HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	圧縮力は培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する
Author(s)	宮上, 雄希
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第12147号
Issue Date	2016-03-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12147
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/67111
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Miyakami.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文

圧縮力は培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する

平成２８年３月申請

北海道大学

大学院歯学研究科口腔医学専攻

宮　上　雄　希

抄録：歯科矯正力により歯牙には牽引側では伸展力が，圧迫側では圧縮力が作用する．我々は破骨細胞に直接圧縮力を加えた際の影響について報告しているが，破骨細胞に圧縮力を加えた後，長期的に培養した場合の動態については未だ報告がない．本研究では，破骨細胞に圧縮力を加え，長期的に培養して分化誘導系に与える影響を検討した．RANKL 添加培養液を用いて RAW264.7 細胞を 7 日間培養し，破骨細胞数の推移を観察した．培養 6 日目までは破骨細胞数は増加したが，それ以降は減少傾向を示した．次に培養 3 日目に圧縮力を破骨細胞に加え 24, 48 および 72 時間培養した. 圧縮力を加えず培養したものを対照群，圧縮力を 24 時間加えた後それを解放して培養したものを解放群，圧縮力を加えたまま培養したものを圧縮群とした. 培養 3 日目から 24 時間圧縮力を加えると，破骨細胞数は増加した．培養 5 日目の時点では解放群，圧縮群では対照群と比較して増加した．しかし，解放群，圧縮群の間に有意差が認められなかったことから，24 時間以上圧縮力を加えても破骨細胞の分化・融合を促進しない可能性が示唆された．培養 6 日目の時点では，解放群，圧縮群では対照群と比較して破骨細胞数が減少した．また培養 5 日目から 6 日目の間において対照群では破骨細胞数が増加したが，他の群では減少した．これらの結果より，圧縮力は培養後期における破骨細胞の分化・融合を抑制する可能性が示唆された．対照群と圧縮群の破骨細胞関連遺伝子である NFATc1, RANK, TRAP, DC-STAMP および OC-STAMP の mRNA 発現量を比較すると，培養 4 日目の時点では有意差が認められなかったが，培養 5 日目の時点では圧縮群ではそれらすべての発現が有意に抑制されていた．以上より，圧縮力は培養後期において破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することで破骨細胞の分化・融合を抑制することが示唆された.

緒言

歯科矯正治療の目的は個性正常咬合の確立，すなわち個人にとって最も適切な咬合を確立することである．矯正力は牽引力や圧縮力といったメカニカルストレスを発生し，それは歯根膜や歯槽骨のリモデリングを引き起こす要因となる [1)]．歯科矯正治療による歯の移動は，メカニカルストレスに対する歯周組織の生物学的な反応としてとらえることができる．矯正力が歯に加わると歯の周囲の歯槽骨に骨改造が生じ，歯が移動する [2)]．力が作用する方向に対応する歯根膜には圧縮力が加わり歯槽骨は吸収されるが，その反対側では歯根膜には牽引力が加わり歯槽骨の形成が生じる [3)]．歯周組織には，線維芽細胞，骨芽細胞，破骨細胞などさまざまな細胞が存在しており，これらの矯正力などメカニカルストレスに対する反応が骨の吸収および形成に関与していることが骨のリモデリングが生じる背景となっている [4)].

これまでにメカニカルストレスに対する歯周組織の細胞の反応に関して成長因子やサイトカインなど情報伝達物質の関与を遺伝子レベルで解明しようとする研究が数多く報告されてきた．適応されてきたメカニカルストレスもさまざまであり，伸縮刺激[5-7]，圧縮力[8-12]，静水圧[13]，回転圧[14]，機械的振動[15]などがある．骨芽細胞に圧縮力を加えた場合，PGE_2や炎症性サイトカインの発現量が増加し，RANKL, M-CSF といった破骨細胞が分化・融合を促進するために重要な因子は増大したと報告されている[16,17]．また，歯根膜細胞に圧縮力を加えた場合，PGE_2や RANKL の発現量が増大し，破骨細胞形成が促進すると報告されている[18]．

早川らは培養 4 日目から破骨細胞に 24 時間圧縮力を加えると破骨細胞の分化・融合が促進したと報告した[19]．その背景として圧縮力を加えて 3 時間後に破骨細胞に関係する遺伝子の mRNA の発現量が増加したことが挙げられている[19]．破骨細胞は造血幹細胞から分化した単球・マクロファージ系の多核巨細胞であり，単核の前駆細胞の融合により形成される[20-23]．破骨細胞前駆細胞は M-CSF の受容体である Fms および RANKL の受容体である RANK を発現している[24]．RANKL は TNF ファミリーの一員であり，骨芽細胞や間質細胞から分泌される膜貫通タンパクであり，RANK と結合する[25]．骨芽細胞は破骨細胞の分化に必須な因子である M-CSF と RANKL を発現しており，前駆細胞はこれらの刺激を受け単核の前破骨細胞に分化する[26-28]．さらに融合因子である DC-STAMP や OC-STAMP を介していくつかの前破骨細胞が融合し多核の成熟破骨細胞を構成する[29-31]．成熟破骨細胞も RANK を発現しており，RANKL の刺激により骨吸収活性を発現する[22]．活性化した破骨細胞は骨吸収を行い，やがてアポトーシスにより細胞死に至る．破骨細胞の寿命は短く培養しても 7 日目以降は細胞死により減少していく[5,32,33]．そのため，破骨細胞を長期的に培養すると細胞死の影響を受けるため，これまで破骨細胞に圧縮力を加えた後，長期的に培養して分化誘導系に与える影響を明らかにした報告はなかった．

このような背景から本研究では細胞死の影響を受けないようにするため，培養 3 日目に破骨細胞に圧縮力を加えた後，長期的に培養した場合における圧縮力が分化誘導系に与える影響を調査することを目的とした．

材料と方法

1. 細胞の培養

マウス腹水由来の単球マクロファージである RAW264.7 細胞（RAW 細胞：ATCC no. TIB-71TM; Manassas, VA）を破骨細胞の前駆細胞として使用した．RAW 細胞は RANK を発現しており, M-CSF の刺激が無くても RANKL の刺激により破骨細胞に分化することができる[5]．10 %牛胎児血清（Invitrogen,

