

論文の内容の要旨

氏名：高橋 康代

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The effect of high-magnitude mechanical strain on bone nodule formation by rat calvarial progenitor cells

（強い機械的伸展力がラットカルバリア細胞の骨様結節形成に与える影響）

歯科矯正治療における歯の移動は、矯正力が歯槽骨に伝達され骨吸収と骨形成による骨リモデリングによって起こるが、過度な矯正力は圧迫側歯根膜の硝子様変性を引き起こし、歯の移動遅滞を起こすと考えられている。これまで効率的な歯の移動をもたらす至適矯正力について多くの研究が行われ、*in vivo*の研究では、歯槽骨に負荷されたメカニカルストレス（MS）が bone morphogenetic protein (BMP)-2 発現を誘導し骨リモデリングを促進する、またそれは骨芽細胞分化に必須の転写因子である runt-related transcription factor 2 (Runx2) 発現の増加によることが明らかにされている。強力な骨芽細胞分化促進因子である BMPs は骨形成や骨リモデリング調節に重要な役割を担っており、BMP-2 は Smad1/Smad5 を介して Runx2 発現を誘導することが知られている。これまで *in vitro* の研究において、様々な強度の MS を骨芽細胞に負荷し、骨芽細胞分化に与える影響について検討されており、骨芽細胞への弱い MS 負荷は骨形成にきわめて重要であり、BMP-2 や転写因子である Runx2 などの骨形成関連因子の発現を増加させ骨芽細胞分化を促進させることが明らかにされている。一方、強い MS 負荷は prostaglandin E₂ (PGE₂) などの炎症促進因子の発現を増大し破骨細胞分化促進による骨吸収を誘導することも明らかとなっている。しかし強い MS 負荷が骨芽細胞分化や骨形成関連因子に与える影響については明らかにされていない。そこで、本研究は強い MS 負荷が骨芽細胞分化に与える影響を明らかにすることを目的とし、強い周期的伸展力 (TF) を rat calvarial cell に負荷し、bone nodule 形成と骨形成関連因子の発現に与える影響について検討することとした。さらに強い MS 負荷により産生される PGE₂ の骨形成関連因子発現に与える影響についても検討することとした。

Rat calvarial cell は Bellows らの方法に従い collagenase digestion により得た。細胞を 6 well Bioflex plate (Corning) に 1.0×10^4 cell/cm² の密度で播種し、 α -minimal essential medium に 15% fetal calf serum (JRH Biosciences) と 1% antibiotic-antimycotic mixture (Gibco) を添加した培養液にて 24 時間培養した。その後アスコルビン酸 (50 μ g/mL), β -グリセロフォスフェイト (10 mmol/L) を含む上記培養液に交換し、また cyclooxygenase-2 選択的阻害剤である NS-398 (10⁻⁶ M; Merck) 添加・非添加の条件で、Flexercell strain unit (Dunn Labortechnik GmbH) にて 18%, 6 cycle/min の TF を 48 時間負荷し、その後静置培養した。

試料は対象群 (Control 群), NS-398 を添加した対象群 (Control+NS 群), 18% の TF を負荷した群 (18% TF 群), NS-398 を添加後 18% の TF を負荷した群 (18% TF+NS 群) とした。TF 負荷後 1, 4, 7 日目に細胞を Trizol reagent (Gibco) にて回収し、細胞から全 RNA を抽出後、逆転写酵素により mRNA から cDNA を作成し real-time PCR 法にて骨形成関連因子である BMP-2, Runx2, Msx2 の遺伝子発現について検討した。培養 14 日目に 0.5 M HCl 添加により石灰化物を溶解、回収後、Calcium E-Test kit (Wako) を用いて Ca²⁺量を定量した。培養 21 日目に 4%ホルムアルデヒドにて細胞の固定を行った後、5%硝酸銀液、3%チオ硫酸ナトリウム液を用いて von Kossa 染色を行った。染色後各 well をデジタルカメラ (GX200 ; Ricoh) にて撮影し、約 5.7 倍に拡大して最も小さい bone nodule の大きさを基準として 3 群; S サイズ: 直径 180-359 μ m, M サイズ: 直径 360-719 μ m, L サイズ: 直径 720-1620 μ m に分類し、各群の bone nodule 数の比較検討を行った。また bone nodule の面積は、撮影した各 well の画像を ImageJ ソフトウェア (NIH) にて閾値 60 で二値化し、閾値 0 から 60 の範囲の面積を計測し比較検討した。

はじめに、calvarial cell における 18% TF 負荷後の bone nodule 数、大きさ、Ca²⁺量に与える影

響を検討した。S サイズ bone nodule 数は Control 群と 18% TF 群で有意差はなかったが、M および L サイズ bone nodule 数は Control 群は 310 個であったが 18% TF 群では 87 個となり、nodule の数は有意に減少した。また Ca^{2+} も 18%TF 負荷により有意に減少し、Control 群と比較し 42% となった。次に、18% TF 負荷の骨形成関連因子の遺伝子発現に与える影響について検討した。BMP-2, Runx2, Msx2 発現は TF 負荷後 1, 4 日目において Control 群と比較して有意に減少し、BMP-2 発現は 1 日目で 43%, 4 日目で 51%, Runx2 発現は 1 日目で 39%, 4 日目で 37%, また、Msx2 発現は 1 日目で 50%, 4 日目で 64% であった。以上のことから、18% TF 負荷は骨形成関連因子の遺伝子発現の低下を介して骨芽細胞の分化を抑制しており、さらに TF 負荷の影響は負荷後 4 日間以上持続されることが示唆された。

さらに、TF により産生される PGE_2 の骨形成や骨形成関連因子に与える影響について検討した。18% TF 負荷により産生される PGE_2 を ELISA 法で定量したところ、その産生量は有意に増加し、NS-398 添加により Control 群と同レベルまで減少した。また bone nodule 面積は 18% TF 負荷により減少し NS-398 添加により Control 群と同レベルまで回復した。さらに 18% TF 負荷により減少した BMP-2, Runx2, Msx2 発現も NS-398 添加により回復し、Runx2 と Msx2 発現は Control 群と同レベルとなった。以上の結果より 18% TF 負荷により産生された PGE_2 は骨芽細胞の骨形成関連因子の発現を低下させることで分化を抑制することが示唆された。

本研究では、強い MS が骨芽細胞分化に与える影響について明らかにし、さらに強い MS により産生される炎症促進因子 PGE_2 が骨形成関連因子 (BMP-2, Runx2, Msx2) の発現を低下させることにより骨芽細胞分化を抑制することが示唆された。このことより矯正治療時における過度な矯正力負荷は周囲歯槽骨骨形成を抑制する可能性が示唆された。