

## 学位論文題名

Short-term mechanical stress inhibits osteoclastogenesis  
via suppression of DC-STAMP in RAW264.7 cells

（短時間の機械的刺激はRAW264.7細胞においてDC-STAMPの  
発現抑制によって破骨細胞分化を抑制する）

## 学位論文内容の要旨

【緒言】破骨細胞は造血幹細胞由来の多核の巨細胞で、生体内で唯一骨吸収能を有し、骨のリモデリングに重要な役割を果たしている。破骨細胞の分化や機能に異常をきたすと、大理石骨病や骨粗鬆症、関節リウマチなどが誘発されるため、破骨細胞は様々な骨疾患の標的細胞として注目されており、破骨細胞分化の制御メカニズムの解明は非常に重要である。RANKLは破骨細胞分化に必須の因子である。RANKLシグナルはマスター転写因子であるNFATc1を誘導し、NFATc1によって破骨細胞の分化や機能に必要な破骨細胞関連遺伝子の多くが転写制御されている。

機械的刺激は骨のリモデリングに重要な制御因子である。機械的刺激が欠如すると、骨粗鬆症を引き起こし、過剰な機械的刺激は病的な骨吸収を引き起こす。近年、機械的刺激が骨組織に受容、伝達される分子メカニズムを解明するため、様々な実験系が考案されている。代表的なものとして、灌流刺激・圧迫刺激・伸展刺激・静水圧などを機械的刺激として用いた実験系があり、機械的刺激が、骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞の分化やアポトーシスを誘導することが報告されている。骨芽細胞や骨細胞に対して機械的刺激をかけた系は数多く報告されているが、破骨細胞を単独培養して、直接機械的刺激を加えた報告はわずかである。そこで当研究室では破骨細胞の単独培養を行い、直接的な機械的刺激による破骨細胞分化への影響について検討を行ってきた。これまでに、48時間の機械的刺激によって破骨細胞分化が抑制されたことを報告したが、刺激を加えた直後の変化については明らかにされていない。そこで本研究では、24時間までの短時間の機械的刺激が、破骨細胞の分化に及ぼす影響とそのメカニズムを解明することを目的とした。

【材料と方法】RAW264.7細胞を、RANKL添加培養液を用いて type I collagen-coated BioFlex Culture Plates にて 72 時間培養した後、Flexercell tension system を用い、30 cycle/分、10%伸展刺激を 6、12、24 時間作用させた。TRAP 染色にて、破骨細胞(2核以上)数および巨大破骨細胞(8核以上)数を測定し、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化をリアルタイムPCR法にて定量した。続いて、DC-STAMP、E-cadherin、Integrin $\alpha$ V およ

び Integrin  $\beta 3$  のタンパク質発現量の変化をウェスタンブロット法にて解析した。さらに、NFATc1、2、および3の mRNA 発現量の変化をリアルタイムPCR法にて定量し、NFAT の転写活性の変化をルシフェラーゼアッセイにて測定した。

【結果】24時間の伸展刺激を加えることによって、コントロール群と比較して、TRAP陽性破骨細胞数および巨大破骨細胞数は有意に減少した。破骨細胞のマーカーとされる破骨細胞特異的遺伝子 (TRAP、CTR、MMP-9、Cath-K、Clc7 および ATP6i) の mRNA 発現量は、6、12、24時間のいずれの時点でも有意に減少し、TRAP陽性破骨細胞数との相関が認められた。また、破骨細胞の細胞融合に必須の融合因子である DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量も伸展刺激によって減少した。DC-STAMP のタンパク質発現量は、24時間の伸展刺激によって顕著に減少し、細胞接着因子である E-cadherin、Integrin  $\alpha V$  および Integrin  $\beta 3$  のタンパク質発現量も減少した。破骨細胞分化の master switch である NFATc1 の mRNA 発現量は、6時間で減少し、12時間以降増加し、NFATc2 および 3 の mRNA 発現量は変化しなかった。NFAT の転写活性は、伸展刺激によって有意に増加した。