Carlsbad, CA）と 66.7 μg/ml 硫酸カナマイシン（Meiji Seika, Tokyo, Japan）を含む Dulbecco's modified Eagle's 培地（D-MEM: Wako Pure Chemical, Osaka, Japan）を用いて培養した. 細胞を 100 mm スタンダードディッシュ（BD Falcon, Franklin Lakes, NJ）上の培地の中で，37 ℃，5 %CO_2-95 %気相下にて一晩培養し, 0.48 mM EDTA 含有 Dulbecco's phosphate-buffered saline（Ca^{2+}, Mg^{2+}不含）で洗浄後，細胞を回収した．直径 12 mm のカバーガラス（Fisher Microscope Cover Glass; Fisher Scientific, Pittsburgh, PA）を 24 穴マルチウェルプレート（BD Falcon, Franklin Lakes, NJ）の各ウェルに置き，RAW 細胞を 1 ウェルあたり 1.0 × 10^4 個の細胞密度で播種した．破骨細胞を誘導するために, 細胞を 10 %牛胎児血清, 2 mM L-アラニルーL-グルタミン（Wako Pure Chemical），284 μM L-アスコルビン酸 2−リン酸（Sigma-Aldrich, St. Louis, MO）, 66.7 μg/ml 硫酸カナマイシンおよび 50 ng/ml RANKL（Oriental Yeast Corp, Tokyo, Japan）を含む α-minimum essential 培地（α-MEM; Wako Pure Chemical）を用いて 37 ℃，5 %CO_2－95 %気相下にて培養した．プレートに RAW 細胞を播種した日を培養 1 日目とした．培養液は培養 2 日毎に交換した．

2. コラーゲンゲルの準備

氷で冷却され 4 ℃に保たれている容器内で，コラーゲン溶液（Cellmatrix, Nitta Gelatin Inc., Osaka, Japan），10 倍濃度の α-MEM，再構成緩衝液（2.2 g $NaHCO_3$ + 4.77 g HEPES in 100 ml of 0.05 N NaOH）を 8 : 1 : 1 の割合で混合し, さらに細胞に培養液の成分を介在させるために 10 %牛胎児血清, 2 mM L-アラニルーL-グルタミン，284 μM L-アスコルビン酸 2−リン酸を培養液と同じ比率で加えた．この混合液を 24 穴マルチウェルプレートの各ウェルに 500 μl ずつ撒き，37 ℃に保たれた CO_2インキュベーター内で 30 分間加温した．以上の過程を経てコラーゲンゲルを作成し，その後，各ウェルに 50 ng/ml RANKL 添加培養液を 1.0 ml 添加した.

3. 圧縮力の適応と解放

培養 3 日目までカバーガラス上で RAW 細胞を培養してから, 以下のようにして培養した．カバーガラスを反転してあらかじめ別の 24 穴マルチウェルプレートに用意しておいたコラーゲンゲルの上に置いた．この状態で培養したものを対照(control)群とした．その上に 7 枚カバーガラスを重ねた荷重を加えることで圧縮力を加えた. この状態のままで培養したものを圧縮(CF)群とした. また, これらとは別に 24 時間圧縮力を加えた後，荷重を除去して培養した．これを解放(CF→off)群とした（図 1）.

4. 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）陽性細胞数の計測

細胞を各条件のもとで一定期間培養した後，10 %中性ホルマリンにて固定した．その後，蒸留水で洗浄し，Fast Red Violet LB Salt（Sigma Aldrich）を含む TRAP 染色液（pH 5.0）を用いて TRAP 染色した. 染色した破骨細胞のうち，2 から 7 核のものを小型破骨細胞，8 核以上のものを巨大破骨細胞として，これらの数を光学顕微鏡を使用して計測した.

5. 逆転写反応と realtime-PCR

培養 3 日目から 24, 48 時間後に細胞から Trizol（Invitrogen, Carlsbad, CA）を用いて RNA を回収した．Rever Tra Ace-α FSK-101 （Toyobo, Osaka Japan）にて逆転写反応を行い，1.0 μg の RNA から cDNA を合成した．Realtime-PCR は ABI7300 を用いた．プライマー（Applied Biosystems, Carlsbad, CA）は以下のものを使用した．Nuclear factor of activated T cell c1（NFATc1）（Mm00479445_m1）, RANK （Mm00437135_m1）, TRAP（Mm00475698_m1）, dendritic cell specific trans membrane protein（DC-STAMP）(Mm01168058_m1)，osteoclast stimulatory trans membrane protein （ OC-STAMP ） （ Mm00512445_m1）お よ び GAPDH（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）(Mm99999915_g1）である．各サンプルの遺伝子の発現量は GAPDH の発現量を用いて標準化して $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法にて計算した.

6. 統計学的分析

すべての結果は平均値±S.D.で示した．2 群間における統計処理には，Student's *t*-test.を行った．$p<0.05$ のとき統計的に有意差があるとした.

結果

1. TRAP 陽性破骨細胞数の変化

RAW 細胞から誘導された破骨細胞の動態を調査するために，24 穴マルチウェルプレート上で RAW 細胞を RANKL 添加培養液を用いて培養した．培養を開始した日から 7 日目までの間, 24 時間おきに破骨細胞を 10 %中性ホルマリンで固定して，総破骨細胞数および核数別の破骨細胞数を計測した．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．培養 2 日目には破骨細胞は認められなかった．破骨細胞は 3 日目から 6 日目にかけて増加が認められたが，6 日目から 7 日目の間に減少傾向を示した（図 2A）．また，8 核以上の巨大破骨細胞は培養 4 日目から 6 日目にかけて増加が認められたが, 6 日目から 7 日目の間に減少傾向を示した(図 2B).

2. 24, 48 および 72 時間加えた圧縮力が破骨細胞形成に与える影響

圧縮力が破骨細胞の分化・融合に与える影響について調査した．培養 3 日目までカバーガラス上で破骨細胞を培養した後，control, CF→off および CF 群を 24, 48 および 72 時間培養した．その後，破骨細胞数を計測した．

図 2 より，破骨細胞は培養 6 日目以降減少するため，それ以上の期間に及ぶ培養日程では圧縮力が破骨細胞の分化・融合に与える影響を評価するのが困難であると考え，圧縮力を加えるタイミングを早川らの方法[19]より 1 日早めて，すなわち培養 3 日目に圧縮力を加えて, 6 日目で実験が終了するように実験日程を調整した．

培養 4 日目の時点においては，control 群と比較して CF 群のほうが総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数が有意に増加した（図 3A, B）．培養 5 日目の時点においては，これらは CF, CF→off 群では，control 群と比較して有意に増加した．一方, CF, CF→off 群の間には有意差が認められなかった（図 4A-C）．培養 6 日目の時点においては，これらは CF, CF→off 群では，control 群と比較して有意に減少した（図 5A-C）．破骨細胞数の推移に着目すると，培養 4 日目から 5 日目の間においては，いずれの群でも総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数が増加した．培養 5 日目から 6 日目の間においては，これらは control 群では増加したが，他の群では減少した（図 6A, B）．

3. 破骨細胞関連遺伝子の発現

破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現に対する圧縮力の影響を調査するためにリアルタイム PCR を行った．破骨細胞関連遺伝子の中でも，NFATc1, RANK, TRAP, DC-STAMP および OC-STAMP について調査を行った．培養 3 日目から 24 時間後の時点においては，control 群と CF 群の間に有意差は認められなかった．培養 3 日目から 48 時間後の時点においては，いずれの破骨細胞関連遺伝子においても CF 群は control 群と比較して有意に抑制された（図 7）．

考察

本研究では，破骨細胞に圧縮力を加えた後，長期的に培養することに初めて成功した．また圧縮力は培養後期において破骨細胞に関連するさまざまな遺伝子の発現を抑制し，破骨細胞の分化・融合を抑制することが明らかになった．

