 の範囲の面積を計測し比較検討した。18% TF 群の PGE₂ 産生量は Control 群と比較し有意に大きく, NS-398 添加により Control 群と同レベルまで減少した (18%TF+NS 群)。また 18% TF 群の bone nodule 面積は Control 群と比較し有意に減少しており, NS-398 添加により Control 群と同レベルまで回復した (18%TF+NS 群)。さらに 18% TF 群の BMP-2, Runx2, Msx2 発現は Control 群と比較し有意に小さく, その発現は NS-398 添加により回復し, Runx2 と Msx2 発現は Control 群と同レベルとなった。以上の結果より, 18% TF 負荷により産生された PGE₂ は骨芽細胞の骨形成関連因子の発現を低下させることで分化を抑制することが示唆された。

以上のことより, 強い MS が骨芽細胞分化を抑制することを明らかにし, それは強い MS により産生される炎症促進因子 PGE₂ が骨形成関連因子である BMP-2, Runx2 および Msx2 の発現を低下させることによることが示唆された。このことより矯正治療時における過度な矯正力負荷は周囲歯槽骨骨形成を抑制する可能性が示唆された。