【考察】破骨細胞が多核化するために、細胞融合は必須の現象であり、細胞同士が接着し、細胞と骨が接着し、細胞膜同士が融合するという多くの段階から成り立っている。DC-STAMP は破骨細胞の細胞融合に必要な不可欠であると報告されており、NFATc1 は DC-STAMP のプロモーター領域に結合し直接 DC-STAMP の発現を誘導するため、NFATc1-DC-STAMP シグナルは、破骨細胞の多核化に重要な役割を果たしている。近年、OC-STAMP が同定され、破骨細胞の細胞融合は OC-STAMP と DC-STAMP によって協同的に調節されており、OC-STAMP と DC-STAMP は RANKL-NFATc1 シグナルによって誘導されていることが明らかとなった。本研究では、伸展刺激によって破骨細胞数とともに DC-STAMP と OC-STAMP の mRNA 発現量が減少し、さらに、DC-STAMP のタンパク質発現量も伸展刺激によって減少した。これらの結果より、伸展刺激が破骨細胞の分化を抑制したのは、DC-STAMP と OC-STAMP の発現抑制によって細胞融合が阻害されたのが原因と考えられた。

接着因子である E-cadherin と Integrin  $\alpha V \beta 3$  もまた、破骨細胞の細胞融合に関係している。E-cadherin は前駆細胞同士の接着に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では伸展刺激によって E-cadherin の mRNA 発現量とタンパク質発現量が減少した。一方で、Integrin  $\alpha V \beta 3$  はヘテロダイマーとして機能し、前駆細胞が骨と接着するために重要であると報告されている。本研究では、Integrin  $\alpha V$  と Integrin  $\beta 3$  のいずれも mRNA 発現量とタンパク質発現量が減少したため、細胞融合に必要な Integrin  $\alpha V \beta 3$  が減少したと考えられる。従って、伸展刺激が破骨細胞の分化を抑制したのは、DC-STAMP と OC-STAMP と同様に、E-cadherin と Integrin  $\alpha V \beta 3$  の発現が抑制されたことも影響したと考えられた。

NFATc1 は破骨細胞分化に必須の転写因子で、多くの破骨細胞関連遺伝子を転写制御して

いる。今回、伸展刺激によって、NFATc1 によって転写制御される破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量やタンパク質発現量が減少することを見いだした。このことは、NFATc1 の mRNA 発現量が 6 時間で減少したことによるのかもしれない。しかしながら、NFATc1 の mRNA 発現量が 12 時間以降増加したことや、NFAT の転写活性が増加したことは、この現象を説明できないことから、伸展刺激によって NFAT の転写活性をキャンセルする負の制御因子が誘導された可能性が考えられた。例えば、伸展刺激によって NFATc1 に対する転写抑制因子が誘導された可能性や、破骨細胞関連遺伝子のエピジェネティックな変化による遺伝子の発現抑制が生じた可能性を推測できるが、さらなる研究が必要である。

【結論】短時間の伸展刺激によって破骨細胞の分化が抑制された。これは、DC-STAMP などの細胞融合に必要な分子の発現が、伸展刺激によって抑制されたために、破骨細胞の細胞融合が抑制されたことによると示唆された。

# 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 網 塚 憲 生

学 位 論 文 題 名

## Short-term mechanical stress inhibits osteoclastogenesis via suppression of DC-STAMP in RAW264.7 cells

(短時間の機械的刺激はRAW264.7細胞においてDC-STAMPの  
発現抑制によって破骨細胞分化を抑制する)

審査は審査担当者が一同に会して約 1 時間半かけて行った。まず申請者に本論文の概要の説明を求め、口頭試問形式で提出論文の内容及び関連分野について試問した。申請者は論文の概要を以下のように説明した。

【目的】機械的刺激は骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあるが、破骨細胞に対して機械的刺激を直接作用させた報告は少ない。これまで我々は破骨細胞分化誘導系に 48 時間の伸展刺激を直接作用させた場合、破骨細胞の分化誘導能が抑制されることを報告した。本研究では、6 時間から 24 時間までの短時間の伸展刺激が破骨細胞分化にどのような影響を与えるかを検討した。