図 2 の示す結果から RANKL が添加された RAW 細胞は培養 3 日目から破骨細胞形成を開始し，6 日目まで増加し，それ以降は減少傾向を示した．これまでの研究では RAW 細胞から誘導される破骨細胞は培養 3 日目に現れ，6 日目まで増加し続け，それ以降は細胞死により減少することが報告されている[5,32,33]．早

川らは, 4 日目から 5 日目の間に総破骨細胞数の増加および破骨細胞の多核化が最も進行したことから，この期間が圧縮力を加えるのに最適な時期であるとした [19]．しかしながら，本研究の目的は圧縮力を加えた後，長期的に培養した場合における，圧縮力が分化誘導系に与える影響を調査することである．最初の実験より，6 日目以降においては圧縮力が破骨細胞の分化・融合に与える純粋な影響を判定することが困難であると考えた．また，破骨細胞は 3 日目以降に分化・融合を開始するので，3 日目以降であれば破骨細胞の分化・融合に圧縮力の影響が及ぶものと考えた．したがって圧縮力を加えた後，長期的に培養した際の圧縮力が破骨細胞の分化・融合に与える影響を評価するためには培養 3 日目が圧縮力を加える最も適切な時期であると判断した．

コラーゲンゲル（Cellmatrix）は組織培養のために開発されたゲルで，さまざまな細胞を培養するために使用されてきた．以前の研究より，コラーゲンゲルの層は圧縮力が破骨細胞に適応されたときの歯根膜のような緩衝材として機能することがわかった [19]．ガラス板を反転した状態でも細胞に培養液の成分を介在させるため，コラーゲンゲルに培養液の成分を混和した．このような方法で早川らはコラーゲンゲルを使用して破骨細胞に圧縮力を加えつつ培養することに成功している [19]．本研究でもコラーゲンゲルを同様に使用して，栄養不足による細胞死を防いで細胞を長期的に培養することができた．

圧縮力を加える前に，カバーガラス上で破骨細胞を培養した．多くの細胞はガラスやプラスチックのような基質に接着することで増殖することができる．破骨細胞もこの接着依存性を有しており，インテグリンを介した骨への接着により骨吸収活性を示す [34]．また，破骨細胞前駆細胞を培地中で浮遊状態を維持しながら培養すると，前駆細胞は成熟した破骨細胞に分化できず，分化するためにはインテグリンを介した接着シグナルが必須であると報告されている [28]．カバーガラスを反転してコラーゲンゲル上に載せた状態でも破骨細胞はカバーガラス上に接着した状態を維持して分化・融合を続けた．培養後はカバーガラスを別のプレートに移したが，破骨細胞は剥がれることなく接着しており，TRAP 染色して破骨細胞数を計測したり，Trizol を使用して RNA を回収したりすることができた．

早川らはさまざまな重さの荷重（3–14 枚のカバーガラス）を加えて破骨細胞数に与える影響を調査した際，24 時間後において総破骨細胞数は 7 枚載せた時に最も増加したことから，これを至適圧縮力とした [19]．本研究ではこの結果を参考にして，同様にカバーガラスを 7 枚重ねたものを荷重として使用した．

培養 3 日目から 24 時間圧縮力を加えると，破骨細胞数は control 群よりも有意に増加した．この結果より 24 時間の圧縮力は破骨細胞の分化・融合を促進することが示唆された．早川らは 4 日目から 24 時間至適圧縮力を加えると破骨細

胞の分化・融合が促進したと報告した[19]．今回の研究では，培養 3 日目に圧縮力を加えてもこれと同様の傾向が認められた．図 4 が示すように培養 5 日目の時点における破骨細胞数は CF, CF→off 群では control 群と比較して有意に増加した．一方，CF, CF→off 群の間に有意差は認められなかった．図 6 が示すようにいずれの群でも 4 日目から 5 日目の間に破骨細胞数は同様に増加した．これらの結果から，24 時間以上圧縮力を加えても破骨細胞の分化・融合が促進しない可能性が示唆された．図 5 が示すように培養 6 日目の時点における破骨細胞数は，CF, CF→off 群では，control 群と比較して有意に減少した．また，図 6 が示すように培養 5 日目から 6 日目の間において破骨細胞数は control 群では増加したが，他の群では減少した．池田らは 4 日目から同様に 24 時間圧縮力を加えた後，荷重を除去し，ガラス板を再度反転させて 24 時間培養した際，培養 5 日目から 6 日目の間において，圧縮群（本実験における CF→off 群に相当）における破骨細胞数の増加が対照群と比較して有意に抑制されたことから圧縮力の解放が破骨細胞の分化・融合を減弱したと報告した[35]．本実験でも培養 5 日目から 6 日目の間において同様の傾向が認められたが, CF 群においても control 群と比較して有意に破骨細胞数が減少した．この結果は圧縮力を解放することが破骨細胞の分化・融合を抑制するというよりも，圧縮力を加えることが培養後期における破骨細胞の分化・融合に抑制的に影響を与えていると考えるのが妥当であろうと考えられる．

本研究ではリアルタイム PCR を行い, 破骨細胞関連遺伝子の中でも, NFATc1, TRAP, RANK, DC-STAMP および OC-STAMP について発現量の変化を調査した．高柳らは NFATc1 欠損マウスから ES 細胞を樹立し破骨細胞の分化誘導を試みたところ，NFATc1 を欠損した ES 細胞は破骨細胞に分化できなかったことから，NFATc1 が破骨細胞の分化に必須であると報告している[36]．また，破骨細胞の前駆細胞にレトロウイルスベクターを使用して NFATc1 を強制的に発現させると RANKL の刺激なしに破骨細胞分化が誘導されると報告している[36]. そのため，NFATc1 は破骨細胞分化のマスター遺伝子であるといわれている．TRAP および RANK は破骨細胞のマーカー遺伝子であり，これらは破骨細胞数の増減に関与している．多核の成熟破骨細胞は破骨細胞同士の融合により形成される. 八木らは DC-STAMP 欠損マウス由来の破骨細胞には細胞融合が生じていないことから DC-STAMP は破骨細胞の融合に必須の遺伝子であると報告している[29]．その後，RANKL により誘導される OC-STAMP も破骨細胞の融合因子であることが報告され[30]，さらに DC-STAMP および OC-STAMP は協力して破骨細胞の融合を促進することも明らかになっている[31]．本研究では培養 4 日目におけるこれらの破骨細胞関連遺伝子の mRNA の発現量を control 群と CF 群で比較したが, 有意差が認められなかった. 5 日目において CF 群は control

群と比較してこれらの破骨細胞関連遺伝子のmRNAの発現が有意に抑制されていた．このことから圧縮力は培養後期において破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することが示唆された．その結果，圧縮力を加えられた群において総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は培養5日目から6日目の間に減少したと考えられる．

結論

本研究では破骨細胞に圧縮力を加えた後，長期的に培養した場合の破骨細胞の動態を調査した．結果として圧縮力は破骨細胞の分化・融合を促進するが，培養後期においては破骨細胞関連遺伝子の発現を抑制することによって分化・融合を抑制することが明らかになった．

