

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

森 寛典

論文題目

ラットの歯髄由来の培養上清は破骨細胞前駆細胞の
接着を抑制することで破骨細胞数を減少させる

I. 緒言

歯髄は周囲のエナメル質、象牙質、セメント質により口腔内細菌からの感染を防御している。歯の硬組織がう蝕により破壊されると、細菌が歯髄に侵入し、炎症を引き起こす。炎症状態が持続した結果、歯髄が失活し、根尖部に骨吸収が起こることがある。

歯髄では、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、TRPV1、MMP-9、血管内皮増殖因子受容体 (VEGFRs) などの遺伝子が発現していることが知られている。またこれらの遺伝子が根尖病巣の形成に関与していることが報告されている。例えば、歯髄中の TRPV1 を発現しているニューロンの除去により、根尖周囲の骨破壊が引き起こされた。また、MMP-9 ノックアウトマウスでは野生型と比較して、根尖病巣が大きくなるという報告もある。さらに、マウスに VEGFR-2 に対する阻止抗体を投与すると、歯髄曝露により引き起こされる根尖病巣がより大きくなったとの報告もある。

歯髄は細胞外マトリックス、神経、毛細血管、種々の細胞で構成されている。構成する細胞の多くは線維芽細胞であるが、マクロファージ、樹状細胞、リンパ球などの免疫細胞も存在する。マクロファージは RANKL 及びマクロファージコロニー刺激因子 (M-CSF) の存在下で多核破骨細胞に分化する。しかし、歯髄が破骨細胞形成に及ぼす影響はほとんど報告されていない。そこで本研究では、ラット歯髄由来の培養上清 (以下 CM) が破骨細胞形成に及ぼす影響を検討した。CM による破骨細胞形成への影響を

評価するために、破骨細胞前駆細胞を RANKL 存在下で CM の添加あるいは非添加で培養した後、TRAP 染色を行い、多核破骨細胞数を測定した。また、破骨細胞前駆細胞における CM の効果を評価するために、破骨細胞前駆細胞を RANKL 非存在下で CM の添加あるいは非添加で培養した後、接着細胞及び浮遊細胞の数を測定した。CM による破骨細胞前駆細胞の接着能への影響を、定量的リアルタイム PCR を用いて、細胞接着に関与する遺伝子である FAK と paxillin の mRNA の発現レベルで評価した。

2. 実験材料及び方法

1. 動物

日本エスエルシーより 6 週齢 Wistar 系ラットを購入し、骨髄細胞及び歯髄を採取した。動物実験のプロトコールは、愛知学院大学動物実験委員会の承認を受けた。(承認番号: AGUD320)

2. 細胞培養

8 週齢雄性ラットの大腿骨及び脛骨から単離した骨髄細胞をペニシリン、ストレプトマイシン及び 10% ウシ胎仔血清 (FBS) を含む α MEM で培養した。培養は加湿インキュベーター内で 37°C、5% CO₂ 存在下で行った。

3. 骨髄細胞からの破骨細胞前駆細胞調整及び破骨細胞誘導

骨髄細胞を 10 ng/ml の M-CSF 存在下で 72 時間培養し、接着している細胞を破骨細胞前駆細胞として使用した。続いて、これらの細胞を 10 ng/ml の M-CSF 及び 50 ng/ml の RANKL 存在下で培養して破骨細胞へ誘導した。

4. ラットの歯髄及び尾部からの CM の作成

雄性ラットの上顎切歯から歯髄を単離した。また皮膚を取り除いた尾部を歯髄と同じ長さで切断した。歯髄及び尾部を、10% FBS 及び抗生物質を含む α MEM で 72 時間培養した。その培養上清を回収し、1000 rpm で 5 分間遠心分離した。その後、その上清を、0.22 μ m の細孔フィルターに通したものを CM として、各々の実験で使用した。

5. TRAP 染色

骨髄細胞由来の破骨細胞前駆細胞を M-CSF 及び RANKL 存在下で CM の添加あるいは非添加で 72 時間培養後、TRAP 染色を行った。3 つ以上の核を持つ TRAP 陽性細胞を TRAP 陽性の多核細胞として、その数を計測した。

6. 定量的リアルタイム PCR

RNeasy Plus mini kit 及び RNeasy Micro kit を用いて全 RNA を抽出した。逆転写は、high-capacity cDNA reverse transcription kit を用いて行った。定量的リアルタイム PCR は THUNDERBIRD SYBR qPCR mix kits を用いて、TaKaRa Thermal Cycler Dice Real Time System III にて行い、NFATc1、TRAP、FAK 及び paxillin の mRNA の発現レベルを評価した。その際、GAPDH を内部標準として各遺伝子の発現量を補正した。

7. 統計分析

得られた実験データは平均値と標準偏差で示し、統計的な有意差の検定

には Student の t 検定を使用した。 $p < 0.05$ を統計的有意差ありと判定した。

2. 結 果

1. 歯髄由来の CM による破骨細胞形成への影響

本研究の目的は破骨細胞形成に対する歯髄由来の CM の影響を評価することである。我々は、RANKL 群 (10% FBS)、RANKL 及び歯髄由来の CM 群 (2% または 10% FBS + CM 中に残存する FBS) について TRAP 染色を行った。その結果、RANKL 群と比較して RANKL 及び歯髄由来の CM 群では、その血清の濃度に関わらず TRAP 陽性の多核破骨細胞数が有意に減少した。このため、以下の実験では、RANKL 群 (10% FBS)、RANKL 及び歯髄由来の CM 群 (10% FBS + CM 中に残存する FBS) を使用した。また、この阻害効果が歯髄特異的なものであるかを明らかにするために、ラットの尾部由来の培養上清を作成して、同様に実験を行った。その結果、RANKL 及び歯髄由来の CM 群では、TRAP 陽性の多核破骨細胞数が有意に減少したが、RANKL 及び尾部由来の培養上清では、その細胞数は、減少しなかった。続いて、歯髄由来の CM の濃度を変化させ、同様に実験を行った。その結果、TRAP 陽性の多核破骨細胞数は歯髄由来の CM 濃度依存的に減少した。

