



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	圧縮力が破骨細胞分化に与える影響
Author(s)	福島, 久夢; 吉村, 善隆; 出山, 義昭 他
Citation	北海道歯学雑誌, 33(2), 94-102
Issue Date	2013-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/52448
Type	journal article
File Information	05-fukushima.pdf



原 著

圧縮力が破骨細胞分化に与える影響

福島 久夢^{1,2)} 吉村 善隆²⁾ 出山 義昭²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 飯田順一郎¹⁾

抄 録：近年、骨芽細胞や歯根膜由来細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させると破骨細胞分化誘導因子が増加するとの報告はあるが、破骨細胞分化誘導系に直接圧縮力を作用させた報告は未だされていない。今回、破骨細胞分化誘導系に圧縮力を作用させ、その影響を検索した。RANKL添加培養液を用いてRAW264.7細胞を6穴プレートにて培養し、圧縮力として細胞層上にシリコン製の円筒を乗せた。重さの調節は円筒内にステンレスチールを入れ、圧縮力は0.5, 1.0 g/cm²、作用時間は0, 15, 30, 60, 90分とした。一定期間培養後、圧縮力を作用させ、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ染色し、破骨細胞数および巨大破骨細胞数（8核以上）を測定した。圧縮力を作用させた群をCF群、作用させない群を対照群とした。培養3日目に圧縮力を作用させた場合、対照群とCF群の間に総破骨細胞数に有意な差を認めなかったが、培養5日目の場合、CF群では破骨細胞数が有意に減少した。RANKL非添加のRAW細胞に圧縮力を作用させ、生存細胞内ATP量により生存細胞数を測定したところ、対照群とCF群の間に有意な差を認めなかったことから、RAW細胞数は圧縮力による影響を受けないことが示唆された。破骨細胞数が減少する原因は細胞死によるものかを分析した。real time PCR法でアポトーシス関連因子の発現状況を検索した結果、caspase 3および8は有意な差を認めず、またLDH量を測定したところ、対照群とCF群の間に有意な差を認めなかった。以上より、RANKL非添加のRAW細胞数および培養初期の破骨細胞数は圧縮力による影響は認められなかったが、培養後期の破骨細胞数および巨大破骨細胞数は減少することが示された。圧縮力により破骨細胞数が減少する原因は、アポトーシスやネクローシスによる細胞死ではない可能性が示唆された。

キーワード：圧縮力、破骨細胞、メカニカルストレス

緒 言

歯科矯正治療の目的は歯を移動し個体にとって最適な咬合を確立することである。歯科矯正治療において歯の移動を行う際に、矯正力がメカニカルストレスとして、骨組織を形成している骨細胞、骨芽細胞、破骨細胞および歯根膜由来（PDL）細胞などの細胞群に作用する¹⁻³⁾。これらの細胞群がメカニカルストレスを感受し³⁾、生体反応が生じた結果、圧迫側では血中マクロファージ由来である破骨細胞の出現により骨吸収が、牽引側では未分化間葉細胞から分化した骨芽細胞の活性化により骨添加が生じて歯が移動する。矯正力というメカニカルストレスが骨のリモデリングを活性化して歯が移動することから、これまで骨芽細胞、PDL細胞、破骨細胞に対するメカニカルストレスの影響について様々な研究がされてきた。メカニカルストレスを作用させる方法として、伸縮刺激⁴⁻⁸⁾、遠心力⁹⁾、静水圧¹⁰⁾および3次元ゲル¹¹⁾など様々な種類がある。

伸縮刺激をメカニカルストレスとして骨芽細胞様MC3T3-E1細胞に作用させた場合、酒井ら⁵⁾は骨代謝を調節する因子のひとつであるreceptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) mRNAの発現を増加させるプロスタグランジンE₂ (PGE₂) 量が増加し、さらにRANKL mRNAの発現が増加したことから、メカニカルストレスは骨リモデリングを活性化させると報告している。白川ら⁴⁾はPDL細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養すると、伸展刺激により、骨芽細胞への分化が促進されることを報告している。Suzukiら⁸⁾によると、伸縮刺激を破骨細胞に作用させると、破骨細胞の分化が抑制され、その後解除すると破骨細胞数が増加することが明らかにされている。

近年、ストレスの条件の変更が容易で、直接細胞へ圧縮力を作用させることが可能なことから、ガラス製のシリンドープレート等を圧縮力として用いる研究¹⁰⁻¹⁴⁾が行われている。Zhang¹²⁾、Koyama¹³⁾、Sanuki¹⁵⁾らによると、骨芽細胞に直接圧縮力を作用させた場合でも、PGE₂量が上

〒060-8586 北海道札幌市北区北13条西7丁目

¹⁾北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座歯科矯正学教室（主任：飯田順一郎 教授）

²⁾口腔病態学講座細胞分子薬理学教室（主任：鈴木 邦明 教授）

昇し、炎症性サイトカインの産生が増加し、RANKL, macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) などの破骨細胞分化を誘導する因子が増加して、破骨細胞分化が誘導を促進されることを報告している。一方、金井¹⁴⁾、Kanzaki¹⁶⁾、Yamaguchi¹⁷⁾らによると、PDL細胞に直接圧縮力を作用させた場合にも、PDL細胞は圧縮力によりシクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) の発現が増加し、PGE₂ の産生に伴って、RANKL mRNAの発現は増加するが、osteoprotegerin (OPG) mRNAの発現は変化せず、破骨細胞形成が促進されることを報告している。またIchimiya⁶⁾らも、ラット滑膜細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させた場合、RANKL mRNAの発現が増加したがOPG mRNAの発現には変化は認められなかったと報告している。さらに、滑膜細胞と骨髄細胞を共培養した結果、圧縮刺激を加えると、酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性破骨細胞数が増加することを明らかにしている。