謝辞

本稿を終えるにあたり，本研究に御援助，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態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) Bourauel C, Vollmer D, Jager A: Application of bone remodeling theories in the simulation of orthodontic tooth movements. J Orofac Orthop/Fortschr Kieferorthop 61：266-279, 2000.
2) Krisshnan V, Davidovitch Z: Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop 129：469.e1-469.e32, 2006.
3) Birte Melsen: Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. The Angle Orthodontist 69：151-158, 1999.
4) Roberts WE, Goodwin WC, Heiner SR: Cellular response to orthodontic force. Dent Clin North Am 25：3-17, 1981.
5) 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.
6) Shibata K, Yoshimura Y, Kikuiri T, Hasegaa 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.
7) Kameyama S, Yoshimura Y, Kameyama T, Kikuiri T, Matsuno M, Deyama Y, Suzuki K, Iida J: Short-term mechanical stress inhibits osteoclastogenesis

via suppression of DC-STAMP in RAW264.7 cells. Int J Mol Med 31 : 292-298, 2013.
8) Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K: Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. Orthod Craniofac Res 9 : 63-70, 2006.
9) 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.
10) Liu J, Zhao Z, Zou L, Li J, Wang F, Li X, Zhang J, Liu Y, Chen S, Zhi M, Wang J: Pressure-loaded MSCs during early osteodifferentiation promote osteoclastogenesis by increase of RANKL/OPG ratio. Ann Biomed Eng 37 : 794-802, 2009.
11) 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.
12) Tripuwabhrut P, Mustafa K, Brudvik P, Mustafa M: Initial responses of osteoblasts derived from human alveolar bone to various compressive forces. Eur J Oral Sci 120 : 311-318, 2012.
13) Rubin J, Biskobing D, Fan X, Rubin C, McLeod K, Taylor WR: Pressure regulates osteoclast formation and MCSF expression in marrow culture. J Cell Physiol 170 : 81-87, 1997.
14) Zhang QH, Liu MT, Zhou Y, Liu W, Shen JX, Liu L: The effect of rotative stress on CA Ⅱ, FAS, FASL, OSCAR, and TRAP gene expression in osteoclasts. J Cell Biochem 114 : 388-397, 2012.
15) Kulkarnia RN, Voglewedeb PA, Liu D: Mechanical vibration inhibits osteoclast formation by reducing DC-STAMP receptor expression in osteoclast precursor cells. Bone 57 : 493-498, 2013.
16) 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 E2 and its receptors in osteoblastic Saos-2 cells. Connect Tissue Res 48 : 246-253, 2007.
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-2 cells. Arch Oral Biol 53 : 488-496, 2008.
18) 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.
19) Hayakawa T, Yoshimura Y, Kikuiri T, Matsuno M, Fukushima K, Shibata K, Deyama Y, Suzuki K, Iida J: Optimal compressive force accelerates osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Mol Med Rep 12 : 5879-5885, 2015.
20) Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Hakeda Y, Kumegawa M: Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. Blood 74 : 1295-1302. 1989.
21) Teitelbaum SL, Ross FP: Genetic regulation of osteoclast development and function. Nat Rev Genet 4 : 638-649, 2003.
22) Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL: Osteoclast differentiation and activation. Nature 423 : 337-342, 2003.
23) Vaananen HK, Laitala-Leinonen T: Osteoclast lineage and function. Arch Biochem Biophys 473 : 132-138, 2008.
24) Martin TJ, Sims NA: Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. Trends in Mol Med 11 : 76-81, 2005.
25) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ: Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. Endocr Rev 20 : 345-357, 1999.
26) 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/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. Proc Natl Acad Sci USA 95 : 3597-3602, 1998.
27) Yoshida H, Hayashi S, Kunisada T, Ogawa M, Nishikawa S, Okamura H, Sudo T, Shultz LD, Nishikawa S: The murine mutation osteopetrosis is in the coding region of the macrophage colony stimulating factor gene. Nature 345 : 442-444, 1990.
28) Miyamoto T, Arai F, Ohneda O, Takagi K, Anderson DM, Suda T: An adherent condition is required for formation of multinuclear osteoclasts in the presence of macrophage colony-stimulating factor and receptor activator

of nuclear factor kappa B ligand. Blood 96：4335-4343, 2000.
29)Yagi M, Miyamoto T, Sawatani Y, Iwamoto K, Hosogane N, Fujita N, Morita K, Ninomiya K, Suzuki T, Miyamoto K, Oike Y, Takeya M, Toyama Y, Suda T: DC-STAMP is essential for cell-cell fusion in osteoclasts and foreign body giant cells. J Exp Med 202：345-351, 2005.
30)Yang M, Birnbaum MJ, MacKay CA, Mason-Savas A, Thompson B, Odgren PR: Osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), a novel protein induced by RANKL that promotes osteoclast differentiation. J Cell Physiol 215：497-505, 2008.
31)Miyamoto H, Suzuki T, Miyauchi Y, Iwasaki R, Kobayashi T, Sato Y, Miyamoto K, Hoshi H, Hashimoto K, Yoshida S, Hao W, Mori T, Kanagawa H, Katsuyama E, Fujie A, Morioka H, Matsumoto M, Chiba K, Takeya M, Toyama Y, Miyamoto T: Osteoclast stimulatory transmembrane protein and dendritic cell-specific transmembrane protein cooperatively modulate cell-cell fusion to form osteoclasts and foreign body giant cells. J Bone Miner Res 27：1289-1297, 2012.
32)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.
33)Nomura M, Yoshimura Y, Kikuiri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Ssno H, Suzuki K, Inoue N: Platinum nanoparticles suppress osteoclatogenesis through scavenging of reactive oxygen species produced in RAW264.7 cells. J Pharmacol Sci 117：243-252, 2011.
34)Rodan SB, Rodan GA: Integrin function in osteoclasts. J Endocrinol 154：47-56, 1997.
35)Ikeda M, Yoshimura Y, Hayakawa T, Fukushima K, Suzuki K, Iida J：Release from optimal compressive force suppresses osteoclast differentiation. Mol Med Rep, in press.
36)Takayanagi, H, Kim S, Koga T, Nishina H, Isshiki M, Yoshida H, Saiura A, Isobe M, Yokochi T, Inoue J, Wagner EF, Mak TW, Kodama T, Taniguchi T: Induction and activation of the transcription factor NFATc1 (NFAT2) integrate RANKL signaling for terminal differentiation of osteoclasts. Dev Cell 3：889-901. 2002.