2. 歯髄由来の CM による破骨細胞分化関連遺伝子への影響

歯髄由来の CM が破骨細胞数を抑制した原因を明らかにするため、破骨細胞分化関連遺伝子である NFATc1 及び TRAP の mRNA の発現レベルを

測定し、破骨細胞分化への影響を検討した。その結果、歯髄由来の CM は RANKL で誘導された NFATc1 及び TRAP (CM 添加 48 及び 72 時間後) の mRNA レベルに影響を及ぼさなかった。

3. 歯髄由来の CM による破骨細胞前駆細胞への影響

歯髄由来の CM が破骨細胞への分化に影響を及ぼさなかったため、次に、CM による破骨細胞前駆細胞への影響を検討した。まず、初めに細胞形態への影響を検討した結果、歯髄由来の CM により突起を持った細胞が減少した。次に、接着細胞と浮遊細胞数を測定した結果、生細胞では歯髄由来の CM によって浮遊細胞数の増加、接着細胞数の減少が認められた。一方で、死細胞では接着細胞、浮遊細胞ともに影響は認められなかった。以上の結果より、歯髄由来の CM が破骨細胞前駆細胞の接着能を低下させる可能性が示されたので、細胞接着に関与することが知られている FAK、paxillin の発現の変化を検討した。その結果、歯髄由来の CM が FAK (CM 添加 24 及び 48 時間後) と paxillin (CM 添加 48 時間後) の遺伝子発現を抑制した。

2. 考 察

本研究では、歯髄由来の CM が TRAP 陽性の多核破骨細胞数を減少させることを示した。しかし、歯髄由来の CM は NFATc1 及び TRAP の mRNA レベルには影響を及ぼさなかった。本実験の結果は、歯髄由来の CM は、破骨細胞の分化には直接影響を及ぼさないが、破骨細胞前駆細胞の接着能

を低下させることで、その細胞数を減少させ多核破骨細胞数を減少させることを明らかにした。また、歯髄由来の CM が TRAP 陽性の多核破骨細胞数を減少させた原因として、CM 中の血清濃度の低下が考えられたため、血清濃度が異なる 2 種類の CM 群 (2% FBS + CM 中に残存する FBS または 10% FBS + CM 中に残存する FBS) を作成し、解析を行った。その結果、培地の血清の濃度に関わらず、TRAP 陽性の多核破骨細胞数は減少した。

歯髄由来の CM は、破骨細胞前駆細胞における FAK 及び paxillin の mRNA の発現レベルを低下させた。FAK は、様々な細胞においてその接着、増殖及び細胞骨格の再編成に関与することが知られている。例えば、骨芽細胞様細胞の MC3T3-E1 細胞では FAK のノックダウンにより、細胞形態が丸くなり、増殖、接着、移動、及び分化能の低下が認められることが報告されている。また、ミエロイド特異的 FAK ノックアウトマウスの解析で、FAK のノックダウンが破骨細胞による骨吸収の減少をもたらすことが明らかになった。さらに、Owen らは、FAK がマクロファージのラメリポディア形成、接着、及び運動を調節することを報告している。paxillin もまた、細胞移動、接着、伸展を調節することが知られていて、マクロファージにおいてアクチン再編成を制御したり、その細胞の伸展を促進することが報告されている。さらに、破骨細胞においてはポドソームリングの構成に paxillin が必要であることも報告されている。以上の報告から、歯髄由来の

CMによる破骨細胞前駆細胞における FAK 及び paxillin の発現量の低下が細胞接着の減弱を引き起こすことが示唆される。

骨や歯髄の再生、局所脳虚血や糖尿病の研究において、DPSC や脱落した乳歯由来の CM は、強力なツールとなることが多数報告されている。さらに、DPSC から分泌される因子についての解析も行われている。DPSC 由来の CM 中の TGF- β 1 や FGF-2 は、ベース樹脂の TEGDMA による細胞傷害を抑制することが報告されている。Bronckaers らは、VEGF、MCP-1、PAI-1 や endostatin などの様々な血管新生関連分子が DPSC 由来の CM 中に認められることを報告している。Piva らは、IGFBP-3、pentraxin3、セルピン E1、セルピン F1、thrombospondin 1、tissue inhibitor of metalloproteinase-1 や VEGF が DPSC 由来の CM 中に含まれていることを報告している。ヒト臍帯静脈内皮細胞において、IGFBP-3 は、FAK の発現量を低下させることで細胞接着を阻害することが報告されている。本研究では、我々は、歯髄由来の CM が細胞接着を抑制し、FAK 及び paxillin の mRNA レベルを低下させることを明らかにしたが、FAK 及び paxillin の減少や細胞接着の抑制に関与する CM 中の特定の分子を同定するためにはさらなる解析が必要である。

2. 結 論

本研究により歯髄由来の CM が、TRAP 陽性の多核破骨細胞数を減少させることが示された。その CM による破骨細胞数の減少は、破骨細胞前駆

(論文内容の要旨)

No. 8

愛知学院大学

細胞の接着能の低下によってもたらされた。今後多くの基礎データの蓄積が必要であり、将来的には抜歯した歯髄由来の CM を全身投与することにより、骨粗鬆症などの治療薬に応用できる可能性が考えられる。