しかし、これまで破骨細胞に直接圧縮力を作用させた報告はない。そこで本研究では、RANKLを用いた破骨細胞分化誘導系を用いて、破骨細胞に直接圧縮力を作用させて、どのような影響が生じるかを検索した。

材 料 と 方 法

1. 細胞の培養

マウスマクロファージ様破骨細胞前駆細胞であるRAW264.7細胞 (RAW細胞: ATCC, VA, USA) を、10% 牛胎児血清 (HyClone Laboratories, UT, USA)、含有Dulbecco's Modified Eagle's培地 (D-MEM: Wako pure chemical industries, Osaka) を用いて、100 mmスタンダードディッシュ (FALCON™, Becton Dickinson Labware, NJ, USA) 中で、37℃、5% CO₂-95% 気相下にて培養した。その後、0.48 mM EDTA含有Dulbecco's phosphate-buffered saline (Ca²⁺, Mg²⁺ 不含) で洗浄後、細胞を回収し、10%牛胎児血清、284 μM L-アスコルビン酸2-リン酸 (Sigma-Aldrich, MO, USA)、および2 mM L-アラニル-L-グルタミン (Sigma-Aldrich) 含有α-minimum essential 培地 (α-MEM: Wako pure chemical industries) を用いて、6 ウェル—マルチウェルプレートに1穴あたり1 × 10⁴個の細胞密度で播種した。破骨細胞への分化誘導には、50 ng/ml RANKL (Oriental Yeast Corp, Tokyo) を添加した。培養液は培養2日毎に交換した。

2. メカニカルストレスの負荷

メカニカルストレスとして圧縮力を用いた。圧縮力はシリコン製の円筒を作成し、一定期間培養した細胞層上にのせることで作用させた。重さの調節は円筒内にステンレススチールを入れて行った。圧縮力は0.5あるいは1.0 g/cm²、作用時間は0、15、30、60および90分とし、持続的に作用

させた。ウェル底面の面積に対する円筒の面積の割合は90%であった (図1)。圧縮力を作用させた群をCF群とした。CF群は各種圧縮力を培養3、4、5日目にそれぞれ作用させその後除去した。なお、6ウェル—マルチウェルプレートにRAW細胞を播種した日を培養1日目とした。



図 1

圧縮力を作用させる方法。6ウェル—マルチウェルプレートに培養した細胞層上にシリコン製の円筒を乗せることで圧縮力を作用させた。円筒内に減菌したステンレススチールの重りを入れて圧縮力を調節した。

3. 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性細胞数の計測

対照群ならびにCF群を一定期間培養後、10%中性ホルマリン溶液にて固定し、形成された破骨細胞を観察するためにfast red violet LB salt (Sigma-Aldrich) を用いてTRAP染色を行った¹⁸⁾。光学顕微鏡にて破骨細胞数 (2核以上) および巨大破骨細胞数 (8核以上) を測定した。測定部位は6ウェル—マルチウェルプレートの中央部の同部位を計測できるように座標を設定し行った。計測した面積は0.3-0.9 cm²のうちの一定の範囲内とした。

4. 細胞内ATP量の測定

細胞障害を調べるために、Via Light Plus Kit (Lonza, ME, USA) を用いて細胞内ATP量を測定した。生物発光の検出には、Wallac 1420 ARVOsx (Perkin Elmer, MA, USA) を使用した。

5. realtime-PCR

RNA抽出には、Trizol (Invitrogen, MD, USA) を用いた。さらにReverTra Ace reverse transcriptase (Toyobo, Osaka) とOligo d(T)primerを用いて、逆転写反応を行い、cDNAを合成した。realtime-PCRはABI 7300 (Applied Biosystems) を用いて増幅産物を定量した。mRNAの発現量は、Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAの発現量を用いて標準化した。プライマーは以下のTaq-man® gene expression assay (ABI) を使用した。すなわち、FAS (Mm00433237_m1), BAX

(Mm00432050_m1), Caspase 3 (Mm01195085_m1), Caspase 8 (Mm00802247_m1), Bcl-2 (Mm00477631_m1), Bcl-xL (Mm00437783_m1) および glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Mm99999915_g1) である。

6. 乳酸脱水素酵素 (lactate dehydrogenase : LDH) 量の測定

CytoTox-ONE™ Homogeneous Membrane Integrity Assay (Promega, WI, USA) を用いてメーカーの指示する方法に従い, LDH量を測定した。

7. 統計学的分析

対照群とCF群の2群間における統計処理にはStudent's-t testを用い, 有意水準を $p < 0.05$ とした。また, 3群間以上の比較は, 一元配置分散分析により群間比較を行った後, Dunnett法を用いて多重比較を行い, 有意水準を $p < 0.05$ とした。グラフは, 平均値 $\pm$ S.D. で示した。

