

学 位 論 文 題 名

ヒト関節滑膜細胞に対する機械的伸展刺激が 破骨細胞分化に及ぼす影響

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯科矯正臨床において多様な顎関節症状を呈する不正咬合患者が存在しており、中には病態の進行に伴って X 線写真で下顎頭の骨吸収が認められる場合もあり、咬合異常や口腔習癖などによる顎関節に対する過度のメカニカルストレスがその一因として重要視されている。矯正治療中に下顎頭が骨吸収などの退行性器質変化をおこすと、顎位の変化をきたし、その後の治療で対応に苦慮することが多い。従って、このような顎関節の骨吸収メカニズムを明らかにすることは、臨床における治療や病態進行の予防に大きく寄与すると推測される。

顎関節症患者の多くでは、関節滑膜炎を発症していることから、炎症の過程で滑膜細胞から産生される各種ケミカルメディエーター、特にサイトカインなどの生理的活性因子が疼痛発現や関節破壊に影響すると考えられている。しかし、滑膜細胞に対するメカニカルストレスの細胞機能への影響は未だ不明な点が多い。

一方、細胞のメカニカルストレスに対する応答の一つとして、アデノシン三リン酸（ATP）が細胞外へ放出され、細胞表面の ATP 受容体を介して細胞機能を調節していることが知られている。骨においても、ATP により骨芽細胞や破骨細胞内の情報伝達系が活性化され、骨のリモデリングに影響を与えるという報告がある。しかし、これまでにメカニカルストレスによる滑膜細胞からの ATP 放出やその意義に関する報告は少ない。

本研究では、関節の骨吸収メカニズムの一端を明らかにすることを目的として滑膜細胞に対する機械的伸展刺激が破骨細胞分化に与える影響を検討した。

【材料と方法】

ヒト線維芽細胞様関節滑膜細胞をコンフルエンスまで培養後、ATP 分解酵素阻害薬スラミンを最終濃度 200 μ M 添加して Flexcell 社製 FX-3000T™ System を用いて滑膜細胞に機械的伸展刺激を負荷した。伸展刺激は伸展率を一定とし、周

波数 (0.5 Hz あるいは 1.0 Hz) と刺激時間 (24 および 48 時間) を変えて刺激を加えた。一方、対照群には伸展刺激を加えず、培養したものを用いた。刺激後、回収した滑膜細胞培養上清中の放出 ATP 量を東洋インキ社製 ATP 発光キットにて測定し、放出サイトカインを Panomics 社製の TranSignal™ human cytokine antibody array にて検出した。

一方、4 週齢マウスの大腿骨中から採取した骨髓細胞と骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞(E1 細胞)の共存培養系を用いた破骨細胞誘導系では、24 穴プレート上にて E1 細胞をコンフルエンスまで培養し、採取した骨髓細胞を最終濃度 10 nM の活性型ビタミン D と 100 nM のデキサメタゾン含有培養液に懸濁して播種した。さらに培養液には最終濃度 250 および 500 nM ATP あるいは滑膜細胞培養上清を conditioned medium として 1/8 あるいは 1/4 の割合で培養液中に添加して 6 日間培養した後、2 核以上の酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性多核細胞 (TPMC) 数を光学顕微鏡下で計測した。また、骨髓細胞を Sephadex G-10 カラムに浸透させ十分静置後、得られた非付着性骨髓細胞 (破骨細胞前駆細胞を含む) を最終濃度 20 ng/ml のマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) と 30 ng/ml の破骨細胞分化誘導因子 (RANKL) を添加した培養液で懸濁して 24 穴プレートに播種した。さらに最終濃度 250 および 500 nM ATP あるいは滑膜細胞培養上清を conditioned medium として 1/8 あるいは 1/4 の割合で培養液中に添加して 6 日間培養し、TPMC 数を計測した。

【結果と考察】

滑膜細胞に機械的伸展刺激を与えるとその代謝系が変化し、何らかの破骨細胞分化促進因子を産生していると推測し、骨髓細胞と E1 細胞の共存培養系に、滑膜細胞に 1.0 Hz で 48 時間機械的伸展刺激を負荷して培養した培養上清を添加し、破骨細胞誘導能を検討した。その結果、刺激を加えた培養上清を 1/8 添加した場合と比較して 1/4 添加した場合、TPMC 数は増加した。また、培養上清を 1/4 添加した場合、TPMC 数は無刺激で 48 時間培養した上清を添加した対照群と比較して有意に増加した。この結果は、TPMC の誘導に滑膜細胞に対する機械的伸展刺激が影響することを示唆していた。また、共存培養系では刺激を与えた滑膜細胞の培養上清中の因子が骨髓細胞と E1 細胞のいずれに作用しているのかが不明なため、骨髓細胞をカラムに通し、付着性骨髓細胞を取り除いた後の非付着性骨髓細胞を用いて、破骨細胞分化に不可欠とされる M-CSF と RANKL を添加して培養した。その結果、1.0 Hz で 48 時間刺激を与えた滑膜細胞培養上清を添加した場合、1/8 添加した場合と比較して 1/4 添加した場合、TPMC 数は増加した。また、1/4 添加した場合では TPMC 数は無刺激の対照群と比較して有意に増加した。以上の結果から、機械的伸展刺激を与えた滑膜細胞の培養上清中の因子は、破骨細胞前駆細胞

