



Title	周期的圧縮刺激に対する口腔粘膜由来線維芽細胞の細胞応答が破骨細胞活性に及ぼす影響
Author(s)	明石, 喜裕
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58465
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

うリンパ管新生の亢進が口腔癌の頸部リンパ節転移に深く関与することが明らかとなった。

以上の研究結果は、口腔癌のリンパ節転移の病態および分子メカニズムの理解を深め、また効果的な分子標的治療法の開発にも寄与するものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。

【14】

氏 名	あか 明 石 喜 裕
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 2 4 4 7 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	周期的圧縮刺激に対する口腔粘膜由来線維芽細胞の細胞応答が破骨細胞 活性に及ぼす影響
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 矢 谷 博 文 (副査) 教 授 阪 井 丘 芳 准教授 西 村 理 行 講 師 佐 藤 淳

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

顎堤吸収は、義歯の維持、安定を困難にするばかりでなく、インプラント治療の可否やその審美性にも影響を及ぼすため、補綴歯科臨床において古くより日常的に直面する難題である。顎堤吸収は単純に一つの因子によって引き起こされるものではないと考えられており、これまでに報告されている顎堤吸収の因子は、解剖学的因子、補綴装置/力学的因子、骨代謝/全身的因子、遺伝的因子に大別される。これらの因子の中で、可徹式補綴装置の加圧による機械的刺激は、顎堤吸収を誘発する重要な因子の一つと考えられているが、機械的刺激と顎堤吸収を結びつける分子生物学的な機構はいまだ不明である。

近年、骨組織の周囲に存在する免疫応答細胞の産生因子が破骨/骨芽細胞を制御する機構（骨免疫）が注目されている。歯槽骨の周囲に存在する口腔粘膜は

免疫応答性の高い組織である。したがって、骨免疫学的な視点から捉えると、機械的刺激に対する口腔粘膜の産生因子は、歯槽骨表面の破骨細胞の活性化に影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究の目的は、口腔粘膜細胞に対する圧縮刺激が、骨免疫制御機構として破骨細胞の活性に影響を及ぼしている可能性を *in vitro* で探ることである。

〔方法〕

細胞に圧力を負荷するために、細胞培養チャンバー内の内圧を制御することで周期的圧縮刺激（16.7 mHz, 50 kPa）を負荷する「培養細胞圧縮装置」を作製した。この装置内にヒト初代歯肉線維芽細胞（hGF）またはヒト正常骨芽細胞（hOB）を培養し、破骨細胞の分化誘導因子である RANKL および分化阻止因子である osteoprotegerin（OPG）の発現を、real-time RT-PCR 法、ELISA 解析にて検討した。また、圧縮刺激を負荷した hGF が破骨細胞活性に及ぼす影響検討するために、hGF と破骨前駆細胞株（RAW 細胞）の共培養を行った。さらに、hGF および hOB を 24 時間圧縮培養した上清を用いて RAW 細胞を培養し、破骨細胞分化に必須である NFAT 活性を指標としたレポーターアッセイ、TRAP 染色および骨吸収活性評価を行った。

次に、IL-1 β 、IL-6、IL-8 および MCP-1 の発現を、real-time RT-PCR 法、ELISA 解析にて検討した。また、hGF を静的あるいは圧縮培養した培養上清中の分泌タンパク質の網羅的比較解析を、10 種類の炎症性サイトカインおよび 274 種類のサイトカイン関連因子を対象としたプロテインアレイを用いて行った。さらに、検出された圧縮刺激誘導性因子のリコンビナントタンパク質を、RAW 細胞に添加し、細胞の NFAT 活性あるいは TRAP 活性を評価した。

〔結果および考察〕

RANKL 遺伝子発現は、hOB では恒常的であり、hGF では検出されなかった。一方、hGF は hOB と比較して著明に高い OPG 遺伝子の発現を示した。hGF はタンパク質レベルでも OPG を高発現しており、その発現は圧縮培養によって有意に減少した（ $P < 0.01$ ）。hOB における RANKL および OPG の遺伝子発現量は、圧縮培養によって有意な変化を示さなかった。

また、hGF の圧縮培養後に RAW 細胞と共培養の結果、静的培養後と比較して、TRAP 陽性多核細胞数が約 2.5 倍に増加した（ $P < 0.01$ ）。また、hGF の圧縮培養上清は静的培養上清と比較して、RAW 細胞の NFAT 活性、TRAP 活性および骨吸収活性をいずれも有意に促進した（ $P < 0.01$ ）。hOB の圧縮培養上清は同様の破骨細胞活性作用を示し、その作用は hGF の場合よりも強かった。

Real-time RT-PCR 法の結果、hGF は圧縮培養 3 時間以内に IL-1 β 、IL-6 および

IL-8の発現を亢進し、24時間以内にMCP-1の発現を亢進した ($P<0.01$)。プロテインアレイ解析の結果、圧縮刺激によってhGFが分泌を亢進した因子として、IL-1 β , IL-8, MCP-1, IL-1R2, IL-28A, IGFBP-2, Dcorin, SDF-1 β , PDGF-BB, CD40, HVEMを検出した。また、IL-8, MCP-1, Decorinは、RAW細胞のNFATあるいはTRAP活性を有意に促進し ($P<0.01$)、IL-28A, PDGF-BB, CD40はRAW細胞のNFAT活性を有意に抑制した ($P<0.01$)。

以上の結果から、hGFに対する圧縮刺激はOPGの産生を抑制する一方で、破骨細胞を活性化するIL-8, MCP-1などのサイトカイン産生を促進することが明らかとなった。また、非刺激負荷環境におけるhGFはOPGを恒常的に高発現していることから、hGFは本来の生理的状态の顎堤では破骨細胞活性に対して抑制的な作用を有している可能性がある。しかしながら、顎堤に義歯を介した過度の負担がかかり、この負荷がhGFの細胞応答を惹起するメカニカルストレスとなると、顎堤の骨免疫制御機構がOPGの産生低下などを介して病理的状态に陥り、その結果破骨細胞を活性化する環境に傾いている可能性が示唆された。今後、顎堤吸収機構をより詳細に解明することによって顎堤吸収因子をターゲットした予防・治療方法の開発へと発展することが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、口腔粘膜細胞に対する圧縮刺激が、骨免疫制御機構として破骨細胞の活性に影響を及ぼしている可能性を *in vitro* で探ることを目的として行った。

その結果、歯肉線維芽細胞 (hGF) に対する圧縮刺激は、破骨細胞分化抑制因子であるOPGの産生を抑制する一方で、破骨細胞を活性化するIL-8, MCP-1などのサイトカイン産生を促進することが明らかとなった。このことより、圧縮刺激がhGFの細胞応答を惹起するメカニカルストレスとなると、顎堤の骨免疫制御機構がOPGの産生低下などを介して病理的状态に陥り、その結果破骨細胞を活性化する環境に傾く可能性が示唆された。

以上の結果は、顎堤吸収機構をより詳細に解明する一助となり、顎堤吸収因子をターゲットした予防法ならびに治療法の開発へと発展することを示唆するものであり、博士 (歯学) の学位取得に値するものと認める。