HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ハイドロキシアパタイトブロックによる圧縮力がMC3T3-E1細胞に与える影響
Author(s)	前田, 輪嘉幹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12594号
Issue Date	2017-03-23
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12594
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/65530
Type	doctoral thesis
File Information	Wakatoshi_Maeda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

ハイドロキシアパタイトブロックによる圧縮力が MC3T3-E1 細胞に与える影響

平成 29 年 3 月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

前　田　輪　嘉　幹

抄録

本研究の目的は，メカニカルストレスを想定したハイドロキシアパタイト（Hap）ブロックによる圧縮力が骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）に与える影響を明らかにすることである．ポリスチレンディッシュで培養後に細胞上に Hap を静置することにより圧縮力を負荷した群（UH 群）とディッシュ上に静置した Hap 上で細胞を培養後に Hap を反転し圧縮力を負荷した群（OH 群）を実験群とし，ディッシュ上で通常培養したものをコントロール群（C 群）とした．各群とも confluence 後に圧縮力を負荷し，1，2 および 3 日間培養行い，総蛋白質量の測定と，Alkaline Phosphatase (ALP)，Osteocalcin（Oc)，RANKL，OPG の mRNA 発現量を real-time PCR 法にて定量した．総蛋白質量は，UH 群，OH 群とも経時的に増加したが，C 群と比較し有意に低い値を示したことから，細胞増殖の抑制が示された．UH 群においては，Oc と ALP の遺伝子発現は経時的に増加したが，Oc は 3 日後，ALP はいずれの時点においても，C 群に比較し有意に低い値を示した．RANKL は経時的に増加し C 群に比較し有意に高い値を示したが, OPG は有意に低い値を示した. 以上の結果から，骨芽細胞の分化は抑制され破骨細胞の分化が促進される可能性が示唆された．一方，OH 群においては，Oc と ALP は経時的に増加し，Oc では負荷 3 日後，ALP ではいずれの計測時点においても C 群に比較し有意に高い値を示し，RANKL は経時的に減少し C 群に比較し有意に低い値を示したことから，UH 群と異なり，骨芽細胞の分化が促進され破骨細胞の分化は抑制される可能性が示唆された．以上より，MC3T3-E1 細胞に対する Hap による圧縮力は，細胞増殖を抑制すること，また圧縮力の方向は骨形成に関する機能発現と破骨細胞の分化に影響を与えることが示唆された．

緒言

生体においては，様々な組織や細胞が力学的負荷（メカニカルストレス）を受けている．特に，骨組織においては，メカニカルストレスは，恒常性を保つには，重要であり，骨には生理的なメカニカルストレスの幅（physiological window）を感知するメカノセンサーが存在すると考えられている [1,2]．長期間の寝たきり状態やギブスによる固定などによりメカニカルストレスが減少した状態では，骨量や骨密度が低下すること [3]，また，運動などの適度なメカニカルストレスは骨形成を促進し，骨量や，骨密度が上昇することが報告されている [4-6]．すなわち，メカニカルストレスの持続的負荷が一定期間内に繰り返されることが骨の構造と機能の維持に必要であり，Frost により，これらのメカニズムを説明する仮説としてメカノスタット説（mechanostat theory）が提唱されている [7]．また，インプラント治療においても，適切な咬合力の負荷はインプラント周囲骨の形成を促進し，過大な咬合力はインプラント周囲の骨組織を吸収し，オッセオインテグレーションの喪失につながることが報告されている [8]．

このように，歯科臨床においてもメカニカルストレスは，考慮すべき重要な因子であることから，メカニカルストレスが骨芽細胞に与える影響については，多くの研究がなされている．

動物実験[9,10]に加えて，培養細胞を用いてメカニカルストレスが細胞に受容される分子機構を解明しようとする研究も行われている．細胞にメカニカルストレスを加える方法としては，液流を与えて細胞に刺激を加える fluid shear stress[11-13]，培養基質への伸縮力の負荷[14,15]，ガラスシリンダーを用いた圧縮力の負荷[16-18]などがなされている．メカニカルストレスを加えることにより，細胞内 Ca^{2+}濃度が上昇し，ALP や Osteocalcin などの遺伝子発現に影響を与えることが報告されている[19-21]．

近年，インプラント臨床において埋入即時荷重負荷がなされている[22]が，十分な基礎的研究はなされていない．また，骨芽細胞に対する伸展に関する研究[23]はなされているが，臨床における機能力はむしろ圧縮に近いメカニカルストレスと考えられる．すなわち，圧縮力に対しての持続的影響や方向が重要であると考えられるが，これらに関する研究はなされていない．我々は，生体適合性が高く，特に骨組織との適合性が高いため，歯科臨床において骨補填材として使用されることが多いハイドロキシアパタイト（以下 Hap とする）を用いてメカニカルストレスを与えることに着目した．Hap はその組成が骨組織の無機成分と近似しており，材料表面に骨の添加性の沈着が起こり，骨基質と明瞭な骨性癒着をすることが報告されている[24,25]．本研究では，骨補填材として使用されている Hap を用いることで臨床におけるメカニカルストレスを想定し，Hap ブロックの重さによる圧縮力が骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）の分化に与える影響について検討した．

材料と方法

1. 細胞と細胞培養

骨芽細胞様細胞（MC3T3-E1 細胞）を使用した[26,27]．培養液は，10%牛胎児血清（HyClone Laboratories），284 μM L-アスコルビン酸 2-リン酸（Sigma-Aldrich），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: 和光純薬工業）を用い（以下αMEM 培地とする），37 ℃，5 % CO_2 条件下にて培養を行い，培養液は培養 1 日毎に交換した．

2. メカニカルストレスの負荷方法

メカニカルストレスとして圧縮力を用い，圧縮力には Hap ブロックを使用した．Hap ブロックは直径 13 mm，高さ 2 mm，重さ 0.8 g ，気孔率 0 %，円柱（HOYA）を使用した（圧縮力は重さ/面積より約 60 Pa となる）．圧縮力は以下の異なる 2 通りの方法で作用させた．

実験①

24 穴ポリスチレンディッシュ（Corning，Falcon Tissue Culture Plate 24-well）に 1 穴あたり 1×10^5 個の細胞密度で播種し，2 日間培養を行い，confluence となったことを確認し，この時点を 0 日目とし，Hap ブロックを静置することにより持続的に圧縮力を負荷した（以下 UH 群とする）． Hap ブロックを静置せずポリスチレンディッシュ上に培養したものをコントロールとした（以下 C 群とする）．圧縮力負荷後，1，2 および 3 日間培養し

た（図 1）.

