

学位論文題名

Effect of the release from mechanical stress on
osteoclastogenesis in RAW264.7 cells

(機械的刺激の解放が RAW264.7細胞における
破骨細胞分化過程に与える影響)

学位論文内容の要旨

【緒言】

機械的刺激(メカニカルストレス)に対する生体や骨における応答に関して様々な報告がなされており、それらの多くは機械的刺激を与えた場合の反応である。しかし、機械的刺激の解放による反応に関してほとんど報告されていない。我々は以前、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、破骨細胞分化誘導系に機械的刺激を直接作用させた場合、破骨細胞への分化誘導能を抑制させることを報告している。今回、直接的な機械的刺激から解放した場合の破骨細胞に対する影響を検索した。

【材料と方法】

最終濃度 50ng/ml の RANKL を添加した α -MEM 培養液を用いて、I 型 collagen 処理された BioFlex plate にて、通法に従い RAW264.7 細胞を培養した。機械的刺激は細胞伸展率 10%、30 cycles/分で Flexercell tension system を用いて培養 3 日目から 48 時間連続的に与えた。機械的刺激を与えないものを対照群とし、機械的刺激を与えた (MS) もの、機械的刺激から解放後 24、48、72 時間培養したものの 4 つを実験群とした。また、破骨細胞分化過程における機械的刺激と NO との関連性について検討するため、同様の条件下で破骨細胞への分化過程に機械的刺激を与え、MS 群と対照群それぞれに NOS inhibitor の L-NAME を最終濃度 100 μ M にて処理した。

細胞は tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 陽性破骨細胞および巨大破骨細胞数 (8 核以上) を計測し、さらに real time PCR 法にて各種遺伝子の発現状況について検索した。また、NO 濃度は Griess Reagent 法にて定量した。

【結果】

対照群に比べ MS 群では破骨細胞数および巨大破骨細胞数が抑制された。機械的刺激解放後から急激に破骨細胞への分化・融合が促され、これらの細胞は、解放後 24 時間では対照群との差は小さくなり、48 時間では逆転した。

破骨細胞のマーカーとされる、TRAP、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、cathepsin-K (Cath-K)、calcitonin receptor (CTR)、ATPase, H^+ transporting member I (ATP6i)、chloride channel (ClC7) の遺伝子群や細胞融合に関与する dendritic cell specific transmembrane protein (DC-STAMP) の発現は機械的刺激により有意に減弱し、解放 24、48 時間後と経時的に増強し、破骨細胞数や細胞融合との関連が

認められた。さらに、72 時間後では CTR のさらなる増強が認められた。特徴的な結果として、機械的刺激によって破骨細胞数が抑制されているにもかかわらず、破骨細胞分化必須因子である NFATc1 および c2、c3 の発現は抑制されず、解放後に有意に増強された。

一方、inducible NO synthetase (iNOS) 発現は機械的刺激によって有意に増強しており、解放後 24、48、72 時間と経時的に減少傾向を認めた。iNOS の上流に位置する IFN- β 発現は機械的刺激時から解放 72 時間まで減弱傾向であった。NOS の isoform である neuronal NO synthetase (nNOS) は機械的刺激によってわずかな減少が認められたが、解放後は有意差が認められなかった。また、endothelial NO synthetase (eNOS) の発現は認められなかった。破骨細胞のレセプターである RANK、osteoclast-associated receptor (OSCAR) では機械的刺激によってわずかな減少が認められ、macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) receptor (c-fms) では有意差が認められなかった。解放後、RANK に有意差は認められず、c-fms では 24 時間後、OSCAR では 48 時間後に有意な増強が認められた。

機械的刺激によって iNOS の発現が増強したことから、MS 群において NOS inhibitor の L-NAME を処理した。NO 量は MS 群と比較し、L-NAME 投与 MS 群で有意に減少した。また、破骨細胞数や巨大破骨細胞数は MS 群と比較し L-NAME 投与 MS 群で有意に増加した。破骨細胞関連遺伝子発現に関して破骨細胞マーカーや DC-STAMP の遺伝子発現では増加傾向が認められた。一方、iNOS、NFATc1、RANK、c-fms の発現は統計的な有意差が無く、IFN- β では増強が認められた。

なお、対照群において、L-NAME 処理による破骨細胞数、巨大破骨細胞数および破骨細胞関連遺伝子発現における有意差は認められなかった。

【考察】

今回の実験から、RANKL による RAW 細胞の破骨細胞分化誘導系において、機械的刺激による破骨細胞分化・融合の抑制と、解放後の急激な促進に iNOS を介した NO 量増加および NFATc family の up-regulation の関与が示唆された。

破骨細胞分化において NO は抑制的に作用するという報告が多い。今回の研究においても同様に、破骨細胞分化誘導系において機械的刺激により iNOS が増強し、それに伴い NO 量が増加して破骨細胞数や破骨細胞マーカー遺伝子群の発現が抑制された。さらに、L-NAME 処理 MS 群において破骨細胞数が増加し、破骨細胞マーカー遺伝子群の発現が増強した。以上の結果より、NO の産生が機械的刺激による破骨細胞分化誘導系抑制作用の一端を担い、その産生阻害により、機械的刺激の抑制作用が緩和することが示唆された。機械的刺激から解放された後に iNOS の上流に位置する IFN- β の発現が減弱したのは NO によるネガティブフィードバックのみならず、機械的刺激によってさらにその上流においての影響を受けている可能性が示唆された。

