

氏名	荒木 大介
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4933号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	ラット歯肉線維芽細胞に対する周期的圧縮刺激が破骨細胞の分化に及ぼす影響
学位論文審査委員	滝川 正春 教授 上岡 寛 准教授 皆木 省吾 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

不適切な義歯を使用すること起因する骨吸収は、臨床的に広く認められる事実であるが、その詳細なメカニズムはいまだ明らかにされていない。当研究室では、ラットの臼歯部口蓋を対象として、実験義歯床を介した機械的圧縮刺激が粘膜固有層の圧扁、破骨細胞による骨吸収、粘膜固有層の炎症性細胞浸潤を惹起することを病理組織学的に観察している。骨組織では骨細胞が機械的刺激受容のセンサーとして機能することが知られているが、近年、骨組織の制御において骨周囲の細胞からの産生因子の重要性が報告されている。

そこで本研究では、ラット口蓋歯肉線維芽細胞(rGF細胞)を用いて、機械的刺激による破骨細胞分化関連因子の産生変化と破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞とラット骨髄細胞を用いて、機械的刺激による間接的な破骨細胞分化への影響を調査した。本研究は、義歯床を介した機械的刺激による粘膜固有層の圧扁に伴って歯肉線維芽細胞から産生される因子が、歯槽骨表面の破骨細胞の活性化に影響を及ぼすとする研究仮説のもとに行った。

【材料ならびに方法】

Wistar系雄性ラットの口蓋歯肉より単離したrGF細胞と大腿骨と脛骨から採取した骨髄細胞、理化学研究所から購入したRAW264.7細胞を使用した。

培養細胞伸展システム(STB-140, STREX)を用いて、一軸方向性の正弦波周期の圧縮刺激(7.4%, 0.167Hz)を2時間負荷した。負荷後から様々な時間経過後にmRNAと培養上清を回収し、続く解析や共培養に使用した。なお、圧縮刺激を負荷していない培養状態を対照とした。

周期的圧縮刺激による細胞傷害性は、圧縮刺激を負荷した後、12時間後の培養上清中の乳酸脱水素酵素活性から検出した。

周期的圧縮刺激による間接的なRAW264.7細胞の破骨細胞分化への影響は、soluble receptor activator of NF- κ B ligand(sRANKL)と周期的圧縮刺激を負荷したrGF細胞の培養上清を10%あるいは30%(vol/vol)添加したコンディションドメディウムにてRAW264.7細胞を6日間培養した後、酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色にて多核陽性細胞を観察した。

回収した mRNA から定量 RT-PCR 法を用いて、Cyclooxygenase-2 (COX-2), Interleukin-6 (IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL-1 β), Osteoprotegerin (OPG), RANKL の発現を解析した。培養上清中の Prostaglandin E₂ (PGE₂) 量は ELISA 法にて解析した。

また、COX-2 選択的阻害剤 Celecoxib を用いて、PGE₂ 産生抑制下での rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激による間接的な骨髄細胞の破骨細胞分化への影響を検討した。rGF 細胞に Celecoxib を添加し、周期的圧縮刺激を負荷した後、12 時間後の培養上清を回収した。Macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) を含んだ培地で 3 日間培養した骨髄細胞に、sRANKL と rGF 細胞の培養上清を 30% (vol/vol) 添加したコンディションドメEDIUMにてさらに 3 日間培養した後、TRAP 染色にて多核陽性細胞を観察した。

データ解析には、t 検定または、一元配置分散分析の後 Tukey 法を用いて多重比較を行った。有意水準は 1%または 5%とした。

【結果と考察】

本研究における周期的圧縮刺激の細胞傷害性は 3.23%と低く、細胞の生存に影響はなかったと考えられた。

RAW264.7 細胞の破骨細胞分化への影響に関しては、周期的圧縮刺激を負荷した培養上清を 10%添加することによって、TRAP 陽性細胞が顕著に増加した。また、培養上清を 30%添加した場合には、10%添加に比べて多核で巨大な細胞質を有する細胞が多く観察された。このことから周期的圧縮刺激を負荷した培養上清には、破骨細胞分化を促進する因子が含まれていると推察された。

rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激による遺伝子発現変化では、COX-2 と IL-6 は両遺伝子とも負荷後 1 時間以内に増加した。TNF- α と IL-1 β の遺伝子発現は、対照群と比較して変化がなかった。一方、OPG の遺伝子発現は 9 時間後に有意に減少したのみだった。RANKL は検出できなかった。