胞に直接作用している可能性を示唆していた。

一方、ストレスに対する応答として細胞外に放出される ATP が、破骨細胞分化・活性化に対しても重要な役割を果たしている可能性が推測された。そこで、機械的伸展刺激による滑膜細胞の ATP 放出量を測定した。その結果、ATP 放出量は 1.0 Hz で刺激した場合、刺激後 24、48 時間とも対照群と比較して有意に増加していた。さらに、0.5 Hz あるいは 1.0 Hz で 48 時間培養した場合、周波数が高くなると ATP 放出量は増加していた。以上の結果から、他の細胞と同様に滑膜細胞も機械的伸展刺激で ATP が放出され、放出量が周波数とともに増加することが明らかになった。また、刺激時間 24 時間と 48 時間を比較して ATP 放出量はわずかに増加するものの有意な差はなく、刺激時間依存性は認められなかった。

機械的伸展刺激による滑膜細胞からの ATP 放出が明らかとなったので、ATP の破骨細胞分化に与える影響を調べるために、培養液中に ATP を添加して骨髓細胞と E1 細胞を共存培養し TPMC 数を計測した。その結果、対照群と比較して TPMC 数は濃度依存的な増加傾向を示し、TPMC の誘導に ATP が促進的に作用することが示唆された。さらに、ATP の作用が骨髓細胞と E1 細胞のどちらに作用しているかを検討するため、破骨細胞前駆細胞を ATP ならびに M-CSF と RANKL 添加培養液で培養し、TPMC 数を計測した。その結果、対照群と比較して TPMC 数は ATP に対して濃度依存的増加傾向を示した。以上の結果は、ATP が破骨細胞前駆細胞に直接作用して分化を促進することを示唆していた。

機械的刺激により滑膜細胞から放出される ATP 以外の因子として骨吸収に重要な役割を果たすとされているサイトカインの培養上清中への放出を検出した。1.0 Hz で刺激した滑膜細胞培養上清で IL-8 および RANTES の放出が時間依存的に増加し、48 時間刺激後の放出量は無刺激で培養した場合と比較して明らかに増加していた。IL-8 や RANTES はサイトカインのうちケモカインに属し、特に IL-8 は白血球走化性のみならず T 細胞の走化活性も有していることが知られている。最近の研究で T 細胞が RANKL を発現するとの報告もあり、これらのサイトカインも関節における破骨細胞の分化に重要な役割を果たしている可能性が推測された。

【結論】

本研究において、関節滑膜細胞は機械的伸展刺激により ATP を細胞外へ放出していることが示された。また、細胞外 ATP は破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞分化を促進させることが示唆された。さらに機械的伸展刺激により滑膜細胞から IL-8 や RANTES の放出が認められ、破骨細胞分化に影響を与える可能性が示唆された。以上の結果から、関節腔においてメカニカルストレスを受けた滑膜細胞が放出する ATP や IL-8、RANTES などのサイトカインが破骨細胞の誘導を促進し、関節の骨吸収に関与する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 飯 田 順一郎
副 査 教 授 鈴 木 邦 明
副 査 教 授 田 村 正 人
副 査 助教授 出 山 義 昭

学 位 論 文 題 名

ヒト関節滑膜細胞に対する機械的伸展刺激が 破骨細胞分化に及ぼす影響

審査は審査委員が一同に会して、口頭試問の形式によって行われた。まず申請者に論文の概要の説明を求めるとともに適宜解説を求め、次いでその内容および関連分野について試問した。

申請者から、まず以下のような説明がなされた。

歯科矯正臨床で顎関節症状を有する患者の中には下顎頭の骨吸収を認める場合があり、過度のメカニカルストレスがその一因とされる。下顎頭が骨吸収等の退行性変化をおこすと、顎位や顔貌の変化によりその後の矯正治療で対応に苦慮することが多く、そのメカニズムを解明することは治療や病態進行の予防に寄与すると推測される。