実験②

24 穴ポリスチレンディッシュに Hap ブロックを静置し, その上に 1×10^5 個細胞播種し, confluence となったことを確認し，この時点を 0 日目とし，細胞が付着している Hap ブロックを反転することにより圧縮力を負荷した（以後 OH 群とする）. Hap ブロックを静置せずポリスチレンディッシュ上で細胞培養したものをコントロールとした. 圧縮力負荷後, 1, 2 および 3 日間培養した（図 2）.

3. 評価項目

1） 総蛋白質量の測定

総蛋白質量の測定は，Micro BCA Protein Assay Reagent（サーモフィッシャーサイエンティフィック）を用いてメーカーの指示する方法に従い測定した. サンプルは 560nm の吸光度で測定し，吸光度の測定には MIDROPLATE READER（Bio RAD）を使用した.

2） Real-time PCR

Osteocalcin（Oc），Alkaline Phosphatase（ALP），Receptor activator of nuclear factor-κB（RANK）-ligand（RANKL），Osteoprotegerin（OPG）遺伝子の発現について分析を行った. RNA 抽出には Trizol（Life Technologies）を用い，総 RNA 量を各サンプルで調整後，ReverTra Ace reverse transcriptase（東洋紡）と Oligo d（T）primer（東洋紡）を用いて逆転写反応を行い，EagleTaq Master Mix with RDX（ロシュ）により cDNA を合成した. real-time PCR は ABI7300（Applied Biosystems）を用いて増幅産物を定量した. mRNA の発現量は，Glyceraldehyde 3-phosohate 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），Oc（Mm00470030_m1），ALP（Mm00475834_m1），RANKL（Mm00441906_m1），OPG（Mm01205928_m1）および GAPDH（Mm99999915_g1）を用いた.

4. 統計学的分析

総蛋白質量，mRNA 発現量におけるデータは，2 群間における統計処理に Student's t-test を用いて統計学的処理を実施し，$p<0.05$ 以下を統計学的に有意とした. グラフは平均値±SD で示した.

結果

1. 総蛋白質量について

実験①における総蛋白質量は，UH 群，C 群とも経時的に増加した. UH 群は，負荷 1 日後では C 群との間に有意差を認めなかったが，負荷 2 日後および 3 日後では，C 群に比較し有意に低い値を示し，負荷 2 日後では C 群と比較し UH 群では約 70%の値であり，負荷 3 日後では約 65%であった（図 3-A）. 実験②における総蛋白質量は，OH 群，C 群とも経時的に増加し，負荷 1 日後から OH 群は C 群に比較し有意に低い値を示した. 負荷 1 日後では C 群と比較し OH 群では約 70%に, 負荷 2 日後および 3 日後では約 50%の値を示した

（図 3-B）.

2. 遺伝子発現の解析

実験①において Oc の発現は，C 群においては経時的に増加したが，UH 群では負荷 1 日後から負荷 2 日後では増加したが，負荷 2 日後から負荷 3 日後では減少し，負荷 3 日後では UH 群は C 群に比較し，有意に低い値を示した（図 4-A）．ALP の発現は，UH 群，C 群とも経時的に増加し，負荷 1，2 および 3 日後いずれの計測時点においても UH 群は C 群に比較し有意に低い値を示した（図 4-A）．RANKL の発現は，C 群においては経時的に減少したが，UH 群では経時的に増加した．負荷 1 日後では UH 群は C 群に比較し有意に低い値を示したが，負荷 2 日後および 3 日後では，UH 群は C 群に比較し有意に高い値を示した（図 4-B）．OPG の発現は，負荷 1，2 および 3 日後いずれの計測時点においても UH 群は C 群に比較し有意に低い値を示した（図 4-B）．RANKL/OPG は，C 群においては経時的に減少したが，UH 群では経時的に増加し，負荷 2 日後および 3 日後では，UH 群は C 群に比較し有意に高い値を示した（図 4-C）.

実験②において Oc の発現は，OH 群，C 群とも経時的に増加し，負荷 1 日後および 2 日後では有意差は認めなかったが，負荷 3 日後では，OH 群は C 群に比較し，有意に高い値を示した（図 4-D）．ALP の発現は，OH 群，C 群とも経時的に増加したが，負荷 1，2 および 3 日後いずれの計測時点においても OH 群は C 群に比較し有意に高い値を示した（図 4-D）．RANKL の発現については，OH 群，C 群とも経時的に減少したが，負荷 1，2 および 3 日後いずれの計測時点においても OH 群は C 群に比較し有意に低い値を示した（図 4-E）．OPG の発現については，C 群では経時的に減少したが，OH 群では継時的な変化は認めなかった．また，両群を比較しても有意差は認められなかった（図 4-E）．RANKL/OPG は，OH 群，C 群ともに経時的に減少したが、両群を比較しても有意差は認められなかった（図 4-F）.