また、PGE₂ 産生も周期的圧縮刺激によって増加し、対照のおよそ 10 倍増を示した。

骨髄細胞の破骨細胞分化への影響に関して、周期的圧縮刺激を負荷した培養上清を添加することで RAW264.7 細胞と同様に TRAP 陽性細胞が有意に増加したが、Celecoxib 添加によって有意に減少した。圧縮力による破骨細胞分化は、圧縮力により産生された PGE₂ を介して分化が促進される可能性が示唆された。

【結論】

rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激を負荷した培養上清には、破骨細胞分化を促進する因子が含まれており、周期的圧縮刺激は COX-2 と IL-6 の遺伝子発現と PGE₂ 産生を促進することが明らかになった。また、COX-2 阻害剤により周期的圧縮刺激による破骨細胞分化誘導が抑制された。以上のことから、rGF 細胞に対する周期的圧縮刺激は PGE₂ を介して、破骨細胞分化を誘導する可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

不適切な義歯を使用することに起因する骨吸収は、臨床的に広く認められる事実であるが、その詳細なメカニズムはいまだ明らかにされていない。先行研究として、ラットの臼歯部口蓋を対象として、実験義歯床を介した機械的圧縮刺激が粘膜固有層の圧扁、破骨細胞による骨吸収、粘膜固有層の炎症性細胞浸潤を惹起することを病理組織学的に観察しているが、*in vitro*での解明は不十分である。骨組織では骨細胞が機械的刺激受容のセンサーとして機能することが知られているが、近年、骨組織の制御において骨周囲の細胞からの産生される因子の重要性が報告されている。

そこで本研究では、ラット口蓋歯肉線維芽細胞（rGF細胞）とSTREX社製の培養細胞伸展システムを用いて、*in vitro*で機械的刺激による破骨細胞分化関連因子の産生変化を検討した。また、周期的圧縮刺激を負荷したrGF細胞のコンディションドメディウム（CM）を用いて破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞とラット骨髄細胞を培養し、rGF細胞に対する機械的刺激による間接的な破骨細胞分化への影響を検討した。本研究は、義歯床を介した機械的刺激による粘膜固有層の圧扁に伴って歯肉線維芽細胞から産生される因子が、歯槽骨表面の破骨細胞の活性化に影響を及ぼすとする研究仮説のもとに行ったものである。

研究結果として以下の成果が得られた。

- 1) RAW264.7細胞の破骨細胞分化への影響に関しては、周期的圧縮刺激を負荷したrGF細胞のCMによって可溶性RANKLによるTRAP陽性細胞の形成が顕著に亢進することから、周期的圧縮刺激を負荷したCM中には破骨細胞分化を増強する因子が含まれていると推察された。
- 2) rGF細胞に対する周期的圧縮刺激による遺伝子発現変化としては、COX-2とIL-6は両遺伝子とも負荷後1時間以内に増加した。TNF- α とIL-1 β の遺伝子発現は、対照群と比較して変化がなかった。一方、OPGの遺伝子発現は9時間後に有意に減少したのみだった。RANKLは検出できなかった。また、PGE₂産生も周期的圧縮刺激によって増加し、対照のおよそ10倍増を示した。
- 3) 骨髄細胞の破骨細胞分化への影響に関して、周期的圧縮刺激を負荷したrGF細胞のCMによってRAW264.7細胞と同様にTRAP陽性細胞が有意に増加したが、この増加がCOX-2選択的阻害剤であるCelecoxibの添加によって有意に抑制された。したがって、この圧縮力により、rGF細胞より産生される破骨細胞分化増強因子は、PGE₂である可能性が示唆された。

上記の結果から、rGF細胞に対する周期的圧縮刺激は、PGE₂の産生を介して、RANKLによる破骨細胞分化を増強する可能性が示唆された。本論文は、*in vivo*で見られる義歯床下組織の変化とPGE₂の発現変化から義歯床を介する機械的刺激と骨吸収の関係を解明する更なる研究への進展に寄与するものであると考えられる。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。