

Title	Mechanical force promotes proliferation and early differentiation of bone marrow derived osteoblast-like cells in vitro
Author(s)	内藤, 薫
Journal	歯科学報, 109(6): 616-617
URL	http://hdl.handle.net/10130/1881
Right	

氏名(本籍)	ないとう かおる 内藤 薫 (千葉県)
学位の種類	博士(歯学)
学位記番号	第1718号(甲第1001号)
学位授与の日付	平成19年3月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Mechanical force promotes proliferation and early differentiation of bone marrow derived osteoblast-like cells <i>in vitro</i>
掲載雑誌名	Oral Medicine & Pathology 第13巻 151~157頁 2009年
論文審査委員	(主査) 石上 恵一教授 (副査) 山口 秀晴教授 井上 孝教授 木崎 治俊教授 下野 正基教授

論文内容の要旨

1. 研究目的

骨は様々なメカニカルストレスにより維持されており、これらのバランスの崩れは骨の異常増殖や吸収につながる。*In vivo*, *in vitro*において重力、緊張、圧縮、および剪断応力を使用することでストレスに対する細胞の反応が研究されてきたが、早期骨形成能に關しての解析は少ない。そこで本研究は、遠心力負荷に対する骨芽細胞の動態を検索するため、細胞増殖率、形態学的観察、HSP27、1型コラーゲンおよびALPのm-RNA発現を検討した。

2. 研究方法

骨芽細胞様細胞は、Maniopoulos(1988)に準じて行った。まず、Sprague-Dawley系5週齢の雄ラット(体重約100g)10匹から骨髓を採取し、5日間初代培養した。その後、35mm培養皿におよそ 3.0×10^4 個の細胞を播種し、2日間培養した。次いで、培養液を除去せず、培養皿ごと600(7.52g/cm², 0.738kPa), 4,800rpm(482g/cm², 47.2kPa)の条件でそれぞれ20分間遠心力を付与した。遠心力を負荷しないものをコントロールとした。遠心力負荷後、再び同条件下にて培養を続けた。遠心直後の細胞は走査型電子顕微鏡にて観察した。HSP27および1型コラーゲン、ALPのm-RNA発現は、LightCycler™(Roche Molecular Biochemicals)の定量RT-PCR法による解析を行なった。HSP27 mRNAの定量は遠心直後・3・6時間後、また細胞増殖数・1型コラーゲン・ALP mRNAの発現は遠心直後・1・3・5および7日後の検索を行った。なお、全てのデータは一元配置分散分析を行い、Scheffeによる検定を用いて統計分析を行った。

3. 研究成績および結論

形態観察では、コントロール群は紡錘形を呈し核の膨隆が見られ、細胞周囲に数多くの微小突起を認めた。実験群は、多角形に変形し、微小突起の減少と核の膨隆がほとんどなく扁平化し、細胞周囲の突起の数が減少した。遠心直後の細胞数は、実験群が対照群に比べ約3割減となったが、3日目において4,800rpm群は、他群に比べ有意に高い値を示した。HSP27 mRNAは、実験群がコントロールより有意に多く発現していた。また、1型コラーゲンとALP mRNAの発現は、実験群がコントロールに比べ、早期に見られた。以上のことから、力学的負荷として培養骨芽細胞様細胞に遠心力を付与すると、数時間後にHSP27の発現が増加し、力

に対して恒常性を維持していることが示唆された。遠心力により細胞形態が変化し分化を促進させ、骨形成の活性を高めることが示唆された。600rpmと4,800rpmを比較すると、培養骨芽細胞様細胞の機能発現や細胞増殖率が異なり、圧力により調節ができると考えた。以上より、600rpmと4,800rpmの遠心力は、細胞の形態変化を引き起こし、恒常性維持しながら、ラット培養骨芽細胞様細胞の分化の初期を促進し、遠心力の違いによって調節することができると示唆された。

論文審査の要旨

本審査委員会は、平成19年1月25日に行われ、まず内藤大学院生より以下の内容の説明があった。様々なメカニカルストレスには生体の機能や構造を決める作用があることが知られている。特に骨は体の支持組織であることから、骨量と形態の維持という恒常性に対して、メカニカルストレスは大きな影響を及ぼしている。本研究では、ラット骨芽細胞様細胞に600rpm、4,800rpmの遠心力をそれぞれ20分間付与し、SEMを用いて形態観察、細胞増殖率、RT-PCRによるHSP27、I型コラーゲン、ALPのmRNAの発現を検討することとした。コントロール群は、経時的に細胞増殖をし、形態は核の膨隆が認められた一方、600rpm実験群は、コントロール群と同様の細胞増殖率を示し、4,800rpmの実験群は3日目において最も高い値を示した。また、両実験群ともに、核の扁平化が認められ、I型コラーゲン、ALPのmRNAの発現がコントロール群と比較して早期に発現を示した。

以上、本研究の実験条件下遠心力は、細胞形態を変化させ、ラット骨芽細胞様細胞の早期の骨分化を促進させ、異なった遠心力により、増殖、分化を調節することが示唆された。

内容説明に引き続き審査員より、1) 遠心力の設定、2) 骨芽細胞の分化指標について、3) 細胞増殖が遠心直後に減少した理由とその評価、4) 遠心直後による機能発現と形態との関連性について、5) ラット培養骨芽細胞様細胞について、などの質問があり、1) 文献的なことから、600rpmは通常の矯正力、4,800rpmは急速拡大時の矯正力を想定し設定した、2) 本来、骨芽細胞の分化指標としてOPN、OCN、RANX2も、検索するものだが、本研究において早期骨分化に局限しI型コラーゲンとALPについて検討を行った、3) 遠心直後は回転による細胞が培養皿より一部剥離したと考えられ、評価は相対値を示した、4) 細胞形態変化が核内の転写遺伝子発現を促進することから、SEMにより形態観察を行った、5) 本法は培養骨芽細胞として1988年より確立されたものを使用したと適切な解答が得られた。また、英文表記、ならびに図についての記載などを修正すべき点が指摘され、訂正が行われた。

以上により、本研究で得られて結果は、今後の歯学の進歩発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定された。