考察

UH 群，OH 群ともに総蛋白量は，confluence 時に比較し増加したが，対照群と比較し有意に低い値を示したことから，細胞に対する圧縮力は，方向に関係なく，細胞死には至らないものの，細胞増殖を抑制することが示された．骨芽細胞の増殖と圧縮力について，長尾ら[16]は，MC3T3-E1 細胞にガラスシリンダーにて 294 Pa の持続的圧縮力を 24 時間与え，細胞増殖能に有意差はないと報告している．本研究とは，圧縮力を負荷する物質と圧縮力の大きさは異なるが，負荷する方向は同じであり，本研究における UH 群の 1 日後と同様の結果を報告している．一方，Iwasaki[28]らは，MC3T3-E1 細胞にガラスシリンダーにて 294 Pa の持続的圧縮力を 24 時間負荷し，骨芽細胞の増殖は抑制されることを報告しており，圧縮力と骨芽細胞増殖の関係について一定の見解が得られていない．今回の研究においては，1 日後から 3 日後まで増殖抑制の傾向は経時的に強くなっていることが示された．しかし，UH 群においては 1 日後では有意差が認められなかったことから，細胞に対する圧縮

力の方向は増殖に関係することが示唆された．以上から，細胞増殖には圧縮力の方向や持続期間も影響する可能性があることが示唆された．

骨芽細胞は，分化が進むとともに，ALP，Oc と順次発現していくことが報告されており[29]，培養初期に ALP の発現増加が起こり，培養後期に Oc のような骨芽細胞マーカーの増加が生じる[30]．今回の研究結果でも，対照群からは，同様の結果が得られている．しかし，UH 群では，ALP は経時的に発現が増加しているが，対照群と比較し測定したいずれの時点においても有意に低い値を示した．これは，圧縮力が負荷された場合，負荷されない場合に比較し分化における早期から後期に至るまで分化が抑制されることを示唆するものと考えられる．長尾ら[16]は，圧縮力の大きさを変化させて ALP の遺伝子発現の影響を検討し，294 Pa が最も ALP の発現を上昇させたとし，本研究の結果とは異なる報告をしている．圧縮力の大きさ，実験方法は異なるため，単純な比較は困難であるが，圧縮力の大きさについて，今後の検討課題となる．一方，RANKL は骨芽細胞から産生される破骨細胞分化誘導因子であり，その受容体である RANK を発現する破骨細胞の前駆細胞を刺激して成熟した破骨細胞へと分化誘導する破骨細胞の特異的マーカーである[31]．OPG は骨芽細胞から分泌される RANKL のおとり受容体で RANKL と RANK の結合を妨害し，破骨細胞分化を抑制する破骨細胞抑制因子である[32]．破骨細胞の分化は RANKL と OPG のバランスにより決定されると考えられている[31,32]．対照群とは全く対照的な UH 群における RANKL の経時的上昇，OPG は実験期間を通して対照群と比較し有意に低いこと，さらには RANKL/OPG の経時的上昇から，持続的圧縮力は，骨芽細胞による破骨細胞抑制を低下させ，破骨細胞分化の誘導を促進することが示唆された．Koyama ら[17]は，Saos-2 細胞にガラスプレートにて 24 時間，直接圧縮力を作用させた場合に，RANKL などの破骨細胞分化誘導因子が増加し，破骨細胞分化が促進されることを報告している．上記報告[17]は，圧縮力の負荷後，最大 24 時間までの観察であるが，本研究では経時的に 3 日後までの経過を観察し，骨芽細胞の増殖と分化の抑制，骨芽細胞による破骨細胞抑制の低下，破骨細胞分化の促進誘導という同様の結果を得た．

圧縮力の方向に対する影響を検討するため，Hap ブロック上で細胞を培養後，反転し持続的圧縮力を作用さる OH 群を作成した．OH 群においては，Oc，ALP は対照群と同様に経時的に増加したが，Oc では 3 日後，ALP ではいずれの計測時点においても対照群と比較し有意に高い値を示した．Oc ならびに ALP 発現の増加は，圧縮力の方向を変えると骨芽細胞の分化が促進されることを示唆している．RANKL も対照群と同様の経時的な変化を示すとともに，いずれの計測時点においても対照群と比較し有意に低い値を示し，破骨細胞分化の抑制が示唆されたが，RANKL/OPG の結果からは有意差を認めず，骨芽細胞と破骨細胞のバランスから骨吸収能において差がないことが示唆された．しかし，本実験については圧縮力の方向だけではなく，細胞が接着する基質の違い，即ち UH 群ではポリスチレン，OH 群では Hap ブロックに細胞が接着しており，その影響も考慮する必要がある．飯島ら[33]は，MC3T3-E1 細胞について滑面と粗面の Hap とポリスチレンを比較し，滑面 Hap は

細胞の増殖を促進するが，ALP 活性については同様であると報告している．この結果からは，本研究における ALP の遺伝子発現の増加は，Hap という基質の違いだけではなく，細胞付着面に対する圧縮力の方向が影響を与える可能性が考えられる．つまり，UH 群では MC3T3-E1 細胞はポリスチレンディッシュ側に細胞付着しており，圧縮力は細胞付着面の反対側から加わり，OH 群では MC3T3-E1 細胞は Hap ブロック側に細胞付着しており，細胞付着面側から圧縮力が加わると考えられ，UH 群と OH 群では異なる力が働いたため，異なる結果が得られたのではないかと示唆される．基質の違いによる影響を検討するため，今後，Hap 上で培養した細胞に Hap を反転して圧縮力を負荷するといった研究も必要であろう．

メカニカルストレスに関係する研究として圧縮とは逆の伸展力を与えた研究も数多くなされている．白川ら[34]は周期的伸展力をヒト歯根膜細胞に加えることにより，骨芽細胞への分化の促進が確認されたと報告しており，川島ら[35]はマウス頭蓋冠縫合部の細胞に持続的張力を負荷することにより，骨芽細胞の分化の促進を報告している．柄澤ら[24]は MC3T3-E1 細胞に周期的伸展力を加えることによって，RANKL 発現減少を介して破骨細胞の分化を抑制すると報告している．これらの伸展力を負荷した実験の結果は，本研究の OH 群の結果と同様の傾向を示すことは興味深く，メカニカルストレスの方向についてさらなる詳細な検討が必要と考えられる．

結論

マウス骨芽細胞様細胞 MC3T3-E1 細胞に，Hap ブロックを用いて直接持続的な圧縮力を加え，総蛋白質量を測定するとともに，Oc，ALP，RANKL，OPG の mRNA 発現量を分析し，以下の結果を得た．

1．MC3T3-E1 細胞に Hap ブロックを用いて直接持続的な圧縮力を加えると細胞増殖が抑制されることが示された．
2．MC3T3-E1 細胞に Hap ブロックを用いて直接持続的な圧縮力を加えることにより，圧縮力の方向は骨芽細胞分化と破骨細胞分化に影響を与え，骨形成に関する機能発現に影響を与えることが示唆された．

謝辞

本稿を終えるにあたり、本研究に数々の御援助、御協力を賜りました北海道大学大学院歯学研究科口腔機能学講座口腔機能補綴学教室ならびに口腔病態学講座細胞分子薬理学教室の緒先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

1) Rubin J, Rubin C, Jacobs CR: Molecular pathways mediating mechanical signaling in bone. Gene 367：1-16, 2006.