結 果

1. TRAP陽性破骨細胞数の変化

培養日程3日目に圧縮力を作用させた場合, 対照群と比較しCF群では, いずれの圧縮力および圧縮時間においても総破骨細胞数は有意な差を認めなかった (図2-A)。培養日程4日目に圧縮力を作用させた場合, 対照群と比較しCF群では, 1.0 g/cm^2 の圧縮力を30分間以上作用させると, 総破骨細胞数が減少した (図2-B)。一方, 0.5 g/cm^2 の圧縮力を作用させたCF群では対照群と比較し, いずれの圧縮時間においても有意な差は認められなかった (図2-B)。培養5日目に圧縮力を作用させた後, CF群では, 1.0 g/cm^2 の圧縮力を作用させた群において総破骨細胞数は有意に減少し, 圧縮力を90分間作用させた群においては対照群と比較して約60%に減少した (図2-C)。さらに, 0.5 g/cm^2 の圧縮力を作用させた群においても, 5日目に90分間作用させた場合, 対照群と比較しCF群で約70%に減少した (図2-C)。

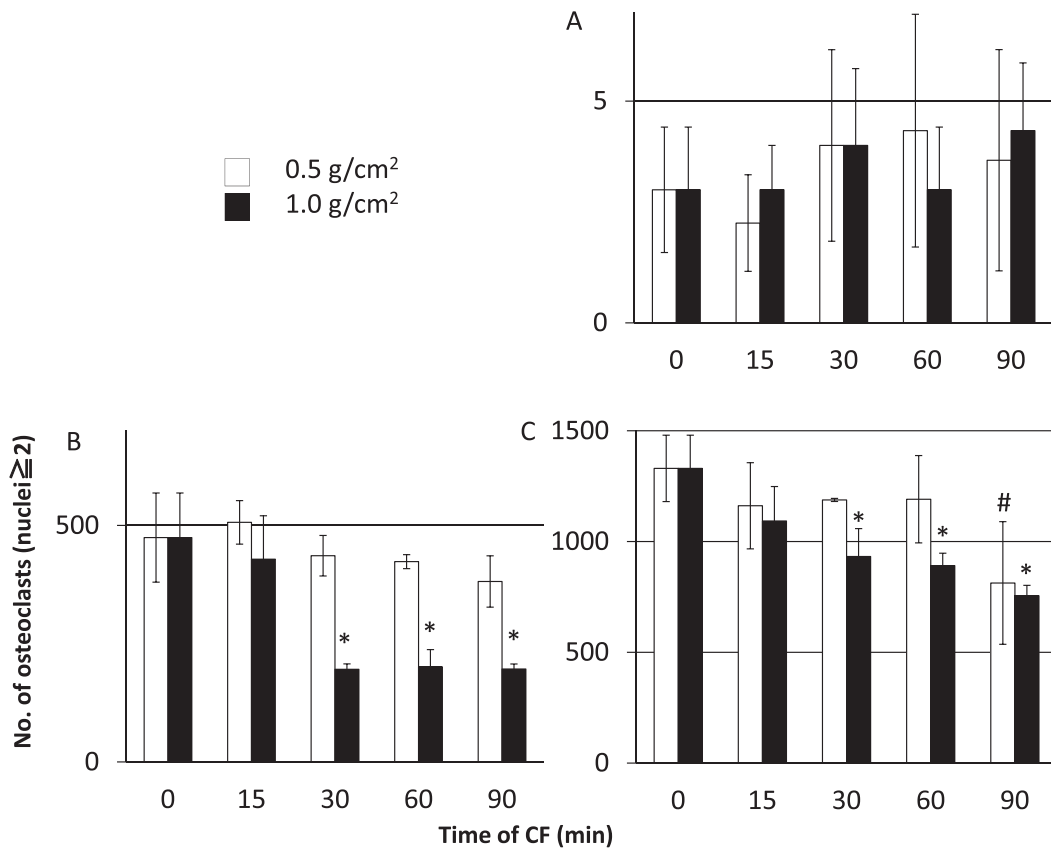


図2

培養日程別の0.5あるいは 1.0 g/cm^2 の圧縮力を0, 15, 30, 60および90分間作用させた後のCF群および対照群における誘導された総破骨細胞数の変化。0分を対照群とした。対照群と比較し有意な差は認められなかった。mean $\pm$ SD, n=4, $p < 0.05$ (*) (#)

- A, 培養3日目に圧縮力を作用。
- B, 培養4日目に圧縮力を作用。
- C, 培養5日目に圧縮力を作用。

次に、巨大破骨細胞数を測定した。培養日程3日目に圧縮力を作用させた場合、誘導された破骨細胞数は少ないが、対照群と比較しCF群では、いずれの圧縮力および圧縮時間においても巨大破骨細胞数は有意な差を認めなかった（データ未掲載）。培養日程4日目に圧縮力（0.5あるいは1.0 g/cm²）を作用させた場合、対照群と比較しCF群では、巨大破骨細胞数が有意に減少した（図3-A）。また、培養5日目に圧縮力（0.5あるいは1.0 g/cm²）を作用させた場合、巨大破骨細胞数が有意に減少し、90分間作用させた群では、対照群と比較し約50%まで減少した（図3-B）。

また、培養3日目に圧縮力を作用させた後、48時間後まで培養を続けた場合、誘導された総破骨細胞数には、CF群と対照群の間に有意な差を認めなかった（図4）。

2. 生存細胞数の測定

破骨細胞前駆細胞であるマクロファージ様RAW細胞に、培養3日目に圧縮力を作用させた場合、いずれの圧縮力（0.5あるいは1.0 g/cm²）においても、対照群とCF群を比

