

ふりがな氏名	はやし ひろし 林 寛
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 733 号
学位授与の日付	平成 26 年 3 月 7 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学位論文題目	Effect of VCAM-1 on the differentiation into osteoclast (破骨細胞分化における VCAM-1 の影響)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Tissue Engineering 第 11 巻 第 2 号 平成 25 年 12 月 30 日
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 池尾 隆 教授 副査 武田 昭二 教授

#### 論文内容要旨

骨リモデリング機序において、マクロファージなどの破骨前駆細胞は重要な役割を担っている。マクロファージは、ケモカインやサイトカインなどにより活性化されたインテグリンなどの接着分子の影響により Focal adhesion kinase (FAK) が活性化されることが知られている。また、Vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) は  $\beta$ 1-インテグリンの一種である VLA-4 (very late antigen-4) に結合して VLA-4 を発現しているマクロファージ・単球・好酸球との接着、分化、増殖に関与していることが知られている。そこで我々は、VCAM-1 における破骨細胞分化の制御機構を明らかにするため、以下の実験を行い検討した。

VCAM-1 は濃度依存的に RAW264.7 細胞の破骨細胞分化を促進した。RANKL 刺激により FAK (Py576) のリン酸化が見られ、VCAM-1 によりそのリン酸化は増強された。VCAM-1 により促進された破骨細胞分化は、 $\alpha$ 4 中和抗体により抑制された。VCAM-1 により増強された FAK (Py576) のリン酸化は、 $\alpha$ 4 中和抗体により抑制された。

以上の結果より、RAW264.7 細胞において RANKL と VCAM-1 の共刺激による破骨細胞分化の促進には、インテグリン  $\alpha$ 4 および FAK (Py576) が関与している可能性が示唆された。

#### 論文審査結果要旨

本研究は RAW264.7 細胞の破骨細胞分化における VCAM-1 の影響について検討したものである。

分化実験において、96well plate に VCAM-1 の固層化を行い 1%BSA にてブロッキングを行った後、RAW264.7 細胞を  $3.0 \times 10^3$  cells/well ずつ播種し、37°C、5%CO<sub>2</sub> 条件下にて培養後、RANKL 濃度 50ng/ml で刺激を行った。3 日間培養後、10%ホルマリン、アセトン：エタノール(1:1)にて固定を行い、酒石

酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行い、TRAP 陽性かつ多核化した破骨細胞の観察を行った。また  $\alpha 4$  中和抗体にて RAW264.7 細胞をプレインキュベートし、同様の条件での分化実験も行った。Western Blotting において、VCAM-1 を固層化し RAW264.7 細胞を RANKL (50ng/ml) にて 30 分刺激を行い FAK のリン酸化を Western Blotting で確認した。また、 $\alpha 4$  中和抗体を用いて同様に Western Blotting を行った。PBS (-) にて洗浄後 sample buffer (0.0625M tris-HCl (pH6.8)、2% SDS、15% glycerol、5% 2ME) を加えて、99°C で 3 分間ボイルし、泳動用試料とした。等量の試料を 8% SDS-PAGE に供し、PVDF メンブレンに転写した。PVDF メンブレンにリン酸化特異的 1 次抗体、HRP 標識 2 次抗体を反応させ、X 線フィルムにて感光させ現像した。同一メンブレンを WB stripping solution strong で処理し、1 次抗体を用いて同様に検出した。

これらの実験結果として、VCAM-1 は濃度依存的に RAW264.7 細胞の破骨細胞分化を促進した。また、RANKL 刺激により FAK (Py576) のリン酸化が見られ、VCAM-1 によりそのリン酸化は増強された。さらに、VCAM-1 により促進された破骨細胞分化は、 $\alpha 4$  中和抗体により抑制された。また、VCAM-1 により増強された FAK (Py576) のリン酸化は、 $\alpha 4$  中和抗体により抑制された。

以上の結果より、RAW264.7 細胞において RANKL と VCAM-1 の共刺激による破骨細胞分化の促進には、インテグリン  $\alpha 4$  および FAK (Py576) が関与している可能性が示された点において、本論文は博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。