2) Iqbal J, Zaidi M: Molecular regulation of mechanotransduction. Biochem Biophys Res Commun 328 : 751-755, 2005.
3) Leblanc AD, Schneider VS, Evans HJ, Engelbreston DA, Krebs JM: Bone mineral loss and recovery after 17 weeks of bedrest. J Bone Miner Res 5 : 843-850, 1990.
4) Bassey EJ, Ramasdale SJ: Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. Osteoporosis Int 4 : 72-75, 1994.
5) Smith EL, Gilligan C: Exercise and bone mass. In: Deluca HF, Mazess R (eds) Osteoporosis : Physiological Basis, Assesment and Treatment. Elsevier Science New York : 285-293, 1990.
6) Eisman JA, Kelly PJ, Sambrook PN, Pocock NA, Ward JJ, Yeates MG: Physical activity and bone mass. In: Deluca HF, Mazess R (eds) Osteoporosis : Physiological Basis, Assesment and Treatment. Elsevier Science New York : 277-283, 1990.
7) Frost HM: Bone " mass" and the "mechanostat" a proposal. Anat Rec 219 : 1-9, 1987.
8) Miyata T, Kobayasi Y, Araki A, Motomura Y, Shin K: The influence of controlled occlusal overload on periimplant tissue : A histologic study in monkeys. Int J Oral Maxillofac Implants 13 : 677-683, 1998.
9) Cavolina JM, Evans GL, Harris SA, Zhang M, Westerlind KC, Turner RT: The effects of orbital spaceflight on bone histomorphometry and messenger ribonucleic acid levels for bone matrix proteins and skeletal signaling peptides in ovariectomized growing rats. Endocrinology 138 : 1567-1576, 1996.
10) Jagger CJ, Chow JWM, Chambers TJ: Estrogen suppreses activation but enhances formation phase of osteogenic response to mechanical stimulation in rat bone. J Clin Invest 98 : 2531-2537, 1996.
11) Inoue D, Kido S, Matsumoto T: Transcriptional induction of fosB/ΔfosB gene by mechanical stress in osteoblasts. J Biol Chem 279 : 49795-49803, 2004.
12) Kapur S, Baylink DJ, Lau KHW: Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathway. Bone 32 : 241-251, 2003.
13) Tanaka SM, Sun HB, Roeder RK, Burr DB, Turner CH, Yokota H: Osteoblast responses one hour after load-induced fluid flow in a three- dimensional porous matrix. Calcif Tissue Int 76 : 261-271, 2005.
14) Yamaguchi N, Chiba M, Mitani H: The induction of c-fos mRNA expression by mechanical stress in human periodontal ligament cells. Arch Oral Biol 47 : 465-471, 2002.
15) Wong M, Siegrist M, Goodwin K: Cyclic tensile strain and cyclic hydrostatic pressure differentially regulate expression of hypertrophic markers in primary

chondrocytes. Bone 33：685-693, 2003.
16) 長尾　大輔: 骨芽細胞様細胞における持続的圧縮力による heat shock protein25 の発現誘導. 四国歯誌 19：93-104, 2006.
17) 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-2cells. Arch Oral Biol 53：488-496, 2008.
18) 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.
19) Genetos DC, Geist DJ, Liu D, Donehue HJ, Duncan RL: Fluid shear-induced ATP secretion mediates prostaglandin release in MC3T3-E1 osteoblasts. J Bone Miner Res 20：41-49, 2005.
20) Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, Mayahara K, Yanagisawa M, Otsuka K, Shimizu N: Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E2 production appropriately. Life Sci 77：3168-3182, 2005.
21) Fitzgerald J, Hughes-Fulford M: Mechanically induced c-fos expression is mediated by cAMP in MC3T3-E1 osteoblasts. FASEB J 13：553-557, 1999.
22) 藤澤　健司, 舘原　誠晃, 湯浅　哲也, 桃田　幸弘, 山内　英嗣, 宮本　洋二: 即時加重インプラントに関する臨床的検討：3 年経過時の臨床成績. 日本口腔インプラント学会会誌 21：563-569, 2003.
23) Karasawa Y, Tanaka H, Nakai K, Tanabe N, Kawato T, Maeno M,　Shimizu N: Tension force downregulates matrix metalloproteinase expression and upregulates the expression of their inhibitors through MAPK signaling pathways in MC3T3-E1 cells. Int J Mol Sci 12：905-913, 2015.
24) Denissen HW, Groot K: Immediate dental root implants from synthetic dense calcium hydroxyapatite. J Prosthet Dent 42：551-556, 1979.
25) 森脇 豊: ハイドロキシアパタイトの生体材料としての応用(1), 日本歯科評論 512：187-197, 1984.
26) Sudo H, Kodama H, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S: In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. J Cell Biol 96：191-198, 1983.
27) Kuboki Y, Kudo A, Mizuno M, Kawamura M: Time-dependent changes of collagen cross-links and their precursors in the culture of osteogenic cells. Calcif Tissue Int 50：473-480, 1994.
28) Iwawaki Y, Mizusawa N, Iwata T, Higaki N, Goto T, Watanabe M, Tomotake Y,

Ichikawa T, Yoshimoto K: MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells. J Biosci Bioeng 120：456-462, 2015.

29) Ikeda T, Nomura S, Yamaguchi A, Suda T, Yoshiki S: In situ hybridization of bone matrix proteins in undecalcified adult rat bone sections. J Histochem Cytochem 40：1079-1088, 1992.

