

ふりがな氏名	おおはし ももか 大橋 百加
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	甲 第 747 号
学位授与の日付	平成 27 年 3 月 6 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	Coordinated effect of IL-17A and IL-27 on osteoclast differentiation of RANKL-stimulated RAW264.7 cells (RANKL 刺激による RAW264.7 細胞の破骨細胞分化における IL-17A と IL-27 の協調効果)
学位論文掲載誌	Journal of Osaka Dental University 第 49 巻 第 1 号 平成 27 年 4 月
論文調査委員	主査 松本 尚之 教授 副査 西川 泰央 教授 副査 池尾 隆 教授

論文内容要旨

矯正歯科治療では、歯に矯正力が加わることにより歯の移動が起こることはよく知られている。この際、歯槽骨の圧迫側では破骨細胞による骨吸収が、牽引側では骨芽細胞による骨添加が生じて歯が移動する。破骨細胞前駆細胞は、骨芽細胞など receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を発現した細胞との細胞間相互作用により破骨細胞へと分化が誘導される。われわれは以前、IL-17A の RAW264.7 細胞に対する直接的な作用により、RANKL 刺激による破骨細胞分化を抑制することを報告した。また、IL-27 は破骨細胞前駆細胞に直接的に作用して破骨細胞分化を抑制することが知られている。今回、破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する IL-17A と IL-27 の協調効果について検討した。

IL-17A と IL-27 の破骨細胞分化に対する影響を酒石酸塩抵抗性ホスファターゼ (TRAP) 染色にて検討した。RAW264.7 細胞 (3×10^3 cells/well) を 96-well plate に播種し、各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えて 72 時間培養後、TRAP 染色液にて染色し、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞としてカウントした。その結果、RANKL 刺激により破骨細胞分化が誘導された。この破骨細胞分化は IL-17A と IL-27 の単独刺激によりわずかに抑制され、IL-17A と IL-27 の協調効果により有意に抑制された。次に、RAW264.7 細胞 (3×10^3 cells/well) を 96-well plate に播種し、各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えて 72 時間培養後、細胞増殖試薬 WST-1 と反応させ、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。その結果、RANKL 刺激による RAW264.7 細胞の細胞増殖能に IL-17A と IL-27 は影響を与えなかった。さらに、RAW264.7 細胞 (1×10^6 cells/sample) に各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えた後、細胞を可溶化しサンプルを作製して、ウェスタンブロット法にてリン酸化 JNK の

検出を行った。RANKL 刺激により JNK のリン酸化は増強したが、この RANKL 刺激による JNK のリン酸化は IL-17A と IL-27 の単独刺激ではほとんど減弱しなかった。しかし、IL-17A と IL-27 の協調効果により RANKL 刺激による JNK のリン酸化増強は減弱した。

以上の結果より、RAW264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞分化は IL-17A と IL-27 の協調効果により抑制されることを確認した。この破骨細胞分化抑制は、細胞増殖抑制によるものではなく破骨細胞分化シグナル抑制によるものである可能性が示唆された。また、IL-17A と IL-27 の協調効果による破骨細胞分化シグナルの抑制には、JNK のリン酸化抑制が関与している可能性が示唆された。

論文審査結果要旨

本研究では、破骨細胞前駆細胞である RAW264.7 細胞の破骨細胞分化に対する IL-17A と IL-27 の協調効果について検討した。

RAW264.7 細胞表面上における受容体の確認を行った。RAW264.7 細胞 (1×10^5 cells/well) を 12-well plate に播種し RANKL 刺激を加え 24 時間培養した。細胞を回収し、各種蛍光標識抗体で染色し、FACSCalibur にて IL-17RC と IL-27R α の蛍光反応を確認した。RAW264.7 細胞において IL-17RC と IL-27R α が発現していることを確認した。また、細胞内に加わる IL-17A と IL-27 の刺激の強度は RANKL 刺激の有無で変化がないことが示された。IL-17A と IL-27 の破骨細胞分化に対する影響を酒石酸塩抵抗性ホスファターゼ (TRAP) 染色にて検討した。RAW264.7 細胞 (3×10^3 cells/well) を 96-well plate に播種し、各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えて 72 時間培養後、TRAP 染色液にて染色し、3 核以上の TRAP 陽性細胞を破骨細胞としてカウントした。その結果、RANKL 刺激により破骨細胞分化が誘導された。この破骨細胞分化は IL-17A と IL-27 の単独刺激によりわずかに抑制され、IL-17A と IL-27 の協調効果により有意に抑制された。次に、細胞増殖試験を行った。RAW264.7 細胞 (3×10^3 cells/well) を 96-well plate に播種し、各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えて 72 時間培養後、細胞増殖試薬 WST-1 と反応させ、マイクロプレートリーダーにて吸光度を測定した。その結果、RANKL 刺激による RAW264.7 細胞の細胞増殖能に IL-17A と IL-27 は影響を与えなかった。さらに、RAW264.7 細胞 (1×10^6 cells/sample) に各種刺激 (RANKL、IL-17A および IL-27) を加えた後、細胞を可溶化しサンプルを作製して、ウェスタンブロット法にてリン酸化 JNK の検出を行った。RANKL 刺激により JNK のリン酸化は増強したが、この RANKL 刺激による JNK のリン酸化は IL-17A と IL-27 の単独刺激ではほとんど減弱しなかった。しかし、IL-17A と IL-27 の協調効果により RANKL 刺激による JNK のリン酸化増強は減弱した。

以上の結果より、RAW264.7 細胞の RANKL 刺激による破骨細胞分化は IL-17A と IL-27 の協調効果により抑制されることを確認した。この破骨細胞分化抑制は、細胞増殖抑制によるものではなく破骨細胞分化シグナル抑制によるものである可能性が示唆された。また、IL-17A と IL-27 の協調効果による破骨細胞分化シグナルの抑制には、JNK のリン酸化抑制が関与している可能性が示唆された。

以上のことから、今後研究を進めていくことにより歯科矯正において重要な破骨細胞の分化抑制における作用機序の解明を行える点において、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。