

## 論文内容の要旨

論文提出者： 鈴木 奈月

論文題目： A threshold of mechanical strain intensity for the direct activation of osteoblast function exists in a murine maxilla loading model

(和名：破骨細胞の活性を喚起する力学的歪み閾値の存在

—マウス上顎骨荷重モデルにおける検証研究—)

### <要旨>

義歯などの補綴装置によって骨内部に生じる骨形成が、同じ部位に荷重によって生じた微小歪みの大きさとどのような因果関係があるかは明らかでない。本研究の目的は、マウス上顎骨荷重モデルを用い、口腔粘膜を介した機械的な荷重が同部の骨形成に及ぼす影響、特に、骨芽細胞による骨形成を亢進させる力学的歪みの閾値を明らかにすることである。実験では、13週齢・雄・C57BL/6Jを使用した。191 kPaの荷重をマウス上顎骨・硬口蓋部に、1日30分間・7日間連続で与え、7回目の荷重後に屠殺した。上顎骨全体の $\mu$ CT撮影データより力学モデルを構築し、かつ、非脱灰切片で組織形態計測を行った。荷重から離れた部位(AWAY)と荷重直下部位(NEAR)に計測部位を設定した。荷重により、炎症性スコアはAWAYにおいて増加し、NEARでは増加しなかった。骨形成阻害タンパクであるスクレロシン発現骨細胞と歪み分布との重ね合わせ技術により、AWAYでは $150\mu\epsilon$ 以上の歪みが生じた範囲でスクレロシン発現骨細胞が有意に減少したが、NEARでは減少しなかった。AWAYの中でも約 $170\mu\epsilon$ の歪みが生じた骨表面では骨芽細胞の石灰化能力を示す骨石灰化速度が増大したが、約 $80\mu\epsilon$ の歪みが生じた骨表面では変化しなかった。以上より、マウス上顎骨荷重モデルを用いた実験から、機械的刺激による歪みによって骨芽細胞の骨形成能が活性化され、骨芽細胞を直接的に活性化する力学的歪みの閾値の存在が示唆された。

### <諸言>

骨形成は、骨の再石灰化によって骨基質を生産することによって行われる。生体内での骨形成の活性化の程度は、骨形態計測法における蛍光色素を用いた動的パラメーターを計測することで、一定期間の骨芽細胞の活動として評価することができる。一方で、有限要素法は構造力学分野で発達し他分野にも広く応用されており、構造の脆弱性等を数学的に解析することができる。しかし、現状では補綴物による生体への力学的な刺激による骨形成の誘導を予測する方法論は確立していない。それらを追及していくには、今回用いたような組織学と構造力学という異なる学問分野の融合研究による解析が必要である。

機械的刺激に対する骨組織の反応は広く研究されてきた。適度な荷重による歪みは骨吸収を促進させること、また、骨形成抑制活性作用をもつ蛋白質であるスクレロシンは機械的刺激によって発現が減少することがよく知られている。一方で、骨形成の亢進が活性化さ

れる、または、スクレロスチンの発現が減り始める際の歪みの値に閾値があるかどうかはよくわかっていない。さらに、これらの機械的刺激による骨形成が起こる際に、同刺激による局所の炎症による影響は不明である。

本研究では、マウス上顎骨荷重モデルを用いて骨に機械的刺激を与えて、荷重によって生じる骨内部の歪みを算出し、組織切片の形態計測結果と合わせて解析することで、骨内部の歪みと骨形成の関連を分析することを目的とした。TNF- $\alpha$ 欠損マウスを用いて炎症性反応を減弱させた場合の解析も同様に行い、機械的刺激による骨代謝変化に及ぼす炎症の関与を明らかにした。

#### <方法>

荷重実験は、マウスを1個体ずつ、十分に麻酔を効かせた状態で自作の荷重装置に頭部を固定しておこなった。13週齢 C57BL/6J 雄マウス (WT) を荷重群 (n=5) と非荷重群 (n=5) の2群に分けた。荷重群は、上顎硬口蓋部に1日1回継続して30分間、191 kPaの荷重を7日間連続で与えた。一方、非荷重群は、同様の荷重装置を用いるが、装置を上顎口蓋部に接触のみさせて荷重0 kPaとした。全てのマウスに、荷重1日目と5日目それぞれにカルセインとアリザリンを皮下注射し、骨に蛍光色素を標識した。最後の荷重終了後に屠殺し、3.7%ホルムアルデヒドにて3日間固定処理を行った。同様の実験を、TNF- $\alpha$ 欠損マウスにも行った。マウス上顎骨を $\mu$ CT撮影し、そのデータから有限要素法を用いて荷重部を含む冠状断の相当歪み分布図を構築し、同様の歪み分布を示す荷重から離れ荷重による炎症の影響がないと考えられる部位 (AWAY) と、荷重直下で炎症が存在すると考えられる部位 (NEAR) の2か所を観察部位として選定した。