また、破骨細胞分化必須因子である NFATc1 やその family の発現は機械的刺激によって変化せず、解放後に増強された。このことは恒常性を保つ機構が作用し、機械的刺激による破骨細胞分化抑制に対して破骨細胞数を回復させる反応が生じた可能性が示唆された。また、機械的刺激解放 72 時間において CTR の発現がさらに増強した。CTR は破骨細胞マーカー遺伝子群であるが、活性が高まることで破骨細胞に対して抑制的に働くと報告されている。そのため、機械的刺激解放後 48 時間における破骨細胞数および巨大破骨細胞数の増加に対して、同様の機構が作用して、それを制御するように CTR 発現のさらなる増強が生じた可能性が推測された。

【結語】

破骨細胞分化誘導系において、細胞への直接的な機械的刺激からの解放による影響は様々な破骨細胞関連遺伝子発現の増強、減弱によって厳密にコントロールされ、特に機械的刺激による破骨細胞分化・融合の抑制と、解放後の急激な促進には iNOS による NO 量増加および NFATc family の up-regulation の関与することが示唆された。

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

学 位 論 文 題 名

Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells

(機械的刺激の解放が RAW264.7細胞における
破骨細胞分化過程に与える影響)

審査は審査員全員出席の下で行った。まず申請者に提出論文要旨の説明を求めるとともに、適宜提出論文の内容と関連分野に関する説明を求め、その後、口頭試問の形式でその内容および関連分野について試問した。まず申請者から以下の説明がなされた。

【緒言】

機械的刺激に対する生体の反応において、力の負荷時と同様にその解放時の反応も重要であるが、力の解放による反応についてはほとんど報告されていない。我々は以前、破骨細胞分化誘導系に機械的刺激を直接作用させた場合、破骨細胞への分化誘導能を抑制させることを報告している。今回、直接的な機械的刺激から解放した場合の破骨細胞に対する影響を検索した。

【材料と方法】

RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を BioFlex plate にて培養した。機械的刺激は Flexercell tension system を用いて培養 3 日目から 48 時間与えた。機械的刺激を与えないものを対照群とし、機械的刺激を与えた (MS) 群、機械的刺激から解放後 24、48、72 時間培養した 4 つの実験群とした。また、破骨細胞分化過程における機械的刺激と NO との関連性について検討するため、同様の条件下で MS 群と対照群それぞれに NOS inhibitor の L-NAME を処理した。

NO 濃度は Griess Reagent 法にて定量し、破骨細胞数および巨大破骨細胞数 (8 核以上) を求め、さらに real time PCR 法にて各種遺伝子の発現状況について検索した。

【結果】

対照群に比べ MS 群では破骨細胞数および巨大破骨細胞数が抑制された。機械的刺激解放後から急激に破骨細胞への分化・融合が促された。

破骨細胞のマーカー遺伝子群や細胞融合に関与する DC-STAMP の発現は機械的刺激により有意に減弱し、解放 24、48 時間後には経時的に増強し、破骨細胞数、細胞融合との関連を認めた。72 時間後では CTR がさらに増強を認めた。特徴的な結果として、機械的刺激によって破骨細胞数が抑制されているにもかかわらず、破骨細胞分化必須因子である NFATc family の発現は抑制されず、解放後に有意に増強された。一方、iNOS 発現は機械的刺激によって有意に増強しており、解放後 24、48、72 時間と減少傾向を認めた。iNOS の上流に位置する IFN- β 発現は機械的刺激時から解放 72 時間まで減弱傾向であった。

NO 量は MS 群と比較し L-NAME 投与 MS 群で有意に減少した。また、破骨細胞数や巨大破骨細胞数は MS 群と比較し L-NAME 投与 MS 群で有意に増加した。破骨細胞関連遺伝子発現に関して破骨細胞マーカーや DC-STAMP の遺伝子発現は増加傾向を認めた。

【考察】

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細胞への直接的な機械的刺激から解放することによる影響は様々な破骨細胞関連遺伝子発現の増強、減弱によって機械的刺激に対して厳密にコントロールされ、特に機械的刺激による破骨細胞分化・融合の抑制と、解放後の急激な分化・融合の促進に iNOS による NO 量増加および NFATc family の up-regulation の関与が示唆された。

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. 破骨細胞数の増加と apoptosis との関係について。
2. INF- β の関与のしかたについて。
3. NFATc1 が機械的刺激からの解放で上昇する理由について。
4. 機械的刺激が細胞増殖に与える影響について。
5. 実験期間について。
6. 今後の展開について。

矯正治療では、矯正力という機械的刺激を組織に加え、歯槽骨における骨吸収を誘導して歯の移動を行い、不正咬合の治療を行っている。本研究はこのような機械的刺激が破骨細胞に直接加わると、破骨細胞誘導のメカニズムが抑制傾向に転じるという従来の研究結果の上に立ち、破骨細胞に加えた機械的刺激を除去した場合に生じる破骨細胞誘導に与える影響と、その遺伝子情報の変化を明らかにしたものである。本研究成果は、今後の歯科矯正学の発展のために重要な情報を与えたものと高く評価できる。加えて、試問に対する回答は適切なものであり、申請者は本研究に直接関係する事項のみならず、関連分野における基礎的な広い学識を有していると認められた。また、本研究を基にして今後益々発展させて行く可能性があるものと評価された。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。