

学位論文題名

Mechanical stress directly suppresses osteoclast
differentiation in RAW264.7 cells

(メカニカルストレスは直接的に RAW264.7細胞の
破骨細胞分化を抑制する)

学位論文内容の要旨

【緒言】

骨量の維持あるいは増進のためには適度な運動が必要であるという報告があるが、力学的負荷(メカニカルストレス)による骨組織への直接的な影響については未だ明らかではない。特に、破骨細胞との関連においては、骨芽細胞や歯根膜細胞との共培養下でメカニカルストレスを作用した場合に、破骨細胞への分化誘導能を低下させる報告はあるが、*in vitro*での RANKL 刺激下における単球系細胞を用いた破骨細胞分化誘導系において、メカニカルストレスを直接作用させた報告はない。今回、我々はマウス由来の破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞を用いて、RANKL 刺激による破骨細胞分化誘導系において、直接的にメカニカルストレスを与えた場合の影響について検索した。

【材料と方法】

各種濃度の RANKL を添加し、RAW264.7 細胞を 48 穴プレートにて培養を行った。培養 6 日後、10% 中性ホルマリンで細胞を固定し、TRAP 染色後、TRAP 陽性多核(2 核以上)の細胞を破骨細胞とし、その細胞数を求めた。また RANKL 濃度を 100ng/ml とし、培養 7 日間の破骨細胞数の経時的変化を測定した。さらに象牙質切片上で培養を行い、形成された吸収窩を走査型電子顕微鏡にて観察した。

次に、RAW 細胞を RANKL(100ng/ml)処理の下、培養 5-6 日の 48 時間 Flexercell Tension System に従いメカニカルストレスを与えた。メカニカルストレスを与えないものをコントロールとした。培養液の交換は 2 日毎に行い、同時に同濃度の RANKL を添加した。培養 6 日に細胞を固定し TRAP 染色後、TRAP 陽性多核細胞数を測定した。さらに同細胞中の核数を測定し、破骨細胞数と核数との関係について検索した。

また、培養 3-4 日および培養 5-6 日の 48 時間、培養 3-6 日の 96 時間、それぞれ連続的にメカニカルストレスを与えて培養を行い、破骨細胞数の経時的変化について検討した。さらにコントロール群と培養 5-6 日にメカニカルストレスを与えた群で、培養 6 日に RNA を回収し、RT-PCR 法にて各種遺伝子の発現状況との関連性について検索した。

【結果】

・RANKL と破骨細胞分化との関係

破骨細胞数は 50ng/ml の RANKL 濃度で急激に増加し、RANKL の濃度依存的に増加した。7 日間の培養においては、4 日以降、破骨細胞数は時間依存的に増加し、6 日にピークに達した後減少した。RANKL により分化し

た細胞は、象牙質切片上に多くの吸収窩を形成し、培養した細胞が硬組織吸収能を有する破骨細胞であることが証明された。

・メカニカルストレスによる破骨細胞分化の抑制

メカニカルストレスを与えることにより、コントロール群に比べて破骨細胞数はおよそ半分以下に減少した。核数を比較するとコントロール群で40核以上を有する細胞が存在するのに対して、メカニカルストレス群では細胞数と相関し、明らかな核数の減少が認められた。また核数と同様に、8核以上を有する巨大破骨細胞数が減少し、細胞サイズの縮小が認められた。

・メカニカルストレスを与えた場合の破骨細胞分化における経時的変化

培養3-4日にメカニカルストレスを与えた群(MS3-4群)では、培養6日までは常にコントロール群に比べて破骨細胞数は半分以下であったが、コントロール群は7日で破骨細胞数が減少するのに対して、逆に急激な増加を示した。またMS5-6群およびMS3-6群においても、MS3-4群と同様の傾向が見られた。48時間メカニカルストレスを与えたMS3-4群とMS5-6群と比較し、96時間メカニカルストレスを与えたMS3-6群は、培養期間を通して破骨細胞数は明らかに減少していた。

・破骨細胞分化に関連する遺伝子の発現

メカニカルストレス群では、破骨細胞数の減少に伴い破骨細胞特異的遺伝子であるTRAP、matrix metalloproteinase-9(MMP-9)、cathepsin-K(Cath-K)、calcitonin receptor(CTR)のmRNAの発現が減少する一方、破骨細胞分化抑制に関係するinducible nitric oxide synthase(iNOS)の発現は増加した。しかし、破骨細胞分化誘導において必須転写因子であるnuclear factor of activated T cell cytoplasmic 1(NFATc1)を含むNFATファミリー(NFATc2、NFATc3)においては、メカニカルストレス群で、破骨細胞数が減少しているにもかかわらず、その発現は増加した。RANK、*c-fms* および $INF-\beta$ ではメカニカルストレスによる明らかな影響は認められなかった。