30) Torii Y, Hitomi K, Yamagishi Y, Tukagoshi N: Demonstration of alkaline phosphatase participation in the mineralization of osteoblasts by antisense RNA approach. Cell Biol Int 20：459-464, 1996.

31) Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N, Suda T: Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogensis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 95：3597-3602, 1998.

32) Mizuno A, Amizuka N, Irie K, Murakami A, Fujise N, Kanno T, Sato Y, Nakagawa N, Yasuda H, Mochizuki S, Gomibuchi T, Yano K, Shima N, Washida N, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Ozawa H: Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. Biochem Biophys Res Commun 247：610-615, 1998.

33) Iijima K, Itakura Y, Ohno T, Kodama H, Amagai Y, Sudo H, Yamamoto S: Study on the biocompatibility of hydroxyapatite by an osteogenic MC3T3-E1 cell line. Oral Biol 28：170-176, 1986.

34) 白川　哲: ヒト歯根膜由来細胞の分化に与える周期的進展力の影響. 日本歯周病学会会誌 48：113-122, 2006.

35) 川島　博行: メカニカルストレスにより誘導される骨芽細胞の分化と骨形成. 新潟歯学会雑誌 30：173－182, 2000.

図1

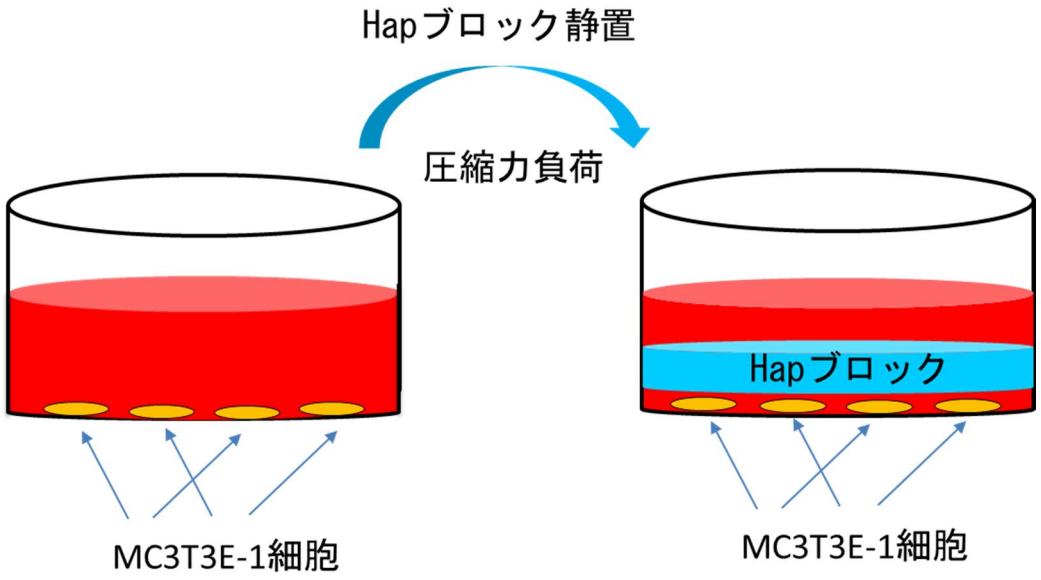


図2

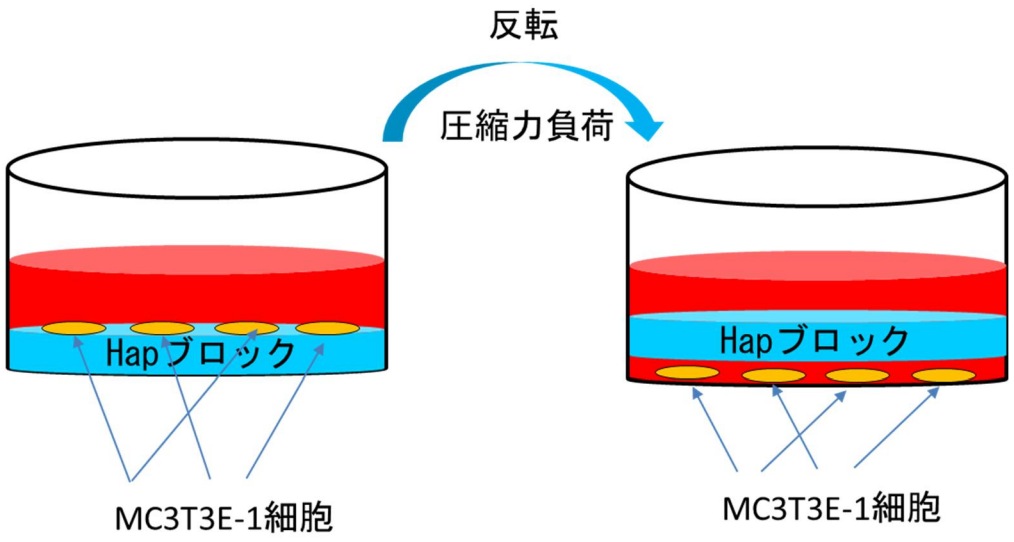


図3-A

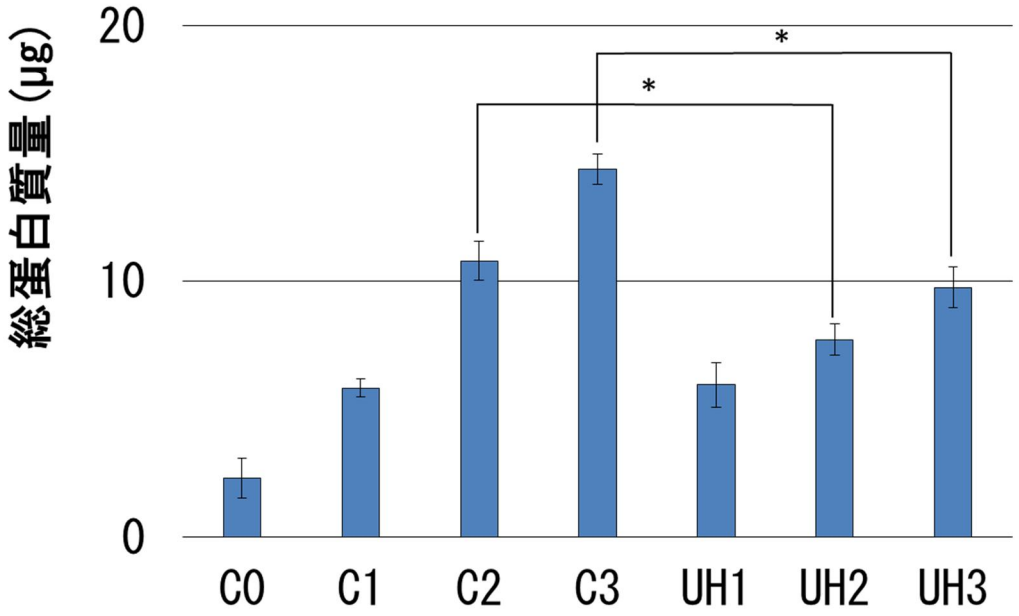


図3-B

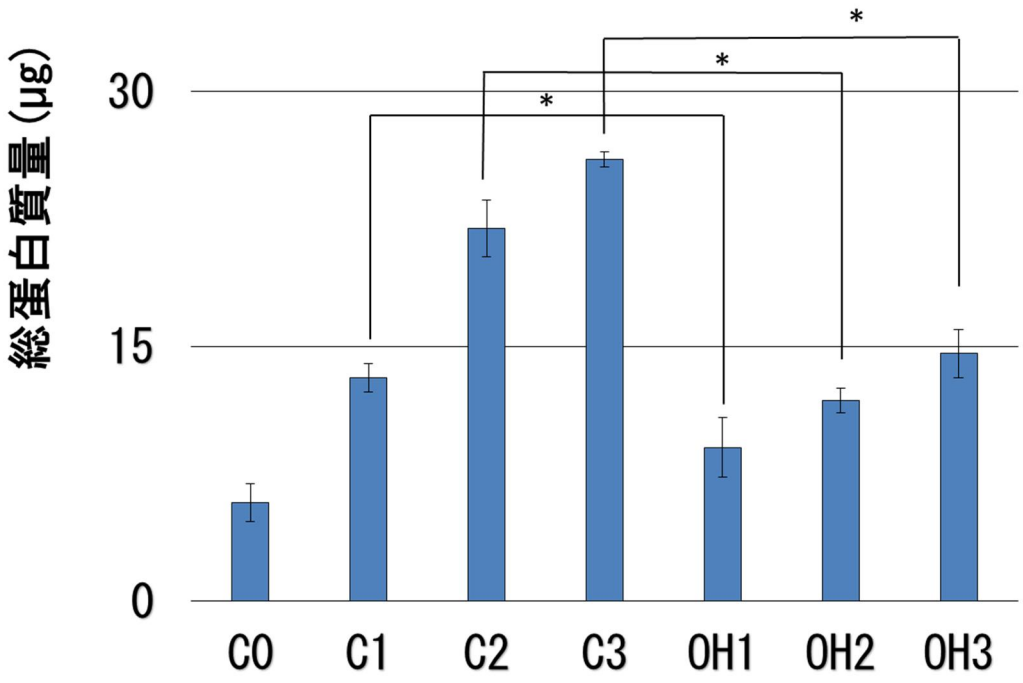


図4-A

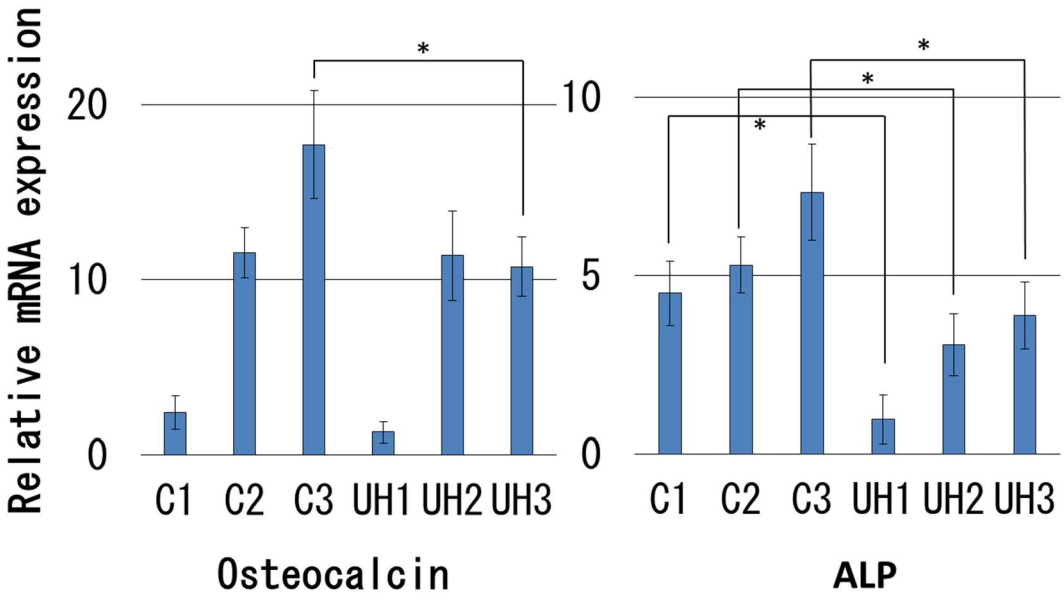

Relative mRNA expression
20
10
0
*
C1
C2
C3
UH1
UH2
UH3
Osteocalcin
10
5
0
*
*
*
C1
C2
C3
UH1
UH2
UH3
ALP

