

Effect of compressive force on osteoclastogenesis

(圧縮力が破骨細胞分化に与える影響)

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯科矯正治療の目的は歯を移動し個体にとって最適な咬合を確立することである。歯科矯正治療で歯の移動を行う際には、矯正力がメカニカルストレスとして、骨組織を形成している骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞および歯根膜由来(PDL)細胞などの細胞群に作用し、これらの細胞群がメカニカルストレスを感受し、生体反応が生じた結果、破骨細胞による骨吸収と骨芽細胞による骨添加が生じ、歯が移動する。近年、骨芽細胞や PDL 細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させると破骨細胞分化誘導因子が増加するとの報告はあるが、破骨細胞分化誘導系に直接圧縮力を作用させた報告はない。本研究の目的は、破骨細胞分化誘導系に直接圧縮力を作用させ、その影響を検索することである。

【材料と方法】

最終濃度 50 ng/ml の RANKL を添加した α MEM 培養液を用いて、RAW264.7(RAW)細胞を 6 穴プレートにて培養し、圧縮力として細胞層上にシリコン製の円筒を乗せた。重さの調節は円筒内にステンレススチールを入れ、圧縮力は 0.5, 1.0 g/cm²、作用時間は 0, 15, 30, 60 および 90 分とし、培養 3, 4, 5 日目にそれぞれ持続的に作用させた。圧縮力を作用させた群を CF 群、作用させない群を対照群とした。一定期間培養後、圧縮力を作用させた後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色し、破骨細胞数(2 核以上)および巨大破骨細胞数(8 核以上)を測定した。また、RANKL 非添加の RAW 細胞に圧縮力を作用させ、細胞内 ATP 量を測定した。次に、培養 5 日目に 1.0 g/cm² の圧縮力を作用させた CF 群について、アポトーシス関連因子の発現状況を real time PCR 法で検索するとともに、ネクローシスの発現状況を乳酸脱水素酵素(LDH)量で検索した。

【結果】

培養日程 3 日目に圧縮力を作用させた場合、対照群と比較し CF 群では、いずれの圧縮力および圧縮時間においても総破骨細胞数に有意な差を認めなかった。培養 4 日目に圧縮力を作用させた場合、CF 群では、1.0 g/cm² の圧縮力を 30 分間以上作用させると、総破骨細胞数が減少した。培養 5 日目に圧縮力を作用させた場合、いずれの CF 群においても、総破骨細胞数は有意に減少し 1.0 g/cm² の圧縮力を 90 分間作用させた群では対照群の約 60%に減少した。巨大破骨細胞数も培養 4, 5 日目の CF 群(0.5, 1.0 g/cm²)において有意に減少した。また、培養 3 日目に圧縮力を作用させその後 48 時間培養を続けた場合、総破骨細胞数に有意な差を認めなかった。また、RANKL 非添加の RAW 細胞に圧縮力を作用させ、生存細胞内 ATP 量により生存細胞数を測定したところ、CF 群と対照群との間に有意な差を認めなかった。培養 5 日目に 1.0 g/cm² の圧縮力を作用させた CF 群および対照群のアポトーシス関連因子の発現状況を検索したところ、アポトーシス誘導因子である Fas および Bax は CF 群において、mRNA の発現が有意に上昇した。しかし、アポトーシス誘導因子である Caspase 3 および 8 の発現は有意な差を認めなかった。さらに、アポトーシス抑制因子である Bcl-2 の発現も有意な差を認めなかったが、同様にアポトーシス抑制因子である Bcl-xL の

mRNA の発現は CF 群で有意に上昇した。また、5 日目に圧縮力を作用させた CF 群において LDH 量の変化について検討を行ったところ、CF 群と対照群との間に LDH 量の有意な差は認められなかった。

