

## 論文の内容の要旨

氏名：松生 理恵子

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Continuous application of compressive force facilitates the formation of osteoclast-like RAW264.7 cells via upregulation of RANK and downregulation of LGR4

(持続的な圧迫力は RAW264.7 細胞における RANK の発現増加と LGR4 の発現減少を介して破骨細胞様細胞の形成を促進する)

矯正治療では、歯根膜を介して機械的な力が歯槽骨に加わる。圧迫力を受けた歯槽骨では骨吸収が促進し、歯は牽引側から圧迫側へと移動する。骨吸収の主役を担う破骨細胞の形成には、骨芽細胞や活性化 T リンパ球が産生する receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B (RANK) ligand (RANKL) が必須とされる。単核の破骨細胞前駆細胞が発現する RANK に RANKL が結合すると、RANK/RANKL シグナルが細胞内に伝達されて、破骨細胞分化を促進する転写因子である nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1 (NFATc1) が核内に移行し、細胞融合因子の dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast-stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) の発現が促進して、多核を有する破骨細胞が形成される。

これまで、歯科矯正治療を想定して機械的な力を骨芽細胞に加えると、RANKL の発現が促進することが明らかにされている。しかしながら、機械的な力が破骨細胞前駆細胞の破骨細胞への分化に及ぼす影響についての報告はわずかであり、不明な点が多い。そこで、本研究では、破骨細胞前駆細胞としてマウス単球/マクロファージ由来の RAW264.7 細胞に持続的な圧迫力を加え、DC-STAMP, OC-STAMP, RANK, および RANK と相反する機能を有する leucine-rich repeat-containing G-protein-coupled receptor (LGR) 4 の発現、ならびに NFATc1 の核内移行を調べ、歯科矯正治療において歯槽骨に負荷される持続的な圧迫力が、破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化に及ぼす影響を検討した。

本研究では、細胞培養に用いる培地量を増加することによって細胞に持続的な圧迫力を加えた。RAW264.7 細胞を 96 well プレートに播種して 24 時間静置後、一旦培地を取り除き、5 ng の RANKL 添加 (RANKL 存在下) または非添加 (RANKL 非存在下) の培地 100  $\mu$ L を加えた。さらに、RANKL 非添加の培地を 0, 100 および 250  $\mu$ L 加えて、well 底面の細胞に約 0.3, 0.6 および 1.1  $g/cm^2$  の圧迫力を負荷して最長 4 日間培養した。破骨細胞様細胞への分化は、酒石酸耐性酸フォスファターゼ (TRAP) 染色で調べた。DC-STAMP, OC-STAMP, RANK および LGR4 の遺伝子発現は real-time PCR 法で、RAW264.7 細胞内の NFATc1 の局在は蛍光免疫染色で調べた。

核を 3 つ以上有する TRAP 陽性細胞は、RANKL 存在下での培養 3 日目以降に、すべての圧迫力の条件で認められた。培養 3 および 4 日目の TRAP 陽性細胞数を比較した結果、0.3  $g/cm^2$  の圧迫力に比べて 0.6 と 1.1  $g/cm^2$  の圧迫力で、核が 10 個以上の大型および 6 から 9 個の中型の TRAP 陽性細胞が多く認められた。また、RANKL 存在下で培養 1, 2, 3, 4 日後の RANK, DC-STAMP, OC-STAMP の遺伝子発現は、0.3  $g/cm^2$  の圧迫力に比べて 0.6 または 1.1  $g/cm^2$  の圧迫力で増加した。これらの結果から、RANKL 誘導性の破骨細胞分化過程における持続的な圧迫力の負荷は、RANKL の受容体である RANK と細胞融合因子の DC-STAMP と OC-STAMP の遺伝子発現を増加させ、多核を有する破骨細胞への分化を促進すると考えられた。

本研究では、RANKL 添加培地にあらずに RANKL を添加しない培地を加えることで RAW264.7 細胞に負荷される圧迫力を増した。そのため圧迫力の増加に伴って培地中の RANKL 濃度は低下したが、RAW264.7 細胞の RANK の発現は増加し、TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞の形成も促進した。そこで、培地中の RANKL の濃度変化ではなく圧迫力の増加が RANK の発現を誘導したことを確認するために、RANKL 非存在下で RAW264.7 細胞に圧迫力を負荷して 3 および 6 時間後の RANK の遺伝子

発現を調べた。その結果、RANK の発現は、0.3 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力に比べて 0.6 または 1.1 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力で増加した。また、RANK と結合後に破骨細胞分化を抑制する受容体である LGR4 の発現は、0.3 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力に比べて 0.6 と 1.1 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力で減少した。これらの結果から、圧迫力は RANKL の有無にかかわらず破骨細胞前駆細胞の RANKL 受容体の発現に影響すると考えられた。そこで、RANKL 存在下で RAW264.7 細胞に圧迫力を負荷して 3 および 6 時間後の NFATc1 の細胞内の局在を調べた。その結果、核内に NFATc1 を認める細胞の数は、0.3 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力に比べて 0.6 と 1.1 g/cm<sup>2</sup> の圧迫力で増加した。これらの結果から、圧迫力は、RANKL と結合後に破骨細胞分化を促進する RANK の発現増加と、これを抑制する LGR4 の発現減少を誘導することで、破骨細胞前駆細胞の RANK/RANKL シグナルを増強し、破骨細胞形成を促進すると考えられた。

以上、本研究で得られた結果から、持続的な圧迫力の負荷は、RAW264.7 細胞の RANK の発現増加と LGR4 の発現低下を介して NFATc1 の核内移行と細胞融合因子の発現を誘導し、破骨細胞様細胞の形成を促進することが明らかとなった。すなわち、歯科矯正治療において圧迫側の歯槽骨に認められる骨吸収には、RANKL 誘導性の破骨細胞分化の促進が関与すると考えられた。