図4-B

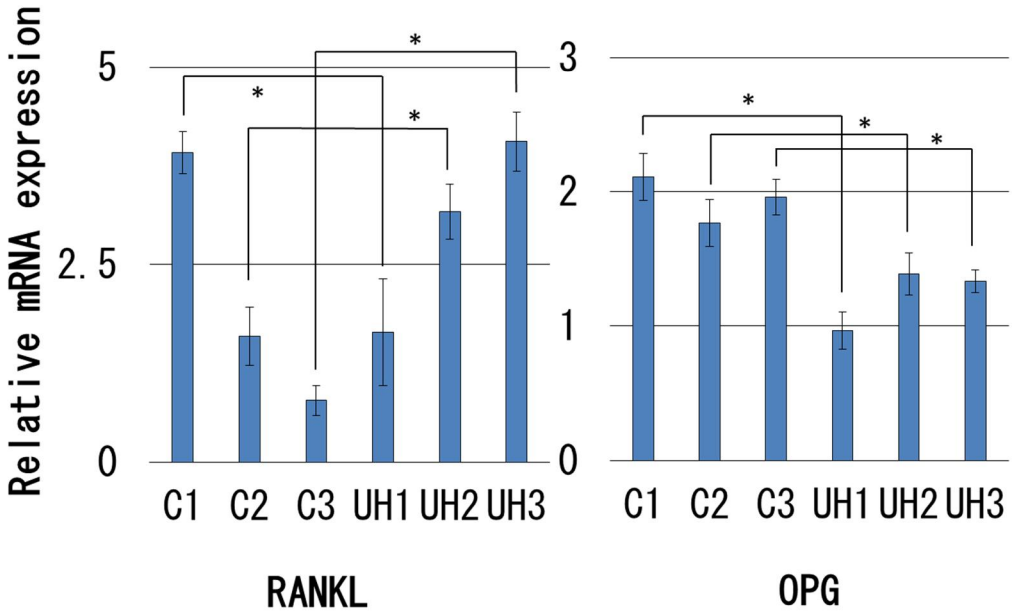

Relative mRNA expression
5
2.5
0
3
2
1
0
*
*
*
*
*
*
C1
C2
C3
UH1
UH2
UH3
C1
C2
C3
UH1
UH2
UH3
RANKL
OPG

図4-C

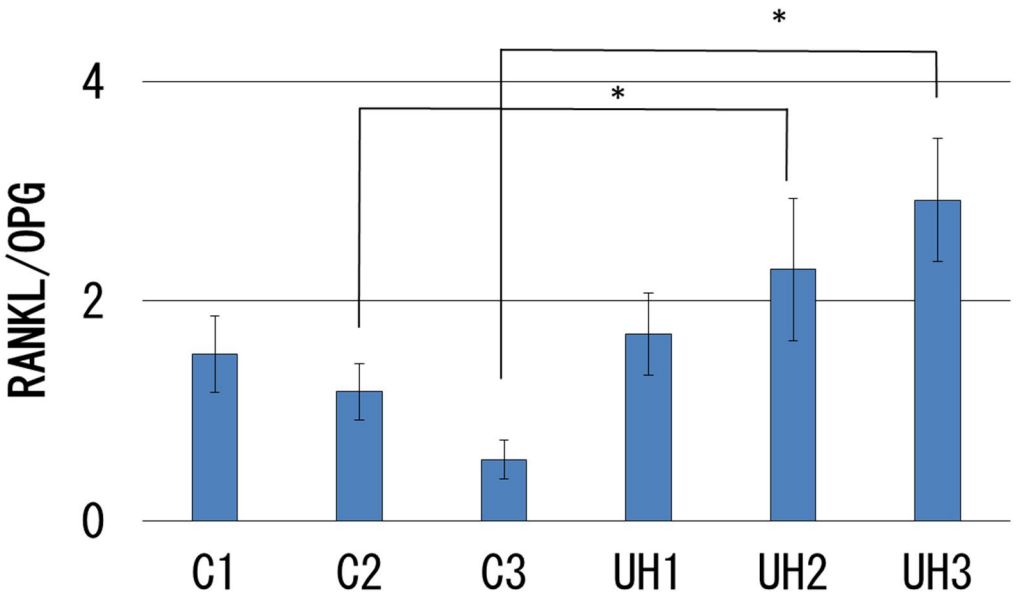


図4-D

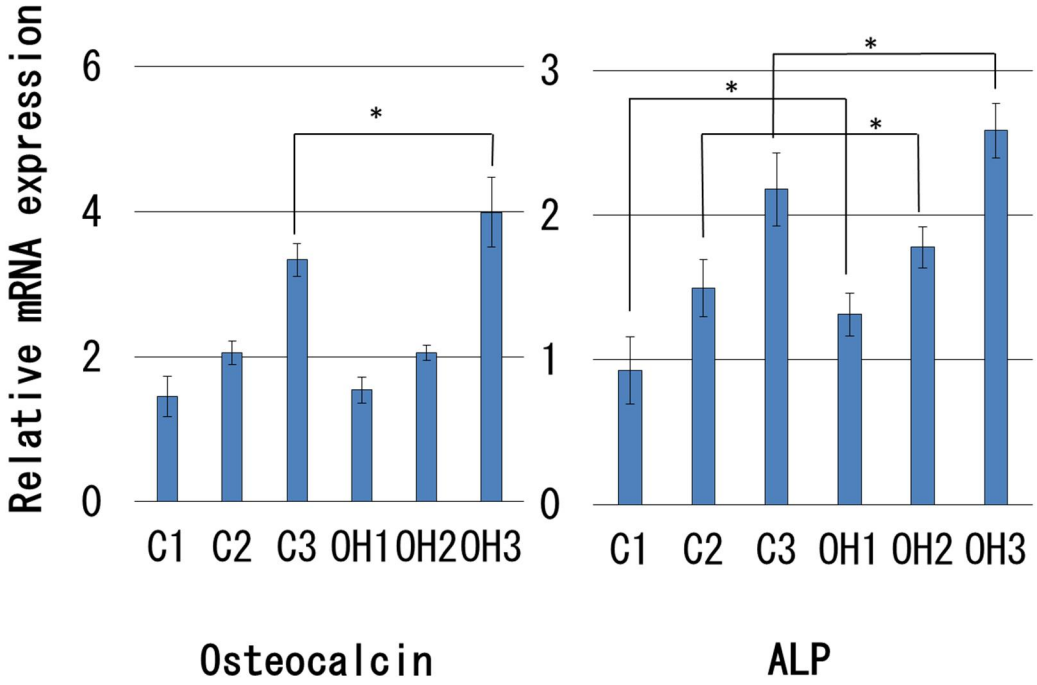

Relative mRNA expression
6
4
2
0
3
2
1
0
*
*
*
*
C1
C2
C3
OH1
OH2
OH3
C1
C2
C3
OH1
OH2
OH3
Osteocalcin
ALP