凍結切片を作成し、HE染色・TRAP染色 (対比染色: TB染色)・スクレロスチンの免疫染色を行い、骨形態計測を行った。HE染色切片より、炎症性スコアを算出し、機械的刺激による炎症の浸潤程度を計測し、また、TRAP染色切片より、破骨細胞数を計測した。免疫染色切片より、スクレロスチンが発現している骨細胞数等を観察した。一方で、機械的刺激による骨形成の活性化の程度を観察するために、骨に施した蛍光色素から骨芽細胞の石灰化量等を計測した。

#### <結果>

WTマウスの炎症性スコアは、NEARにおいて有意に増加したが、AWAYでは差が認められなかった。また、破骨細胞数では、AWAY・NEARの両部位において荷重により増加が認められたが、荷重による破骨細胞の増加数をみるとAWAYに比較してNEARが有意に高い値を示した。NEARに対する炎症の影響を知るために、TNF- $\alpha$ 欠損マウスでも同様に炎症性スコアを解析した結果、WTマウスでみられたNEARにおける炎症スコア及び破骨細胞数の有意な増加は認められず、破骨細胞の増加数はNEARとAWAYで差が認められなかった。一方で、骨形成に対する荷重による刺激の影響を観察するために、骨細胞に発現

しているスクレロスチンの発現を観察したところ、NEAR では変化が認められなかったが、AWAY では荷重群において有意にスクレロスチンの発現が少なかった。骨細胞数や骨細胞あたりのスクレロスチン発現している骨細胞数でも同様の傾向を示した。さらに、荷重群のAWAY において、スクレロスチン発現骨細胞の分布と荷重により骨内部に生じる歪みの大きさを比較した結果、150 $\mu\epsilon$ 以上の大きい歪みが生じている範囲では、スクレロスチン発現骨細胞の分布が認められなかった。最後に、AWAY における歪み分布の平均が、骨外表面 (Outside) は約 80 $\mu\epsilon$ であるのに対し、骨内表面 (Inside) では約 170 $\mu\epsilon$ と有意に高い値を示した。両骨表面において、骨石灰化速度 (MAR) は、Inside において荷重によって有意に増加を認めしたが、Outside では差を認めなかった。単位骨表面あたりの骨再石灰化面 (MS/BS) はどちらも荷重による影響を認めなかった。また、骨形成速度 (BFR) は MAR と同様の傾向を示した。

#### <考察>

今回、荷重群と非荷重群を比較したことにより、荷重による刺激によって骨細胞内のスクレロスチンの発現が抑制されることが確認された。さらに、スクレロスチン発現骨細胞の分布と同部位の荷重による歪みの値の分布を重ね合わせる解析を行ったことで、スクレロスチンの発現は 150 $\mu\epsilon$ という一定の値以下の歪み値の範囲において認められることが示された。機械的刺激によるスクレロスチン発現骨細胞の減少は、同刺激による炎症が強くなる NEAR では鈍くなった。これより、いまだ骨形成における炎症の影響は議論の最中ではあるが、本実験では、炎症が機械的刺激によるスクレロスチンの発現の減少を阻害するということが示され、炎症が骨形成に抑制的な働きをすることが示唆された。

骨形成を亢進させる歪みの閾値に関しては、7日間の荷重によって MAR は、AWAY の歪みの平均値が約 80 $\mu\epsilon$ である Outside よりも同平均値が 170 $\mu\epsilon$ である Inside で活発になった。これは、機械的刺激が現在ある骨芽細胞を直接刺激し骨形成を活性化させ、かつ、骨芽細胞の骨形成能力を活性化させる歪みの閾値が、80 $\mu\epsilon$ ~170 $\mu\epsilon$ の間に存在する可能性を示唆している。さらに、MS/BS が、Inside・Outside どちらにおいても機械的刺激によって増加していないことから、機械的刺激によって骨芽細胞への分化が亢進され骨芽細胞数そのものが増加するには、7日間という期間は短いことが示唆された。

同様のモデルを用いて、機械的刺激による破骨細胞の出現には、部位特異性があり、かつ、破骨細胞の出現及び活性には力学的歪みの閾値が存在することを示している。それゆえに、スクレロスチンの発現及び骨形成活性化の歪みの閾値は、本実験の荷重条件下に局限した結果と考えなければならないが、今後、骨形成を亢進させる歪みの閾値を明らかにすることが可能と考えられる。骨吸収と骨形成の相互関係は活発に研究されているが、破骨細胞が骨形成を刺激するには荷重による骨芽細胞の活性化が関与している可能性があり、骨形成を亢進させるための力学的歪みの閾値を明らかにすることが必要である。

<結論>

機械的刺激による歪みによって骨芽細胞の骨形成能が活性化され，骨芽細胞を直接的に刺激する力学的歪みの閾値の存在が示唆された．