図1

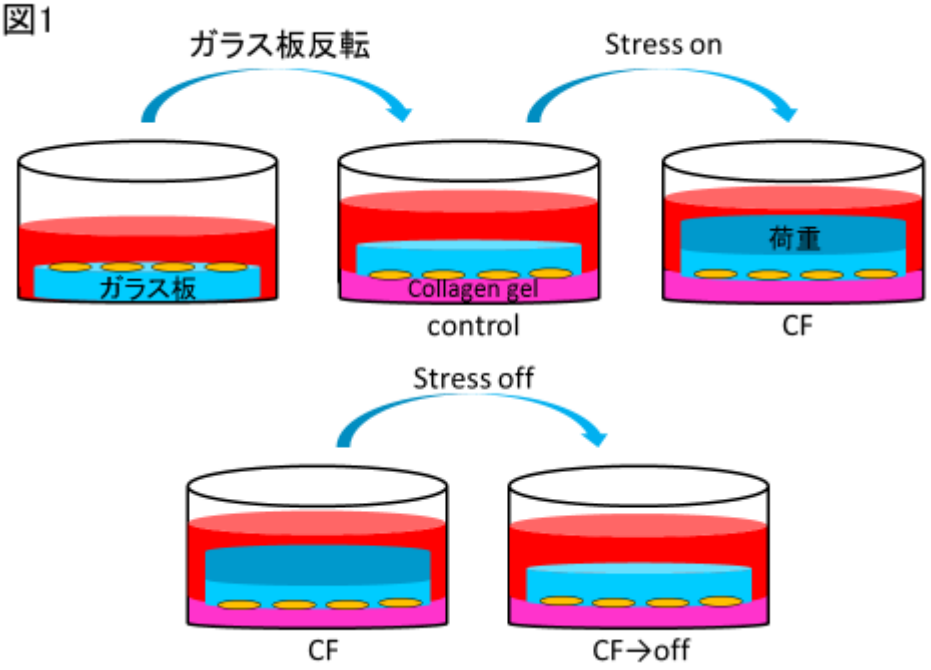

ガラス板反転
Stress on
ガラス板
Collagen gel
荷重
control
CF
Stress off
CF
CF→off

図2A

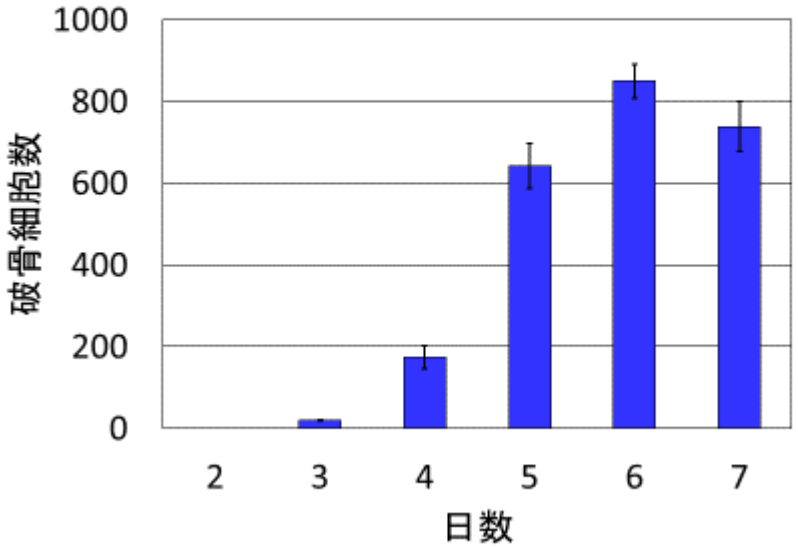

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
2
3
4
5
6
7
日数

図2B

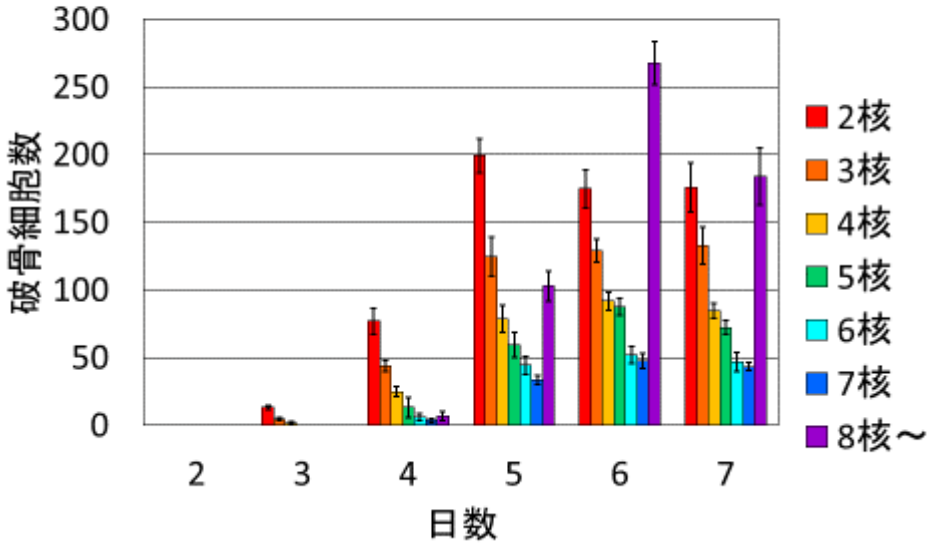

300
250
200
150
100
50
0
破骨細胞数
2
3
4
5
6
7
日数
2核
3核
4核
5核
6核
7核
8核～

図3A

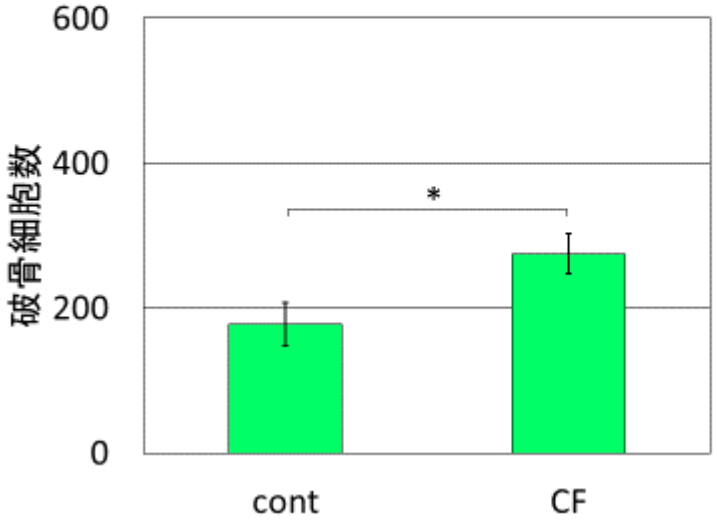

600
400
200
0
破骨細胞数
*
cont
CF

図3B

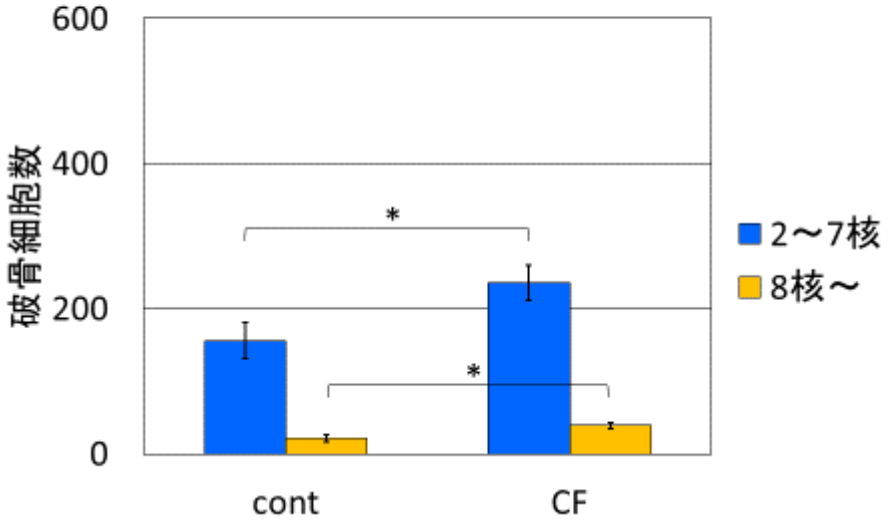

600
400
200
0
破骨細胞数
*
*
2～7核
8核～
cont
CF

図4A