図4-E

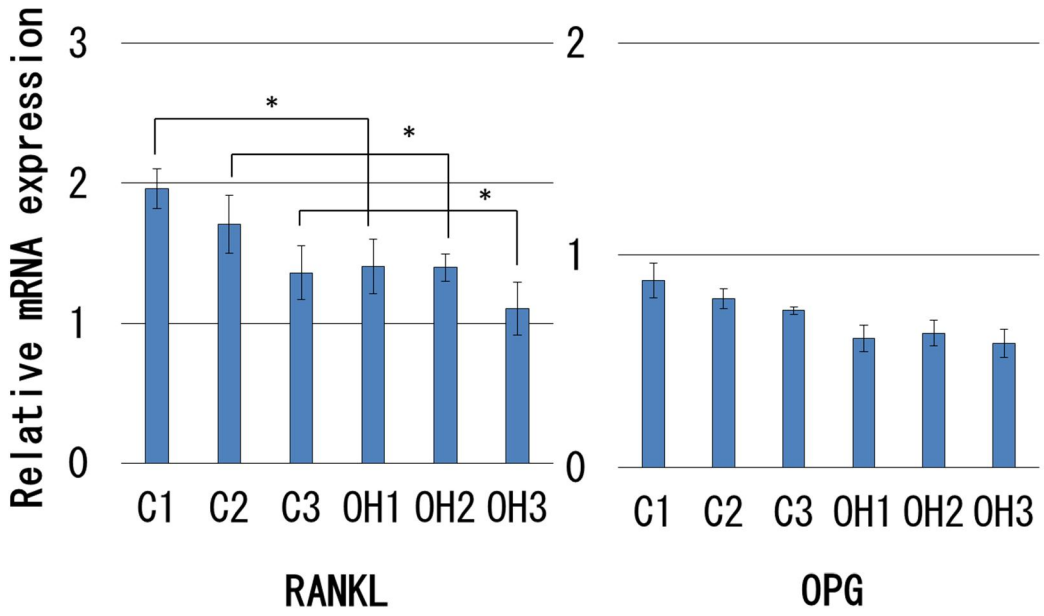
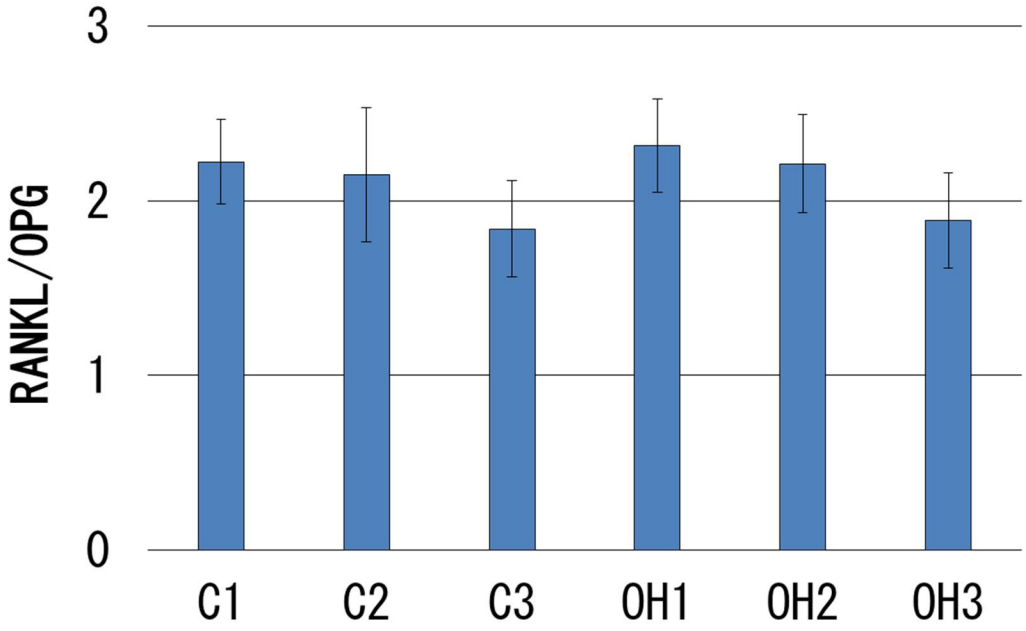

Relative mRNA expression
3
2
1
0
*
*
*
C1
C2
C3
OH1
OH2
OH3
RANKL
2
1
0
C1
C2
C3
OH1
OH2
OH3
OPG

図4-F



付図説明

図 1．実験①における培養方法

図 2．実験②における培養方法

図 3．実験①，②における総蛋白質量測定の結果

Hap ブロックを静置することにより持続的に圧縮力を負荷したものを UH 群とした．Hap ブロックを反転することにより持続的に圧縮力を負荷したものを OH 群とした．対象群としてポリスチレンディッシュ上で培養したものを C 群とした．圧縮力負荷後，1，2 および 3 日間培養し，それぞれ，UH1，UH2，UH3，OH1，OH2，OH3 とした．圧縮力負荷せず，1，2 および 3 日間培養し，それぞれ，C1，C2，C3 とした．

mean±SD，n＝4，$p<0.05$（＊）

A．実験①における総蛋白質量の経時的変化

B．実験②における総蛋白質量の経時的変化

図 4．実験①，②における各種 mRNA の発現状況

A．実験①における Osteocalcin，ALP 遺伝子の発現状況

B．実験①における RANKL，OPG 遺伝子の発現状況

C．実験①における RANKL/OPG 遺伝子の発現状況

D．実験②における Osteocalcin，ALP 遺伝子の発現状況

E．実験②における RANKL，OPG 遺伝子の発現状況

F．実験②における RANKL/OPG 遺伝子の発現状況

mean±SD，n＝4，$p<0.05$（＊）