顎関節症患者では関節滑膜炎を発症しており、炎症で産生されるサイトカイン等の生理的活性因子が症状の発現や増悪に影響すると考えられている。しかし、滑膜細胞に対するメカニカルストレスの細胞機能への影響は未だ不明な点が多い。一方、ストレス負荷時の細胞の応答の一つとして、細胞外へ放出されるアデノシン三リン酸(ATP)が細胞機能を調節するとされている。

本研究では、関節の骨吸収メカニズムの一端を解明するために滑膜細胞に対する機械的伸展刺激が破骨細胞分化に与える影響を検討した。

関節滑膜細胞を周波数(0.5 Hz, 1.0 Hz)と刺激時間(24, 48 時間)を変えて伸展刺激を加え、滑膜細胞培養上清中の放出 ATP 量の測定および放出サイトカインの検出を行った。一方、4週齢マウスから採取した骨髄細胞と骨芽細胞様 MC3T3-E1 細胞(E1 細胞)の共存培養系に、最終濃度 250 および 500 nM ATP あるいは conditioned medium として 1/8 および 1/4 の割合で滑膜細胞培養上清を培養液中に添加して6日間培養し、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性多核細胞 (TPMC) 数を計測した。また、骨髄細胞を Sephadex G-10 カラムに浸透させて得られた非付着性骨髄細胞(破骨細胞前駆細胞を含む)を共存培養系の場合と同様に ATP あるいは滑膜細胞培養上清を培養液中に添加して培養し、TPMC 数を計測した。

滑膜細胞に伸展刺激を与えると何らかの破骨細胞分化促進因子を放出すると推測し、骨髓細胞と E1 細胞の共存培養系に滑膜細胞培養上清を添加して培養したところ、培養上清添加量依存的に TPMC 数は増加した。また、1/4 添加した場合の TPMC 数は無刺激で培養した上清を添加した対照群と比較して有意に増加し、TPMC の誘導に伸展刺激が影響することを示唆していた。しかし、刺激による放出因子が骨髓細胞と E1 細胞のいずれに作用しているか不明なため、滑膜細胞培養上清を添加した培養液で非付着性骨髓細胞を培養したところ共存培養系と同様の結果を得た。このことは放出因子が破骨細胞前駆細胞に作用する可能性を示唆していた。

次に伸展刺激により細胞外へ放出される ATP が破骨細胞分化に対しても作用する可能性を推測し、伸展刺激による滑膜細胞の ATP 放出量を測定したところ、それぞれの刺激時間で無刺激の場合と比較して有意に増加し、また刺激の周波数とともに有意に増加していた。

伸展刺激による ATP 放出が明らかになったので、ATP の破骨細胞分化に与える影響を調べるために、骨髓細胞と E1 細胞の共存培養系に ATP を各濃度で添加し培養したところ、TPMC 数は ATP の濃度依存的増加傾向を示し、ATP の分化に対する促進作用が示唆された。さらに非付着性骨髓細胞を ATP 添加培養液で培養すると同様の傾向を示し、ATP が破骨細胞前駆細胞に作用して分化を促進する可能性が示唆された。

ATP 以外の因子として、機械的刺激により放出されるサイトカイン検出したところ、ケモカインに属する IL-8 および RANTES の放出が時間依存的に増加した。IL-8 は白血球走化性のみならず T 細胞走化性も有するとされ、最近 T 細胞が破骨細胞分化促進因子である RANKL を発現するとの報告もあるため、今回検出したサイトカインが顎関節における破骨細胞分化に重要な役割を果たす可能性が推測された。

以上の結果から、メカニカルストレスを受けた滑膜細胞が放出する ATP や IL-8、RANTES などのサイトカインは破骨細胞分化を促進し、下顎頭の骨吸収に関与する可能性が示唆された。

以上の論述に引き続き以下の項目を中心に口頭試問を行った。

1. 滑膜細胞、使用した細胞の特徴
2. ATP 放出の機序
3. 得られた結果の重要性
4. 今後の研究の方向性

これらの試問に対して申請者は明快な回答、説明を行った。

本研究は歯科領域における病態として不明な点の多い変形性顎関節症の、発生機序の一端を薬理学的に検討したものであり、関節滑膜細胞に対する機械的刺激から生じ骨吸収にいたる一連の反応を明らかにした。中でもそこに出現する ATP が破骨細胞前駆細胞に作用して破骨細胞分化を促進すること、また滑膜細胞が機械的刺激により IL-8、RANTES を発現することを明らかにしたことは、新たな重要な情報を提供したものと高く評価できる。更に、試問の内容から、学位申請者は、関連分野にも幅広い学識を有していると認められたと同時に、今後も更に詳細な解析の準備を進めており、将来性についても評価された。

よって審査担当者全員は、申請者は博士(歯学)の学位を授与される資格を有するものと認めた。