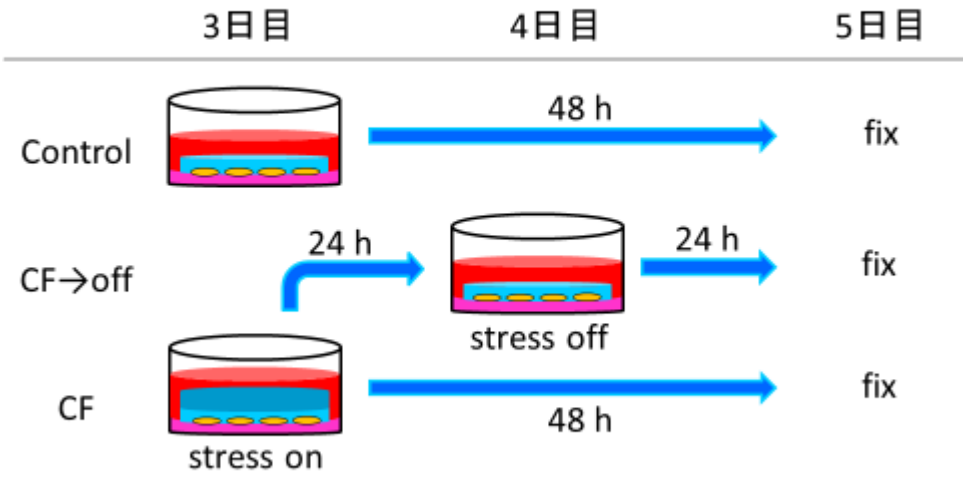

3日目
4日目
5日目
Control
48 h
fix
CF→off
24 h
24 h
fix
stress off
CF
stress on
48 h
fix

図4B

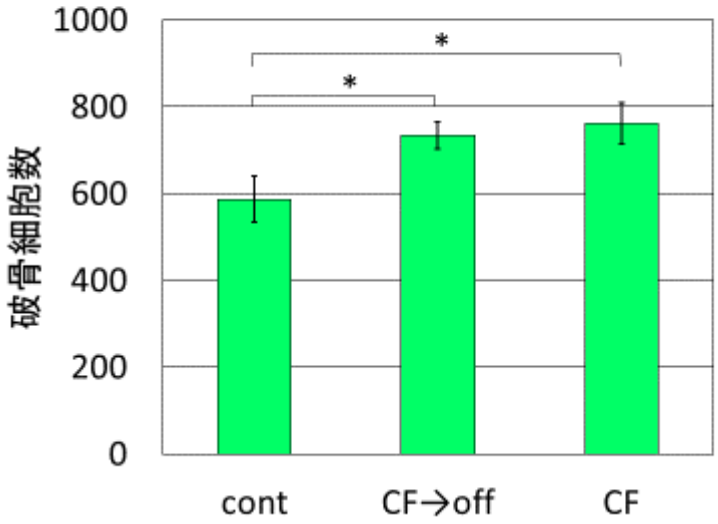

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
*
*
cont
CF→off
CF

図4C

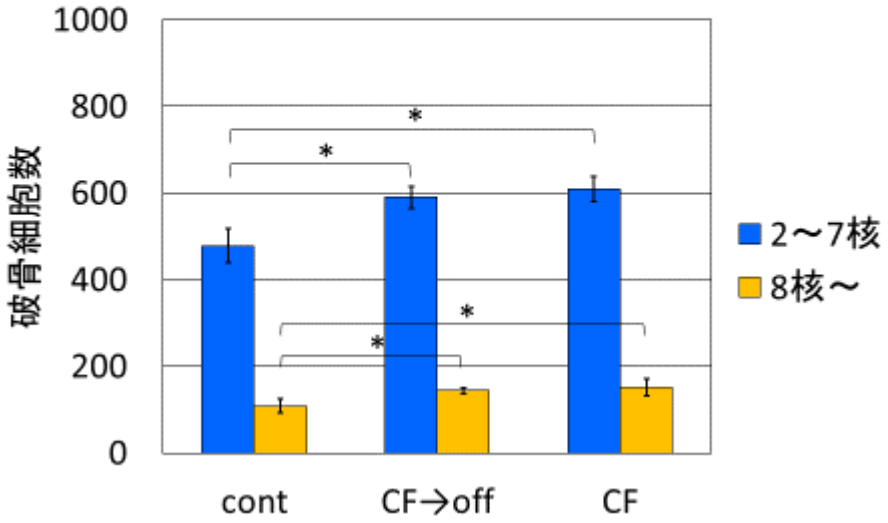

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
*
*
*
*
*
cont
CF→off
CF
2～7核
8核～

図5A

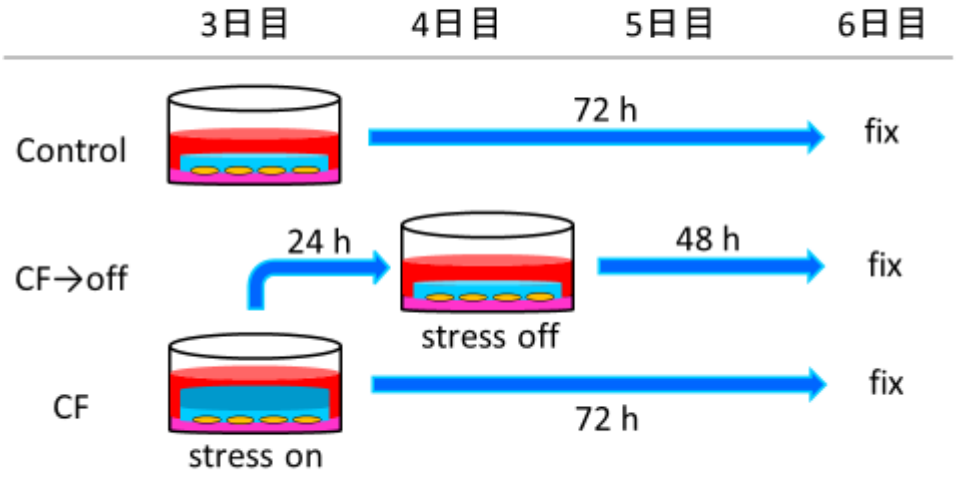

3日目
4日目
5日目
6日目
Control
72 h
fix
CF→off
24 h
48 h
fix
stress off
CF
fix
72 h
stress on