較し、ATP量に有意な差を認めなかった（図5）。

3. 圧縮力によるTRAP陽性破骨細胞数減少の原因について検討—realtime-PCRおよびLDH量の測定

培養5日目に1.0 g/cm²の圧縮力を作用させたCF群および対照群のreal time PCR法を行った結果、アポトーシス誘導因子であるFasは30分間以上の圧縮力を作用させた場合、mRNAの発現が有意に上昇し、またBaxにおいても、15分間以上の圧縮力を作用させた場合、mRNAの発現が有意に上昇した（図6）。しかし、アポトーシス誘導因子であるCaspase 3および8の発現は、対照群とCF群との間に有意な差を認めなかった（図6）。さらに、アポトーシス抑制因子であるBcl-2の発現も対照群と比較し有意な差を認めなかったが、同様にアポトーシス抑制因子であるBcl-xLのmRNAの発現はCF群で有意に上昇した（図6）。また、5日目に圧縮力を作用させたCF群においてLDH量の変化について検討を行ったところ、CF群と対照群との間にLDH量の有意な差は認められなかった（図7）。

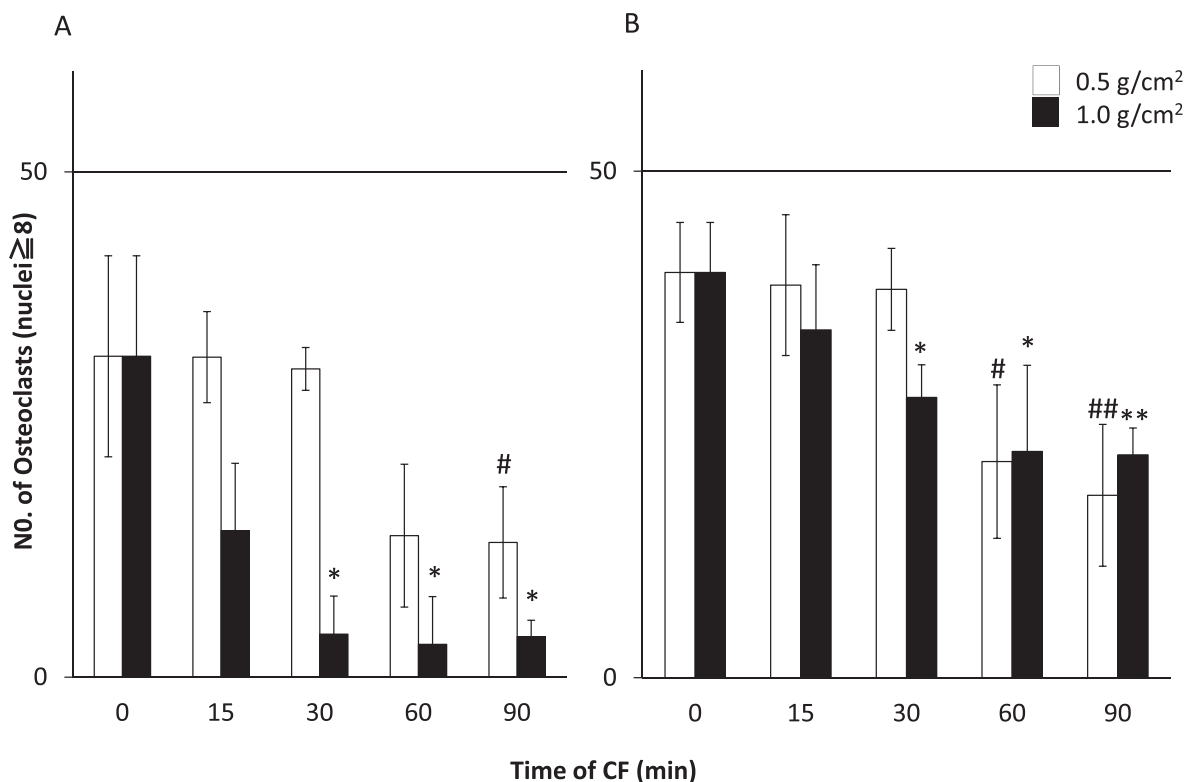


図3

培養日程別の0.5あるいは1.0 g/cm²の圧縮力を0, 15, 30, 60および90分間作用させたCF群および対照群における8核以上の巨大破骨細胞数の変化。0分を対照群とした。mean ± SD, n = 4, p < 0.05 (*) (#), p < 0.01 (**)(##)

A, 培養4日目に圧縮力を作用。

B, 培養5日目に圧縮力を作用。

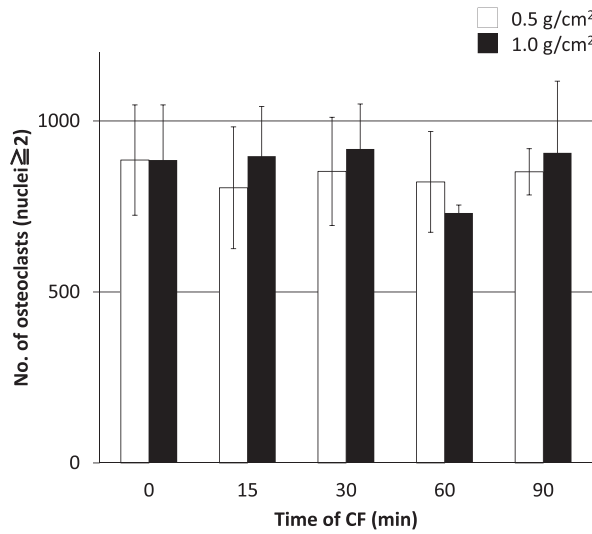


図4

培養3日目に0.5あるいは1.0 g/cm²の圧縮力を0, 15, 30, 60および90分間作用させた後48時間培養を続けた場合のCF群および対照群における総破骨細胞数の変化。0分を対照群とした。mean ± SD, n = 4

