

論文審査の結果の要旨

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

審査委員：（主査） 教授 鈴木直人

（副査） 教授 本吉 満

教授 川戸 貴行

教授 佐藤 秀一

矯正力による歯の移動は、メカニカルストレスが歯根膜を介して歯槽骨に伝わり、骨芽細胞と破骨細胞による骨リモデリングのバランスによって起こる。破骨細胞の分化は、receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) ligand (RANKL) と osteoprotegerin (OPG) によって調節されている。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分解する。これら因子の発現は、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、RANK のデコイである OPG は破骨細胞の分化を抑制する。また、lysophosphatidic acid (LPA) は破骨細胞の分化を促進することが知られている。

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 Culture plate 上の破骨細胞前駆細胞に 6% と 18% の異な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 RAW264.7 細胞を用いた。細胞を 6-well Bioflex Culture Plate-Collagen Type I (Bioflex plate) に播種し、10% ウシ胎児血清と 50 ng/ml RANKL を含む α -MEM で培養した。RANKL 存在下で 72 時間培養した BioFlex plate を Flexercell Strain Unit に移し、plate 底面を吸引し、伸展率 0% (コントロール)、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 RNA を抽出し RANK, LPA 受容体 1 (LPA1), NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP および CTSK の遺伝子発現を real-time PCR で調べた。また、細胞からタンパクを抽出し、Western blotting にて CTSK のタンパク発現を調べた。さらに、細胞を TRAP 染色し、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。

その結果、以下の知見を得た。

1. RANK の発現は、伸展率 6% および 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。一方、LPA1 の発現はコントロールと伸展率 6% のメカニカルストレスの負荷に比べて伸展率 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
2. 細胞融合を促進する NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP の発現は、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
3. TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞の数とその面積は、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
4. 骨基質分解酵素 CTSK の発現は、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。

以上の結果から、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスは、RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化と骨吸収機能を低下させることが明らかになった。また、伸展率 18% のメカニカルストレスは RANK だけでなく LPA1 の発現を減少させるため、破骨細胞様細胞への分化をさらに抑制する可能性が示唆された。

本研究は歯科矯正力を想定した伸展力の違いが、RANKL 誘導性の破骨細胞分化に及ぼす影響を分子生物学的に明らかにしたもので、歯科矯正学領域の研究発展に大きく寄与するものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和 4 年 3 月 1 0 日