

論文内容要旨

持続的圧縮刺激がマウス骨細胞における
RANKL、OPG および VEGF 発現に及ぼす影響

主指導教員：谷本 幸太郎教授

(医歯薬保健学研究科 歯科矯正学)

副指導教員：兼松 隆教授

(医歯薬保健学研究科 細胞分子薬理学)

副指導教員：加来 真人講師

(広島大学病院 歯科矯正科)

八島 由佳

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

歯に矯正力を負荷すると、歯根膜、および歯槽骨に物理的的刺激が加わり、圧迫側では破骨細胞による骨吸収が、牽引側では骨芽細胞による骨添加が生じる。破骨細胞の分化には **receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand / osteoprotegerin (RANKL / OPG)** 系が重要な役割を果たしており、また **vascular endothelial growth factor (VEGF)** は骨代謝時における血管新生と骨吸収の両面に関与していることが明らかとなっている。骨芽細胞に対する機械的刺激の影響については多くの報告があり、本川らは機械的伸展刺激が機械受容体である **stretch-activated channel (S-A channel)** を介して骨芽細胞の **VEGF** および **macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)** 発現を促進することを明らかとした。一方、骨細胞はメカニカルストレスを感知し、破骨細胞や骨芽細胞を介した骨量調整が行われていると考えられているが、骨細胞への圧縮刺激 (**compressive force : CF**) がサイトカイン発現に与える影響は未だ報告がない。そこで本研究ではマウス骨細胞 (**MLO-Y4 細胞**) における **RANKL**、**OPG** および **VEGF** の発現をマウス骨芽細胞 (**MC3T3-E1 細胞**) と比較するとともに、それぞれの細胞に対する **CF** の負荷が各因子の発現に及ぼす影響について検討した。また、**S-A channel** は機械刺激によって細胞膜が伸展されることで活性化されるイオンチャネルであり、**S-A channel** の障害が **CF** 負荷によって **RANKL**、**OPG** および **VEGF** の発現に与える影響を観察した。まず、**MLO-Y4 細胞** および **MC3T3-E1 細胞** における各因子の発現を定量リアルタイム PCR 法と **ELISA** 法を用いて検討した。定量リアルタイム PCR 解析は両細胞ともに **6 well plate** に 5.0×10^4 / well の密度で播種し、4 日後 80%コンフルエントになった時点でトータル RNA を回収し解析を行った。**ELISA** 分析は 80%コンフルエントになった両細胞を無血清培地にて 24 時間培養し、その培養上清を用いて行った。次に、両細胞に 0.5 g/cm^2 または 1.0 g/cm^2 の **CF** を 1、3、6、12 時間負荷した。**CF** 負荷は **Tripuwabhrut** らの方法に基づき、細胞密度が 80%コンフルエントに達した **6 well plate** 培地に直径 30 mm のガラスプレートを置き、その上に分銅を乗せることで行った。また、骨細胞の **CF** 感受に際するシグナル伝達経路の解明のため **S-A channel** の阻害剤である **Gd³⁺** を用いて 1.0 g/cm^2 **CF** 負荷時での **RANKL**、**OPG** および **VEGF** 発現に与える影響を検討した。**Gd³⁺** の濃度は過去の報告をもとに $10 \mu\text{M}$ を用いた。**MLO-Y4 細胞** が 80%コンフルエントに達した後、 $10 \mu\text{M}$ **Gd³⁺** と共に 30 分間培養し、その後 1.0 g/cm^2 **CF** を負荷した。3 時間 **CF** を負荷したものはトータル RNA を回収した後、定量リアルタイム PCR 解析を行い、12 時間 **CF** を負荷したものは培養上清を回収後、**ELISA** 分析を行った。その結果、以下のことが明らかとなった。

1. **MLO-Y4 細胞** は **MC3T3-E1 細胞** と比較して **RANKL**、**VEGF** の遺伝子およびタンパク発現が有意に高く、**OPG** 発現は有意に低いことが明らかとなった。
2. **MLO-Y4 細胞** における **RANKL** の遺伝子およびタンパク発現は、 0.5 g/cm^2 **CF** 群で有意な増加を認められたが、**MC3T3-E1 細胞** ではコントロール群と 0.5 g/cm^2 **CF** 群との間で有意差は認められなかった。
3. **MLO-Y4** および **MC3T3-E1 細胞** とともに 1.0 g/cm^2 **CF** 負荷により **RANKL**、**VEGF** の遺伝子およびタンパク発現の有意な増加を認め、**OPG** 発現は有意に減少した。

4. MLO-Y4 細胞において 1.0 g/cm^2 の CF 負荷時の RANKL、OPG、VEGF の遺伝子およびタンパク発現は $10 \text{ }\mu\text{M}$ の Gd^{3+} 添加により有意に抑制された。

以上の結果より、骨細胞はメカニカルストレスを S-A channel を介して感知し、RANKL、OPG および VEGF の発現を調節することが明らかとなり、その反応は骨芽細胞と比較して鋭敏であることが示された。したがって、骨細胞は外部からのメカニカルストレスを受けることにより骨代謝と血管新生を促す上で重要な役割を果たすことが示唆された。