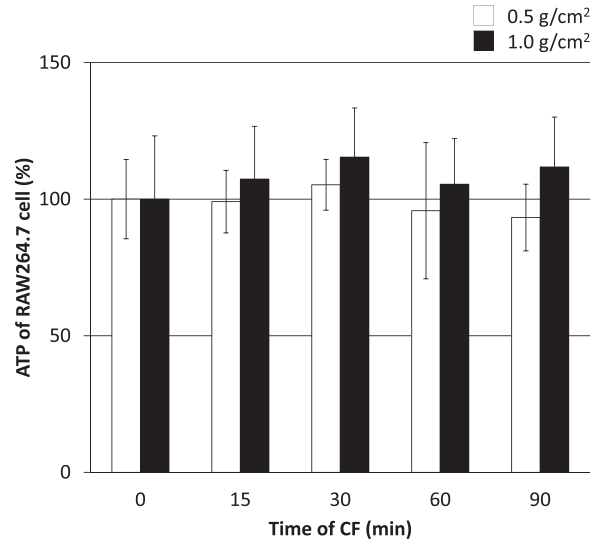


図5

培養3日目に、RANKL非添加のRAW細胞に0.5あるいは1.0 g/cm²の圧縮力を0, 15, 30, 60および90分間作用させたCF群および対照群の生存細胞内ATP量の測定結果。0分を対照群とした。対照群とCF群との間に有意な差は認められなかった。

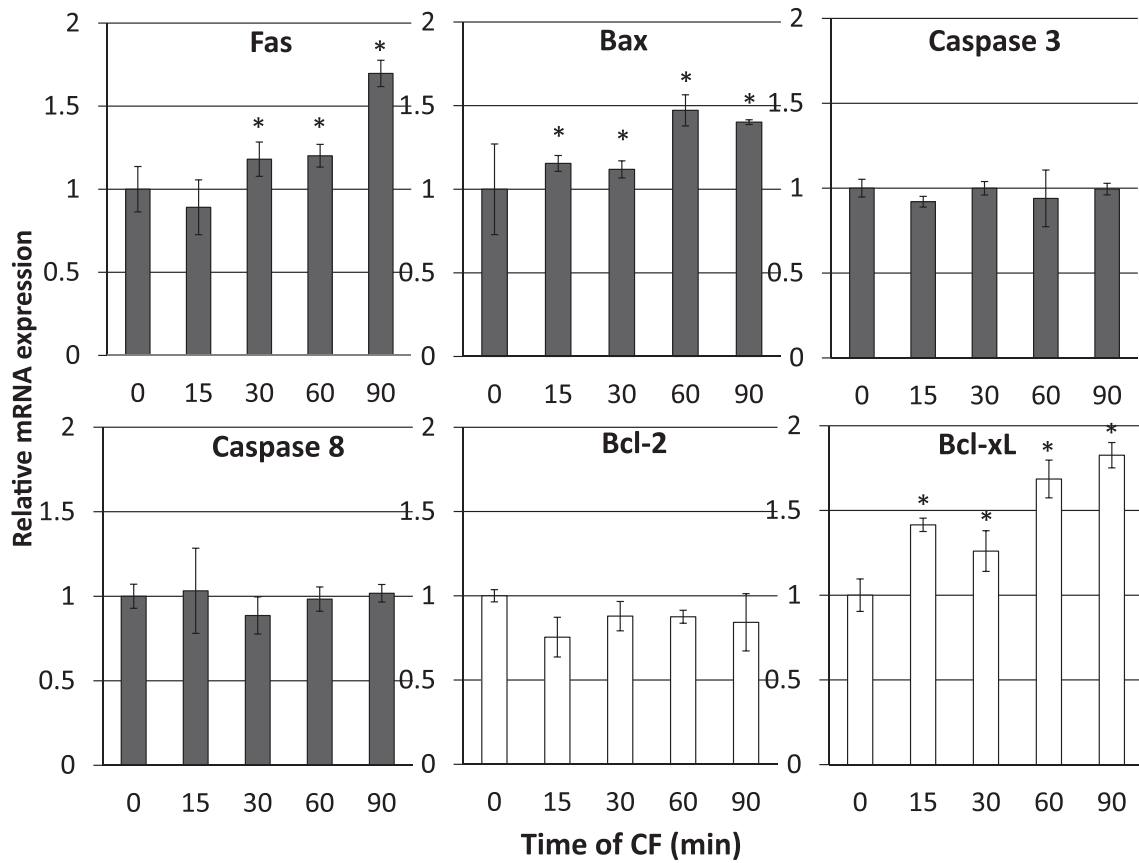


図6

培養5日目の、破骨細胞に、1.0 g/cm²の圧縮力を0, 15, 30, 60および90分間作用させたCF群および対照群のアポトーシス関連遺伝子の発現状況。mean ± SD, n = 3, p < 0.05 (*)