図5B

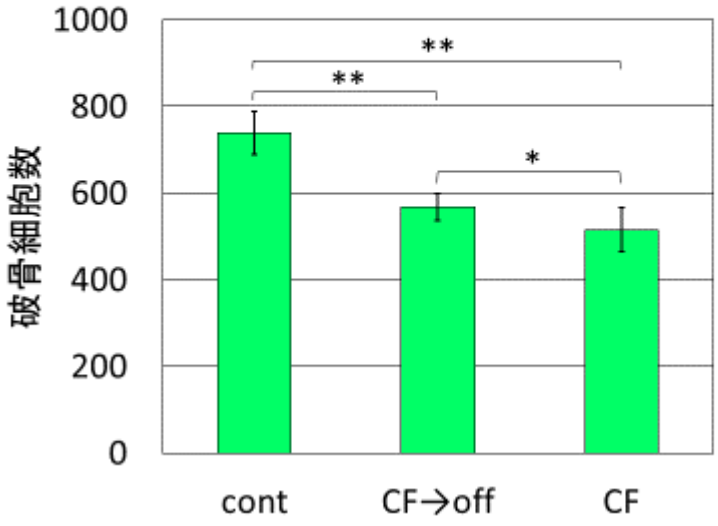

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
**
**
*
cont
CF→off
CF

図5C

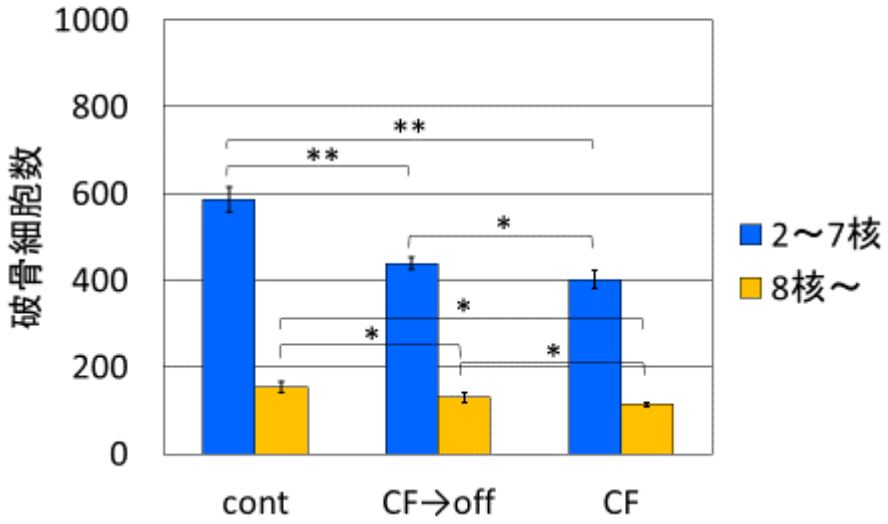

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
**
**
*
*
*
*
cont
CF→off
CF
2～7核
8核～