【考察】

今回の実験では、RANKLを添加したRAW細胞を用いた破骨細胞分化誘導系においてメカニカルストレスを与えることにより、破骨細胞分化が抑制されることが示された。さらに、メカニカルストレスを与えることで、形成される破骨細胞の核数の減少および巨大破骨細胞数の減少が認められたことより、破骨細胞成熟過程において、RAW細胞から破骨細胞への分化だけでなく、単核破骨細胞から多核破骨細胞への融合も抑制していることが示唆された。

経時的変化においては、メカニカルストレスを与えた時期および期間により、破骨細胞分化の抑制効果が異なっていた。特に48時間メカニカルストレスを与えた群より、96時間与えた群で破骨細胞分化の抑制効果が大きいことが示された。しかし、いずれのメカニカルストレス群においても、刺激を解除した後も培養を継続すると、破骨細胞数がコントロール群のピーク時の破骨細胞数まで回復することから、メカニカルストレスが破骨細胞分化を完全に抑制するというより、むしろ遅延させている可能性が示唆された。

破骨細胞分化関連遺伝子の発現状況を検索したところ、破骨細胞分化時に発現する特異的遺伝子であるTRAP、MMP-9、Cath-K、CTRのmRNAの発現が減少し、破骨細胞分化を抑制するとされるiNOSの発現は増加していたことから、メカニカルストレスによる破骨細胞数の減少と相関性を示した。しかし、破骨細胞分化に必須とされるNFATc1は、メカニカルストレス群で増加し、またNFATc1の発現を誘導するNFATc2の発現もメカニカルストレス群で増加していた。さらに、NFATc1の上流に位置するNF- κ Bからのシグナルによるネガティブフィードバック作用および、iNOSの誘導発現により、破骨細胞分化抑制に働くと考えられる $INF-\beta$ においては、メカニカ

ルストレスの影響が認められなかったことから、メカニカルストレスは NFAT ファミリーを含む NFATc1 より下流のシグナル伝達を制御することで、破骨細胞分化を抑制していることが示唆された。

以上のことより、破骨細胞分化誘導系において細胞への直接的なメカニカルストレスの影響は、破骨細胞分化を完全に阻害するのではなく、NFATc1 下流のシグナル伝達を抑制することで、破骨細胞分化を抑制および遅延させ、さらに破骨細胞分化後の成熟過程において破骨細胞同士の融合も抑制する可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査 教授 北川 善政
副査 教授 鈴木 邦明
副査 教授 田村 正人

学位論文題名

Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells

(メカニカルストレスは直接的に RAW264.7細胞の
破骨細胞分化を抑制する)

審査は、審査委員全員の出席の下に口頭試問の形式により行われた。申請者に対して提出論文とそれに関連した学科目について試問を行った。審査論文の概要は以下の通りである。

骨量の維持・増進のために適度な運動が必要であるという報告があるが、力学的負荷（メカニカルストレス）による骨組織への直接的な影響については未だ明らかではない。本研究はマウス由来の破骨細胞前駆細胞 RAW264.7 細胞を用いて、RANKL 刺激による破骨細胞分化誘導系において、直接的なメカニカルストレスの影響について検索したものである。

各種濃度の RANKL を添加し、RAW 細胞の培養を行った。培養 6 日後、10%中性ホルマリンで細胞を固定し、TRAP 陽性多核細胞を破骨細胞とし、その細胞数を求めた。また RANKL 濃度を 100ng/ml とし、培養 7 日間の破骨細胞数の経時的变化を測定した。破骨細胞数は 50ng/ml の RANKL 濃度で急激に増加し、RANKL の濃度依存的に増加した。7 日間の培養においては、4 日以降、破骨細胞数は時間依存的に増加し、6 日にピークに達した後減少した。RANKL により分化した細胞は象牙質切片上に多くの吸収窩を形成し、硬組織吸収能を有する破骨細胞であることが確認された。