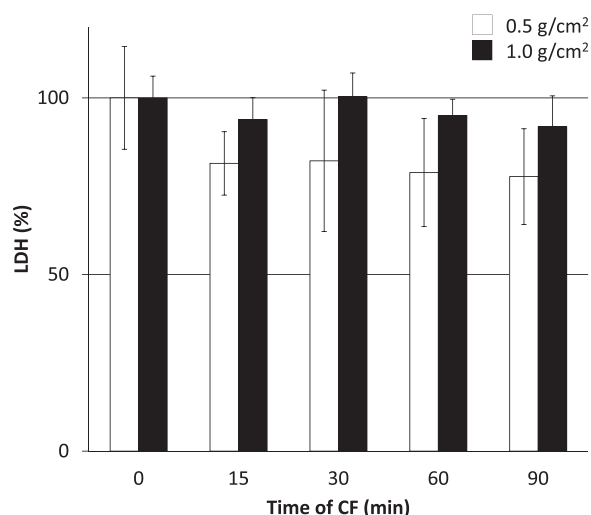


図 7

培養 5 日目の、破骨細胞に 0.5 あるいは 1.0 g/cm² の圧縮力を 0, 15, 30, 60 および 90 分間作用させた CF 群における LDH 活性の測定結果。0 分と対照群とした。CF 群と対照群との間に、有意な差を認めなかった。mean ± SD, n = 4

考 察

1. 圧縮力の検討

骨芽細胞ならびに PDL 細胞に圧縮力を作用させる実験として、これまで 1.0–5.0 g/cm² 程度の圧縮力が用いられていた^{10–12, 14, 16}。そこで、予備実験として、はじめに 1.0, 2.0 および 4.0 g/cm² の各圧縮力を 0, 15, 30, 60 および 90 分間持続的に作用させ、総破骨細胞数を計測した。2.0 あるいは 4.0 g/cm² の圧縮力を、15 分間作用させた場合、対照群と比較し CF 群では総破骨細胞数が約 20% に減少した。すなわち、骨芽細胞および PDL 細胞は圧縮力により破骨細胞分化誘導因子が増加し、分化誘導は促進されるが、破骨細胞は圧縮力によりその数が減少し、分化誘導は抑制されることが示唆された。2.0 g/cm² 以上の圧縮力では細胞への障害が非常に大きいことから、RAW 細胞および破骨細胞に用いる圧縮力の強さは 0.5 あるいは 1.0 g/cm² を用いるのが有効であると考え、本研究ではこれらの圧縮力に対する RAW 細胞および破骨細胞の反応を観察した。

2. 圧縮力が RAW 細胞および破骨細胞に及ぼす影響

今回、培養 3 日目に圧縮力を作用させた場合、誘導された破骨細胞数は少なかったが、対照群と比較し CF 群では、0.5 あるいは 1.0 g/cm² の圧縮力において、いずれの圧縮時間でも総破骨細胞数が減少しないことが示された (図 2-A)。Suzuki ら⁸⁾ および水野 ら¹⁹⁾ は、培養 3 日目は RAW 細胞から破骨細胞への分化・融合の初期段階であり、誘導される破骨細胞数は少ないことを報告している。

一方、分化・融合が進んだ培養 4 日目は 1.0 g/cm² の圧縮力を作用させた場合、総破骨細胞数が減少し、さらに培養 5 日目ではいずれの圧縮力 (0.5 あるいは 1.0 g/cm²) に

おいても、総破骨細胞数が減少した (図 2-B, C)。以上の結果から、破骨細胞分化・融合の初期段階では圧縮力による細胞数への影響は少なく、より分化・融合が進むことで、その影響を受けることが示唆された。この総破骨細胞数が減少する原因は、細胞融合によるものなのか、あるいは破骨細胞自体が減少したのかについて明らかにするために巨大破骨細胞数を計測した。

培養 4 日目および 5 日目のいずれにおいても対照群と比較し、CF 群でその数が有意に減少した (図 3-A, B)。以上のことから、圧縮力により、破骨細胞が融合することで総破骨細胞数が減少しているのではないことが示された。また、培養 5 日目で、0.5 g/cm² の圧縮力を 90 分間作用させた場合に総破骨細胞数が減少したことに対して、巨大破骨細胞数は 60 分間および 90 分間作用させた場合でも、有意に減少することが示された (図 3-B)。このことから、巨大破骨細胞数は、圧縮力による影響を受けやすいことが示唆された。

培養 3 日目に圧縮力を作用させても、誘導された総破骨細胞数に影響がないことが示された (図 2-A) が、次に、その後培養を続けた場合も、誘導される総破骨細胞数に影響がないのかについて検討した。Shibata らは⁷⁾ 機械的刺激として伸縮刺激を用いて、培養 3 日目に 48 時間刺激を与えた場合は破骨細胞数が減少するが、刺激解放後から破骨細胞の分化、融合が促進され、48 時間後には、対照群と比較し実験群では TRAP 陽性破骨細胞数が増加すると報告している。本研究において培養 3 日目に圧縮力を作用させ、その後 48 時間培養を続けた場合、対照群と、CF 群では総破骨細胞数に有意な差を認めなかった (図 4)。このことから、培養初期に、圧縮力を作用させ、その後 48 時間培養を続けても、誘導される破骨細胞数への影響はないことが明らかになった。以上を考えると、同じ機械的刺激であっても、機械的刺激からの解放を行った場合、伸縮刺激と圧縮力とでは細胞数への影響が異なり、機械的刺激の種類によって反応が異なることが示唆された。

次に、破骨細胞前駆細胞である RAW 細胞が圧縮力による影響を受けるのか検討するため、RANKL 非添加の RAW 細胞に培養 3 日目に圧縮力を作用させ、細胞内 ATP 量を測定した。その結果、いずれの圧縮力 (0.5 g あるいは 1.0 g/cm²) においても、対照群と CF 群との間には、ATP 量に有意な差は認められなかった (図 5)。このことから、圧縮力により、総破骨細胞数および巨大破骨細胞数は減少したが、圧縮力は、RANKL 非添加の RAW 細胞数には影響しないことが示唆された。