【材料と方法】RAW264.7 細胞を、RANKL 添加培養液を用いて 72 時間培養した後、Flexercell tension system を用い、30 cycle/分、10%伸展刺激を 6、12、24 時間作用させた。TRAP 染色にて破骨細胞(2 核以上)数および巨大破骨細胞(8 核以上)数を測定し、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化をリアルタイム PCR 法にて定量し、タンパク質発現量の変化をウェスタンブロッティング法にて解析した。

【結果】24 時間の伸展刺激によって、コントロール群と比較して、TRAP 陽性破骨細胞数および巨大破骨細胞数は有意に減少した。破骨細胞のマーカールとされる破骨細胞特異的遺伝子(TRAP、CTR、MMP-9、Cath-K、C1C7 および ATP6i)の mRNA 発現量は、6、12、24 時間のいずれの時点でも有意に減少した。DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量も伸展刺激によって減少した。DC-STAMP のタンパク質発現量は、24 時間の伸展刺激によって顕著に減少し、細胞接着因子である E-cadherin、Integrin  $\alpha$  V および Integrin  $\beta$  3 のタンパク質発現量も減少した。

NFATc1 の mRNA 発現量は、6 時間で減少し、12 時間以降増加し、NFATc2 および 3 の mRNA 発現量は変化しなかった。NFAT の転写活性は、伸展刺激によって有意に増加した。

【考察】 DC-STAMP は破骨細胞の細胞融合に必要不可欠である。近年、OC-STAMP が同定され、破骨細胞の細胞融合は OC-STAMP と DC-STAMP によって協同的に調節されていることが明らかとなった。本研究では、伸展刺激によって破骨細胞数とともに DC-STAMP と OC-STAMP の mRNA 発現量が減少し、さらに DC-STAMP のタンパク質発現量も伸展刺激によって減少した。これらの結果より、伸展刺激が破骨細胞の分化を抑制したのは、DC-STAMP と OC-STAMP の発現抑制によって細胞融合が阻害されたことが原因と考えられた。Integrin  $\alpha V \beta 3$  は前駆細胞と骨との接着、E-cadherin は前駆細胞同士の接着に重要な役割を果たすことが知られている。本研究では伸展刺激によって E-cadherin、Integrin  $\alpha V$  および Integrin  $\beta 3$  の mRNA 発現量とタンパク質発現量がいずれも減少した。従って、伸展刺激が破骨細胞の分化を抑制したのは、E-cadherin と Integrin  $\alpha V \beta 3$  の発現が抑制されたことも影響したと考えられた。

本研究では、伸展刺激により、NFATc1 によって転写制御される破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量やタンパク質発現量が減少した。NFATc1 の mRNA 発現量が 12 時間以降増加したこと、および NFAT の転写活性が増加したことは、この現象を説明できない。すなわち伸展刺激によって NFAT の転写活性をキャンセルする負の制御因子が誘導された可能性が考えられるが、さらなる研究が必要である。

【結論】 短時間の伸展刺激によって破骨細胞の分化が抑制された。これは、DC-STAMP などの細胞融合に必要な分子の発現が、伸展刺激によって抑制されたために、破骨細胞の細胞融合が抑制されたことによると示唆された。

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) Integrin  $\alpha V \beta 3$  と破骨細胞分化の関連性について
- 2) 矯正力と歯の移動について
- 3) 機械的刺激と生理現象の再現性について
- 4) 本研究の今後の方向性について

矯正力による歯の移動のメカニズムにおいて、破骨細胞前駆細胞などに機械的刺激が直接加わった場合には、破骨細胞の分化誘導が抑制されるが、その要因を明らかにした研究成果である。機械的刺激と骨代謝との関連について、一つの要因を明らかにした成果であり、骨代謝の分野における新たな現象を提示した論文と高く評価できる。口頭試問において、申請者からは明快な回答と説明がなされ、さらに今後の研究の展望についても評価された。審査担当者は、申請者が博士（歯学）の学位を授与される資格を有するものと認めた。