次に、RAW 細胞を RANKL 処理の下、培養 5-6 日の 48 時間 Flexercell Tension System に従いメカニカルストレス（MS）を与えた。メカニカルストレスを与えないものをコントロールとした。2 日毎に培養液交換と同濃度の RANKL を添加した。培養 6 日に細胞を固定し TRAP 陽性多核細胞数を測定した。さらに同細胞中の核数を測定し、破骨細胞数と核数との関係について検索した。MS 群ではコントロール群に比べて破骨細胞数はおよそ半分以下に減少した。核数を比較すると MS 群では細胞数と相関し、明らかな核数の減少が認められた。また 8 核以上の巨大破骨細胞数が減少し、細胞サイズの縮小が認められた。

培養 3-4 日（MS3-4 群）および培養 5-6 日（MS5-6 群）の 48 時間、培養 3-6 日（MS3-6 群）の

96 時間、それぞれ連続的にメカニカルストレスを与えて培養し、破骨細胞数の経時的变化について検討した。MS3-4 群では、培養 6 日まではコントロール群に比べて破骨細胞数は半分以下であったが、コントロール群が 7 日で破骨細胞数が減少するのに対して、逆に急激な増加を示した。また MS5-6 群および MS3-6 群においても、同様の傾向が見られた。48 時間メカニカルストレスを与えた MS3-4 群と MS5-6 群と比較し、96 時間メカニカルストレスを与えた MS3-6 群は、培養期間を通して破骨細胞数は明らかに減少していた。

さらにコントロール群と MS5-6 群で、培養 6 日に RNA を回収し、RT-PCR 法にて関連遺伝子の発現状況について検索した。MS 群では、破骨細胞数の減少に伴い破骨細胞特異的遺伝子である TRAP、MMP-9、Cath-K、CTR の mRNA の発現が減少する一方、破骨細胞分化抑制に関係する iNOS の発現は増加した。しかし、破骨細胞分化誘導において必須転写因子である NFATc1 を含む NFAT ファミリー (NFATc2、NFATc3) においては、MS 群で、破骨細胞数が減少しているにもかかわらず、その発現は増加した。RANK、*c-fms* および INF- β ではメカニカルストレスによる明らかな影響は認められなかった。

今回の実験では、RAW 細胞 (+RANKL) を用いた破骨細胞分化誘導系においてメカニカルストレスは破骨細胞分化を抑制することが示された。さらに、MS 群では破骨細胞の核数および巨大破骨細胞数の減少が認められたことから、破骨細胞成熟過程において、RAW 細胞から破骨細胞への分化だけでなく、破骨細胞の融合も抑制していることが示唆された。

経時的变化においては、メカニカルストレスを与えた時期・期間により、破骨細胞分化の抑制効果が異なっていた。しかし、いずれの MS 群においても、刺激を解除した後も培養を継続すると、破骨細胞数がコントロール群のピーク時の破骨細胞数まで回復することから、メカニカルストレスが破骨細胞分化を完全に抑制するというより、むしろ遅延させている可能性が示唆された。

破骨細胞分化関連遺伝子の発現状況を検索したところ、TRAP、MMP-9、Cath-K、CTR の mRNA の発現が減少し、iNOS の発現は増加していたことから、メカニカルストレスによる破骨細胞数の減少と相関性を示した。MS 群で NFAT ファミリーの発現が増加し、NFATc1 の上流に位置する破骨細胞分化抑制に働く INF- β においては、メカニカルストレスの影響が認められなかったことから、メカニカルストレスは NFATc1 より下流のシグナル伝達を制御することで、破骨細胞分化を抑制していることが示唆された。

論文審査にあたって、論文申請者による研究要旨の説明後、本研究ならびに関連する研究について口頭試問を行った。主な質問事項は、1)RAW 細胞から破骨細胞への分化過程、2)メカニカルストレスの種類、方法、設定、3)メカニカルストレスと融合との関係、4)メカニカルストレスと関連遺伝子との関係、5)生体内のメカニカルストレスの影響等であった。これらの質問に対して申請者から適切かつ明快な回答、説明が得られ、研究の立案と遂行、結果の収集とその評価について申請者が十分な能力を有していることが確認された。本研究は、メカニカルストレスが直接的に RAW 細胞を用いた破骨細胞分化を抑制することを示したものであり、その内容が高く評価された。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、さらに発展的研究へのモチベーションも高く将来性についても評価された。本研究業績は再生治療のみならず関連領域にも寄与すること大であり、博士 (歯学) の学位に値するものと認められた。