【考察】

骨芽細胞ならびに PDL 細胞に圧縮力を作用させる実験として、これまで 1.0-5.0 g/cm² 程度の圧縮力が用いられていた。そこで、予備実験として、はじめに 1.0, 2.0 および 4.0 g/cm² の各圧縮力を 0, 15, 30, 60 および 90 分間持続的に作用させ、総破骨細胞数を計測した。2.0 あるいは 4.0 g/cm² の圧縮力を、15 分間作用させた場合、対照群と比較し CF 群では総破骨細胞数が約 20% に減少した。すなわち、破骨細胞は圧縮力によりその数が減少し、分化誘導は抑制されることが示唆された。2.0 g/cm² 以上の圧縮力では細胞への障害が非常に大きいことから、RAW 細胞および破骨細胞に用いる圧縮力の強さは 0.5 あるいは 1.0 g/cm² を用いるのが有効であると考え、本研究ではこれらの圧縮力に対する RAW 細胞および破骨細胞の反応を観察した。培養 3 日目に圧縮力を作用させた場合、破骨細胞数は圧縮力の影響を受けなかったが、分化・融合が進んだ培養 4 日目に圧縮力を作用させた CF 群 (1.0 g/cm²) で総破骨細胞数が減少し、さらに CF 群 (0.5, 1.0 g/cm²) において巨大破骨細胞数が減少した。培養 5 日目ではいずれの圧縮力においても、総破骨細胞数および巨大破骨細胞数が減少した。これらの結果から、破骨細胞数の減少は、圧縮力による破骨細胞の融合による数の減少ではないことが示された。また、破骨細胞分化・融合の初期段階では圧縮力による細胞数への影響は少なく、より分化・融合が進むことで、その影響を受けることが示唆された。破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞が圧縮力による影響を受けるのかを検討した結果、いずれの圧縮力においても、細胞内 ATP 量に有意な差は認められなかったことから、RANKL 非添加の RAW 細胞数には圧縮力は影響しないことが示唆された。また培養 3 日目に圧縮力を作用させその後 48 時間培養を続けた場合、総破骨細胞数に有意な差を認めなかったことから、培養初期に、圧縮力を作用させた場合は誘導される破骨細胞数への影響はないことが明らかになった。次に、培養後期に破骨細胞数が減少する原因が細胞死によるものかを分析した。real time PCR 法でアポトーシス関連因子の発現状況を検索した結果、圧縮力を作用させると、Fas および Bax の mRNA の発現は上昇したが、Caspase 3 および 8 の発現は、有意な差を認めなかった。わずか 15 分間圧縮力を作用させるだけで、総破骨細胞数が減少しており、mRNA からタンパク質に翻訳される時間的な背景から、総破骨細胞数の減少はアポトーシスによるものではないと推察した。また、総破骨細胞数の減少がネクローシスによるものかを考察するため、LDH 量の測定を行った。細胞が細胞膜破壊を伴う細胞死に至ると LDH が細胞外に流出し、ネクローシスにおいて、細胞外に流出する LDH 量が上昇するといわれているが、CF 群と対照群を比較したところ、LDH 量に有意な差は認められなかった。このことから、培養後期に破骨細胞数が減少した原因はネクローシスによる細胞死である可能性は低いと考えられた。

【結論】

RAW 細胞ならびに破骨細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させた場合、以下のことが明らかとなった。

1. RAW 細胞数および培養初期の破骨細胞数は圧縮力の影響を受けにくい。
2. 培養後期の破骨細胞は圧縮力の影響により、その数が減少する。特に、巨大破骨細胞数は圧縮力の影響を受けやすい。
3. 培養後期の総破骨細胞数および巨大破骨細胞数が圧縮力により減少した原因は、アポトーシスやネクローシスによる細胞死が原因である可能性が低い。

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 土 門 卓 文

学 位 論 文 題 名

Effect of compressive force on osteoclastogenesis

(圧縮力が破骨細胞分化に与える影響)

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に関する説明を求め、その後口頭試問の形式で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】

近年、骨芽細胞や歯根膜線維芽細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させると破骨細胞分化誘導因子が増加するとの報告はあるが、破骨細胞分化誘導系に直接圧縮力を作用させた報告は未だされていない。本研究の目的は、破骨細胞分化誘導系に直接圧縮力を作用させ、その影響を検索することである。

