

論文の内容の要旨

氏名：チャールストンコード 祐

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：周期的伸展力が RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化に与える影響

歯に加わる矯正力はメカニカルストレスとして歯根膜を介して歯槽骨に伝わり、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが変化することで歯の移動が起こる。これまでに、骨芽細胞に 1 g/cm^2 の圧迫力を負荷すると bone morphogenetic protein (BMP) -2 の産生増加を介して骨基質タンパクである bone sialoprotein や osteopontin の発現を誘導して石灰化物形成が促進する一方で、 3 g/cm^2 の圧迫力はこれらを抑制することが明らかにされている。また、シリコンで構成された底面を持つプレートを用いて伸展率 3~9% のメカニカルストレスを負荷すると、骨芽細胞の BMP-2 の発現と osteopontin の遺伝子発現が増加するが、伸展率 18% のメカニカルストレスでは alkaline phosphatase 発現と石灰化物形成が抑制することが明らかにされている。

骨吸収を担う破骨細胞の分化は、receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) ligand (RANKL) と osteoprotegerin によって調節される。すなわち、単核の破骨細胞前駆細胞上に発現する RANK に RANKL が結合すると、破骨細胞前駆細胞の融合に関与する dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) の発現が増加し、多核を有する成熟破骨細胞へと分化する。成熟した破骨細胞は、cathepsin K (CTSK) をはじめとするタンパク分解酵素や H^+ を分泌して骨有機質と無機質を溶解する。これら破骨細胞の分化と骨吸収機能に関連する因子の発現は、nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1) が核内に移行することで増加する一方で、osteoprotegerin は RANK/RANKL 結合を阻害して破骨細胞の分化を抑制する。また、生理活性物質である窒素酸化物や lysophosphatidic acid (LPA) も破骨細胞の分化を促進することが知られている。

メカニカルストレスが破骨細胞分化に及ぼす影響を調べた研究は骨芽細胞に比べて少ないものの、これまでに、伸展率 10~15% のメカニカルストレスを負荷すると、破骨細胞の融合が抑制されることが示されている。しかし、メカニカルストレスの強度の違いが破骨細胞の分化に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では、BioFlex plate 上の破骨細胞前駆細胞に 6% と 18% の異なる 2 つの伸展率によるメカニカルストレスを負荷し、破骨細胞様細胞の形成ならびに破骨細胞分化関連因子の発現を検討した。

破骨細胞前駆細胞としてマウス腹水由来の単球/マクロファージ RAW264.7 細胞を 6-well Bioflex Culture Plate-Collagen Type I に 9.0×10^4 cells/well の密度で播種し、10% ウシ胎児血清 (FBS)、ペニシリン/ストレプトマイシン/アムホテリシン B 含有 1% 抗菌剤混合液および 50 ng/ml RANKL を含む α -minimal essential medium で、 37°C 、5% CO_2 の気相下にて培養した。培養液は培養 2 日毎に交換した。RANKL 存在下で 72 時間培養した BioFlex plate を Flexercell Strain Unit に移し、 37°C 、5% CO_2 の気相下にて plate 底面を吸引し、伸展率 6% および 18% で 6 回/分の周期的伸展力を 48 時間、負荷した。細胞から抽出した total RNA から cDNA を合成し、これを鋳型として、RANK, LPA 受容体 1 (LPA1), NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, CTSK の遺伝子発現を real-time PCR で調べた。また、細胞を溶解して超音波処理後、遠心して回収した上清に含まれるタンパクを 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、Western blotting 法にて CTSK のタンパク発現を調べた。さらに、細胞を TRAP 染色し、核を 3 個以上有する TRAP 陽性細胞を破骨細胞様細胞として well 中の数と面積を計測した。

RANKL 存在下で伸展率 0 (コントロール)、6 および 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷した RAW 細胞における RANK の遺伝子発現は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% で減少した。また、NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP の遺伝子発現は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% で減少した。また、NFATc1 と OC-STAMP の遺伝子発現は、伸展率 6% に比べ 18% で低かった。破骨細胞様細胞の数とその面積は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% で有意に減少し、伸展率 6% に比べ 18% で低かった。これらの結果から、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスは、RANK の発現を低下させることで、破骨細胞分化関連因子の発現を低下させ、破骨細胞の分化を抑制することが示

唆された。

RAW 細胞や骨髄由来細胞を *in vitro* で破骨細胞へと分化誘導する際には、RANKL とともに FBS を培地に添加する必要があることが知られており、本研究でもすべての培養過程で RANKL と FBS を添加した培地を用いた。他方、破骨細胞の分化は、FBS から脂質分画を取り除くと抑制され、LPA の添加で回復することが知られている。また、培地中の RANKL の添加量を減じて LPA を添加すると、OC-STAMP 発現を誘導して破骨細胞の分化が維持されることが明らかにされている。本研究で LPA の受容体である LPA1 の遺伝子発現を調べた結果、コントロールに比べて伸展率 18% で LPA1 の遺伝子発現が減少した。これらの知見と本研究結果から、伸展率 18% のメカニカルストレスを受けた細胞では、RANK だけでなく LPA1 の発現が減少するため、培地に含まれる LPA による OC-STAMP の発現誘導の効果が発揮されず、破骨細胞への分化がさらに抑制される可能性が考えられた。

破骨細胞が産生する骨基質分解酵素である CTSK は、RANKL が RANK に結合後、NFATc1 が核内に移行することで発現が増加することが知られている。本研究では、CTSK の発現はコントロールと比較して、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で発現低下が認められた。本結果から、伸展力によるメカニカルストレスは、破骨細胞の分化のみならず骨吸収機能を低下させることが示唆された。

結論として、伸展率 18% のメカニカルストレスを受けた細胞では、RANK だけでなく LPA1 の発現が減少するため、培地中の LPA による OC-STAMP の発現誘導の効果が発揮されず、破骨細胞への分化がさらに抑制される可能性が考えられた。また、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスは、NFATc1 の発現を低下させることで、破骨細胞分化関連因子ならびに骨基質タンパク分解酵素の発現を低下させ、破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制することが示唆された。