図6A

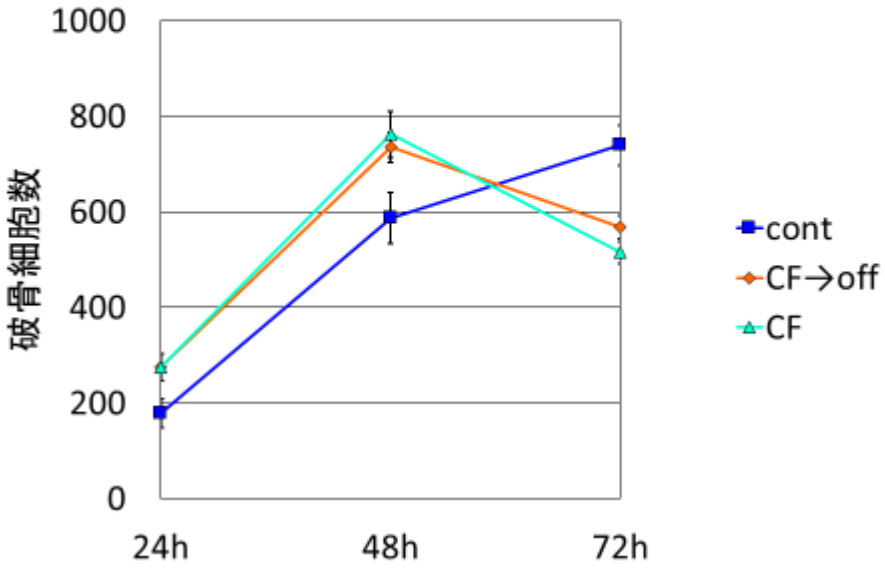

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
24h
48h
72h
cont
CF→off
CF

図6B

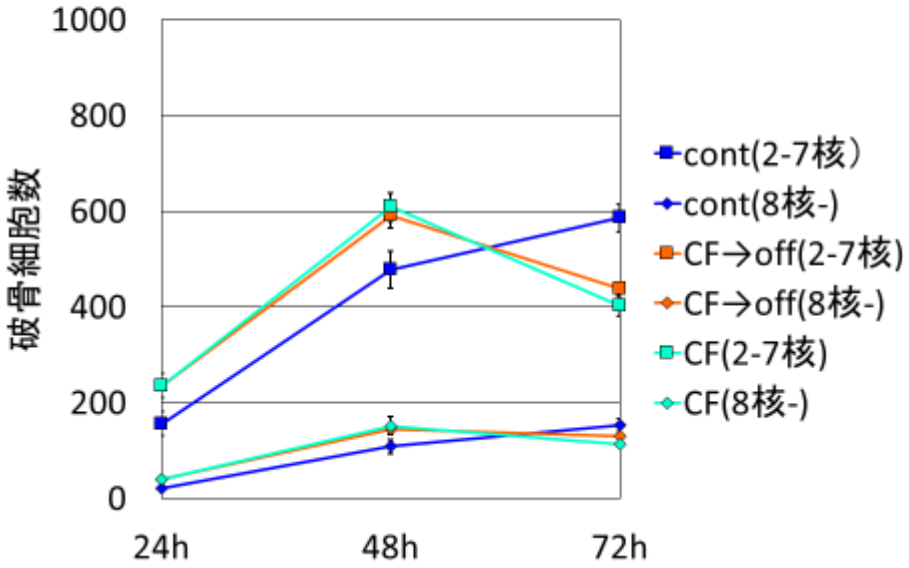
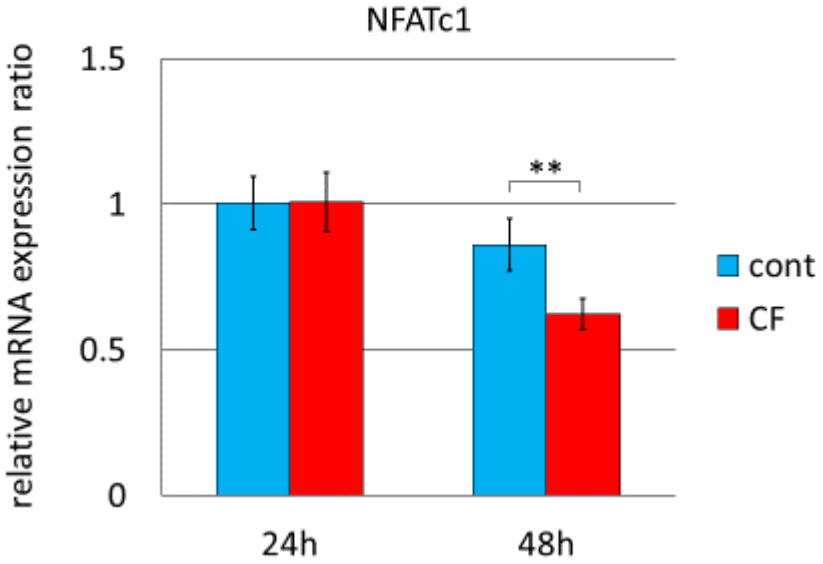
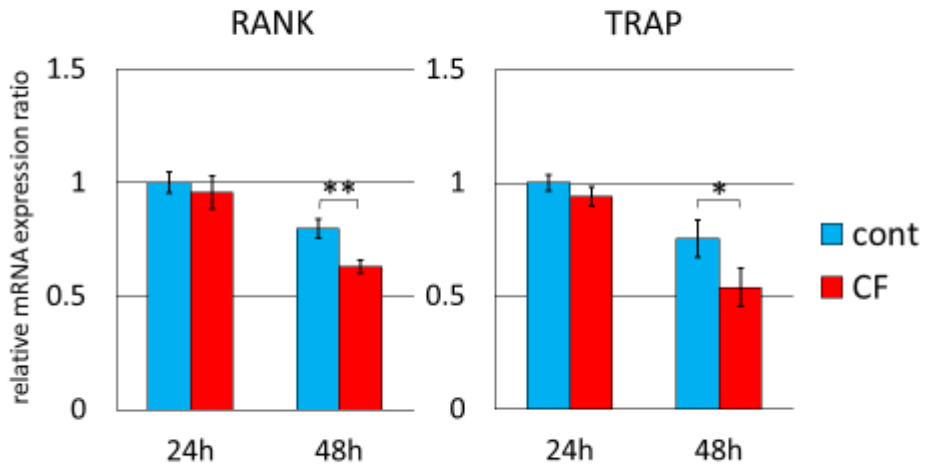

1000
800
600
400
200
0
破骨細胞数
24h
48h
72h
cont(2-7核）
cont(8核-)
CF→off(2-7核)
CF→off(8核-)
CF(2-7核)
CF(8核-)

図7


NFATc1
relative mRNA expression ratio
1.5
1
0.5
0
**
24h
48h
cont
CF


RANK
TRAP
relative mRNA expression ratio
1.5
1
0.5
0
**
*
24h
48h
cont
CF

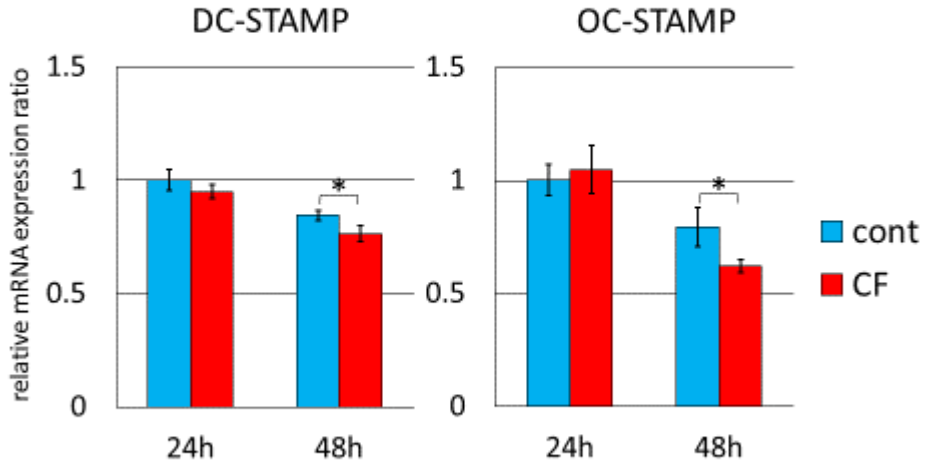

DC-STAMP
OC-STAMP
relative mRNA expression ratio
1.5
1
0.5
0
*
*
24h
48h
cont
CF

図 1．圧縮力の適応と解放.

培養 3 日目まで RAW 細胞をガラス板上で培養して, ガラス板を反転してコラーゲンゲル上に置いた．この状態で培養したものを control 群とした．反転したガラス板上に荷重を加えて圧縮力を加えた. この状態で培養したものを CF 群とし，24 時間圧縮後，荷重を除去して培養したものを CF→off 群とした.

図 2．培養日数毎の破骨細胞数の変化.

A. 総破骨細胞数は 3 日目から 6 日目までの間に増加したが, それ以降は減少傾向を示した.

B. 8 核以上の巨大破骨細胞は 4 日目以降増加したが，6 日目から 7 日目の間に減少傾向を示した.

mean ± SD，n = 3.

図 3．培養 4 日目の時点における破骨細胞数．総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は CF 群では control 群と比較して有意に増加した.

A. 総破骨細胞数.

B. 小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数.

mean ± SD, n = 4, p＜0.05（*）.

図 4. 培養 5 日目までの培養日程および 5 日目の時点における破骨細胞数. 総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は CF→off, CF 群では control 群と比較して有意に増加した.

A. 培養日程.

B. 総破骨細胞数.

C. 小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数.

mean ± SD, n = 4, p＜0.05（*）.

図 5. 培養 6 日目までの培養日程および 6 日目の時点における破骨細胞数. 総破骨細胞数，小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数は CF→off, CF 群では control 群と比較して有意に減少した.

A. 培養日程.

B. 総破骨細胞数.

C. 小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数.

mean ± SD, n = 4, p＜0.05（*）, p＜0.01（**）.

図 6．培養 4 日目から 6 日目までの破骨細胞数の推移．4 日目から 5 日目の間,

いずれの群においても増加した．5 日目から 6 日目の間，control 群では増加したが，他の群では減少した．
A. 総破骨細胞数の推移.
B. 小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数の推移.
mean ± SD, n = 4.

図 7. 破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量の変化．培養 3 日目から 24, 48 時間後に control, CF 群の RNA を回収して比較した．24 時間後の時点においては，control 群と CF 群の間に有意差が認められなかった．48 時間後においては，いずれの関連遺伝子においても CF 群では control 群と比較して発現が有意に抑制された．mean ± SD, n = 4, $p < 0.05$（*）, $p < 0.01$（**）.