【材料と方法】

RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞 (RAW 細胞) を 6 穴プレートにて培養し、圧縮力として細胞層上にシリコン製の円筒を乗せた。重さの調節は円筒内にステンレススチールを入れ、圧縮力は 0.5、1.0 g/cm²、作用時間は 0、15、30、60、90 分とした。一定期間培養後、圧縮力を作用させ、破骨細胞数および巨大破骨細胞数 (8 核以上) を測定した。圧縮力を作用させない群を対照群、圧縮力を作用させた群を CF 群とした。一定期間培養後、圧縮力を作用させた後、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色し、破骨細胞数 (2 核以上) および巨大破骨細胞数 (8 核以上) を測定した。また、RANKL 非添加の RAW 細胞に圧縮力を作用させ、細胞内 ATP 量を測定した。次に、培養 5 日目に 1.0 g/cm² の圧縮力を作用させた CF 群についてアポトーシス関連因子の発現状況を real time PCR 法で検索するとともに、ネクローシスの発現状況を乳酸脱水素酵素 (LDH) 量で検索した。

【結果・考察】

培養期間 3 日間ではいずれの圧縮力においても、対照群と CF 群の間に総破骨細胞数に有意な差を認めなかったが、培養期間 5 日間では CF 群では圧縮力および作用時間依存的に総破骨細胞数が減少した。また、同日程で巨大破骨細胞数を計測したところ、培養 5 日間では CF 群で巨大破骨細胞数が有意に減少したことから、細胞融合により総破骨細胞数が減少したのではないことが示された。また培養期間 5 日間で 3 日目に圧縮力を作用さ

せ、その後圧縮力なしで培養を続けた場合、破骨細胞数および巨大破骨細胞数は有意な差を認めず、培養初期に圧縮力を作用させても破骨細胞数に影響がないことが示された。

RANKL 非添加の RAW 細胞に圧縮力を作用させ、生存細胞内 ATP 量により生存細胞数を測定したところ、有意な差を認めず、圧縮力による影響は認められなかった。

圧縮力により破骨細胞数が減少する原因は細胞死によるものかを解明するため、real time PCR 法でアポトーシス関連遺伝子の発現状況を検索した。Bax、Fas、Bcl-xL は上昇したが Caspase は上昇せず、破骨細胞死が生じるまでの時間的な背景から、アポトーシスによる細胞死の可能性は低いと示唆された。また、LDH 法によりネクロシスの検出を行った。対照群と CF 群の間に有意な差を認めなかったことから、破骨細胞数が減少する原因はネクロシスではない可能性が示唆された。

【結論】

RAW 細胞ならびに破骨細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させた場合。以下のことが明らかとなった。

1. RAW 細胞数および培養初期の破骨細胞数は圧縮力の影響を受けにくい。
2. 培養後期の破骨細胞は圧縮力の影響により、その数が減少する。特に、巨大破骨細胞数は圧縮力の影響を受けやすい。
3. 培養後期の総破骨細胞数および巨大破骨細胞数が圧縮力により減少した原因は、アポトーシスやネクロシスによる細胞死が原因である可能性が低い。

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. 細胞に対する圧迫刺激の方法について
2. 機械的刺激による細胞死の種類について
3. アポトーシス、ネクロシスの判定方法について
4. 今後の研究の展開について

矯正力による歯の移動の機構に関しては多くの研究が為されているが、破骨細胞が直接圧迫刺激を受けた際にどのような様相を示すかについては、未だに明らかにされていなかった。本研究では破骨細胞に直接圧迫刺激を加える方法を開発し、圧迫刺激を加えた際の破骨細胞数、またその減少のメカニズムを検討している。その成果により、圧迫側歯根膜において一度増加する破骨細胞が次第に減少していくメカニズムに関して、その一端が明らかにされ、有効な矯正力の付与方法などの解明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、今後益々本研究を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と認めた。