3. TRAP 陽性破骨細胞数が減少する原因について検討

培養 5 日目に 1.0 g/cm² の圧縮力を作用させた CF 群において巨大破骨細胞数も減少していたことから、総破骨細胞数が有意に減少した原因が、細胞死により数が減少したと

推察されたため、どの機構による細胞死によるものかを考察した。細胞死は形態学的特徴からアポトーシス、ネクローシスに分類される²⁰⁾。アポトーシスには細胞内のミトコンドリアを標的としたストレス経路とFasなどのデスレセプターファミリー経路に大別されている²¹⁾。ストレス経路において、アポトーシスシグナルが細胞内のミトコンドリアを経由すると、膜透過性が亢進し、外膜と内膜の間のスペースからシトクロムcなどのアポトーシス促進因子が漏出し、シトクロムcはATP存在下でApaf-1と結合し、アポトソームと呼ばれる複合体を形成してタンパク質分解酵素であるCaspaseを活性化する。活性化したCaspaseがタンパク質を切断することによりアポトーシスが生じる²²⁾。一方、Baxは細胞質中に存在し、細胞死の誘導において、ミトコンドリアに移動してアポトーシスを促進する。BaxはBH (Bcl-2 homology) ドメインを持つBcl-2ファミリー遺伝子のうちのひとつで、がん抑制遺伝子p38により活性化され、アポトーシスを誘導することが示されている²³⁾。本研究では、CF群における、アポトーシス関連遺伝子であるCaspase 3, 8, Bax, Fas, Bcl-2およびBcl-xLのmRNAの発現を解析したところ、アポトーシス誘導因子であるFasは30分以上の作用時間で有意に上昇し、BaxもCF群において有意に上昇した。しかし、その下流にあるCaspase 3およびCaspase 8は有意な変化が認められなかった(図6)。また、アポトーシス抑制因子であるBcl-2も、圧縮力により有意な変化を認めなかった。しかし、同様にアポトーシス抑制因子であるBcl-xLは圧縮力により有意に上昇した(図6)。

圧縮力を作用させると、FasやBaxは上昇したが、わずか15分間圧縮力を作用させるだけで、総破骨細胞数が減少しており、mRNAからタンパク質に翻訳される時間的な背景から、この総破骨細胞数の減少はアポトーシスによるものではないと推察した。

また、総破骨細胞数の減少がネクローシスによるものかを考察するため、LDH量の測定を行った。細胞が物理的・化学的に強いストレスに曝された場合、ネクローシスが生じる²⁰⁾。細胞が細胞膜破壊を伴う細胞死に至るとLDHが細胞外に流出し、ネクローシスにおいて、細胞外に流出するLDH量が高くなるといわれているが、CF群と対照群を比較したところ、LDH量に有意な差は認められなかった(図7)。このことから、培養5日目に圧縮力を作用させた場合、総破骨細胞数は減少したが、この原因はネクローシスによる細胞死である可能性は低いと考えられた。アポトーシス、またネクローシス以外の細胞死には、オートファジー(自食)がある。これは、アポトーシスが生じない場合に生じるといわれており、Atg5などのタンパク質が関与しているといわれている²⁴⁾。このオートファジータンパク質が、破骨細胞の骨吸収に関与しているとの報告がある²⁵⁾が、この点に関しては、今後詳細な検討が必要である。

結 論

RAW細胞ならびに破骨細胞にメカニカルストレスとして圧縮力を作用させた場合、以下のことが明らかとなった。

1. RAW細胞数および培養初期の破骨細胞数は圧縮力の影響を受けにくい。
2. 培養後期の破骨細胞は圧縮力の影響により、その数が減少する。特に、巨大破骨細胞数は圧縮力の影響を受けやすい。
3. 培養後期の総破骨細胞数および巨大破骨細胞数が圧縮力により減少した原因は、アポトーシスやネクローシスによる細胞死が原因ではない可能性が高い。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御援助、御協力いただきました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座歯科矯正学教室ならびに口腔病理学講座細胞分子薬理学教室の教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) Davidovitch Z : Tooth movement. Crit Rev Oral Biol Med 2 : 411-450, 1991.
- 2) Roberts WE, Goodwin WC, Jr., Heiner SR : Cellular response to orthodontic force. Dent Clin North Am 25 : 3-17, 1981.
- 3) Mullender MG, Huiskes R : Osteocytes and bone lining cells : Which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone? Bone 20 : 527-532, 1997.
- 4) 白川 哲 : ヒト歯根膜由来細胞の分化に与える周期的伸展力の影響. 日本歯周病学会誌, 48 : 113-122, 2006.
- 5) 酒井 利雄 : 骨芽細胞様細胞MC3T3-E1細胞におけるRANKL遺伝子の周期的細胞伸縮刺激による発現誘導. 福岡歯科大学学会雑誌, 30 : 13-26, 2003.
- 6) Ichimiya H, Takahashi T, Ariyoshi W, Takano H, Matayoshi T, Nishihara T : Compressive mechanical stress promotes osteoclast formation through RANKL expression on synovial cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 103 : 334-341, 2007.
- 7) Shibata K, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J : Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Int J Mol Med 28 : 73-79, 2011.
- 8) Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y : Mechanical stress directly suppresses

- osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 21 : 291-296, 2008.
- 9) 本城 正 : 骨芽細胞株MC3T3-E1細胞に対する流体剪断応力負荷時におけるCTGF発現に関わるシグナル伝達機構の研究. *岡山歯学会雑誌*, 22 : 139-152, 2003.
 - 10) Nakao K, Goto T, Gunjigake KK, Konoo T, Kobayashi S, Yamaguchi K : Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *J Dent Res* 86 : 623-628, 2007.
 - 11) Kaneuji T, Ariyoshi W, Okinaga T, Toshinaga A, Takahashi T, Nishihara T : Mechanisms involved in regulation of osteoclastic differentiation by mechanical stress-loaded osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 408 : 103-109, 2011.
 - 12) Zhang F, Wang CL, Koyama Y, Mitsui N, Shionome C, Sanuki R, Suzuki N, Mayahara K, Shimizu N, Maeno M : Compressive force stimulates the gene expression of IL-17s and their receptors in MC3T3-E1 cells. *Connect Tissue Res* 51 : 359-369, 2010.
 - 13) Koyama Y, Mitsui N, Suzuki N, Yanagisawa M, Sanuki R, Isokawa K, Shimizu N, Maeno M : Effect of compressive force on the expression of inflammatory cytokines and their receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Arch Oral Biol* 53 : 488-496, 2008.
 - 14) 金井 鐘秀, 野原 広美, 花田 晃治 : 持続的加圧刺激がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす初期効果について. *日本矯正歯科学会雑誌*, 51 : 153-163, 1992.
 - 15) Sanuki R, Mitsui N, Suzuki N, Koyama Y, Yamaguchi A, Isokawa K, Shimizu N, Maeno M : Effect of compressive force on the production of prostaglandin E (2) and its receptors in osteoblastic Saos-2 cells. *Connect Tissue Res* 48 : 246-253, 2007.
 - 16) Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H : Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res* 17 : 210-220, 2002.
 - 17) Yamaguchi M, Shimizu N, Goseki T, Shibata Y, Takiguchi H, Iwasawa T, Abiko Y : Effect of different magnitudes of tension force on prostaglandin E2 production by human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol* 39 : 877-884, 1994.
 - 18) Takeyama S, Yoshimura Y, Deyama Y, Sugawara Y, Fukuda H, Matsumoto A : Phosphate decreases osteoclastogenesis in coculture of osteoblast and bone marrow. *Biochem Biophys Res Commun* 282 : 798-802, 2001.
 - 19) 水野 貴行, 吉村 善隆, 出山 義昭, 八田 光世, 鈴木 邦明, 北川 善政 : RANKLによるRAW264.7細胞の破骨細胞分化に伴うアポトーシスの誘導. *北海道歯学雑誌*, 26 : 210-217, 2005.
 - 20) Guicciardi ME, Leist M, Gores GJ : Lysosomes in cell death 23 : 2881-2890, 2004.
 - 21) Cory S, Adams JM : The Bcl2 family : regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* 2 : 647-656, 2002.
 - 22) Wang X : The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 15 : 2922-2933, 2001.
 - 23) Miyashita T, Reed JC : Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 80 : 293-299, 1995.
 - 24) Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y : Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6 : 1221-1228, 2004.
 - 25) Deselm CJ, Miller BC, Zou W, Beatty WL, van Meel H, Takahata Y, Klumperman J, Tooze SA, Teitelbaum SL, Virgin HW : Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption. *Developmental cell* 21 : 966-974, 2011.

ORIGINAL

The effect of compressive force on osteoclastogenesis

Kumu Fukushima^{1, 2)}, Yoshitaka Yoshimura²⁾,
Yoshiaki Deyama²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾ and Junichiro Iida¹⁾

ABSTRACT : Mechanical stress is known to be an important factor in the regulation of bone remodeling. Compressive force up-regulates receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) expression in osteoblasts and periodontal ligament (PDL) cells. However, it is still unclear whether compressive force regulates osteoclastogenesis. Therefore, in this study, we investigated the effect of compressive force on osteoclastogenesis derived from RAW264.7 (RAW) cells, which have the capacity to differentiate into osteoclasts with RANKL. Compressive force was applied to RAW cells with silicon cylinder adjusted by using lead granules (0.5 or 1.0 g/cm²) for 0 (control), 15, 30, 60 or 90 minutes, respectively. The number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) -positive multinucleated (2 nuclei or more) osteoclasts and large (8 nuclei or more) osteoclasts were measured. There was no significant difference in the number of osteoclasts under compressive force (0.5 or 1.0 g/cm²) on the 3rd day (the early stage of osteoclastogenesis). However, the number of osteoclasts under compressive force (1.0 g/cm²) on the 4th and the 5th day (the late stage of osteoclastogenesis) showed significant decrease. It showed that the number of large osteoclasts was also significantly decreased in both groups (0.5 or 1.0 g/cm²) on the 4th day and the 5th day. However, the number of osteoclasts on 5th day when compressive force had been applied on the 3rd day had no significant difference compared with control. The number of living RAW cells without RANKL was measured under compressive force on the 3rd day. These results were not significant difference from control, suggesting that compressive force induced cell death in the late stage of osteoclasts and no effect of RAW cells and the early stage of osteoclasts. To assess whether the number of large osteoclasts decreased by cell death, we investigated quantitative PCR and lactate dehydrogenase (LDH) assay. The mRNA expression of apoptosis was not related with compressive force and LDH was no significant differences on the 5day, while the number of osteoclasts was decreased. These results suggested that the number of RAW cells and osteoclasts in the early stage of culture had no effect of compressive force, but the number of osteoclasts in the late stage decreased under compressive force. We concluded that the decrease of osteoclasts may be neither apoptosis nor necrosis.

Key Words : compressive force, osteoclasts, mechanical stress