



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; 吉村, 善隆; 南川, 元 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 131-139
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68793
Type	journal article
File Information	38_02_02_Miyakami.pdf



原 著

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

宮上 雄希^{1, 2)} 吉村 善隆²⁾ 南川 元²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 飯田順一郎¹⁾

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。

キーワード：破骨細胞、圧縮力、メカニカルストレス

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、PGE2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、PGE2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

¹⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究院 口腔機能学分野 歯科矯正学教室 (主任：飯田順一郎 特任教授)

²⁾ 〒060-8586 札幌市北区北13条西7丁目

北海道大学大学院歯学研究院 口腔病態学分野 細胞分子薬理学教室 (主任：鈴木 邦明 特任教授)

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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-アラニール-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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $^{\circ}\text{C}$ 、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

水で冷却され4 $^{\circ}\text{C}$ 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-アラニール-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 $^{\circ}\text{C}$ 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 $\rightarrow$ off)群とした(図1)。

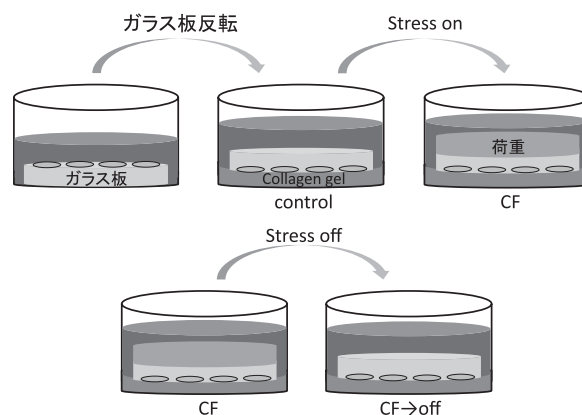


図1 圧縮力の適応と解放

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 $\rightarrow$ off群とした。

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 μ g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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法にて計算した。

6. 統計学的分析

すべての結果は平均値 $\pm$ 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2 A)。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2 B)。

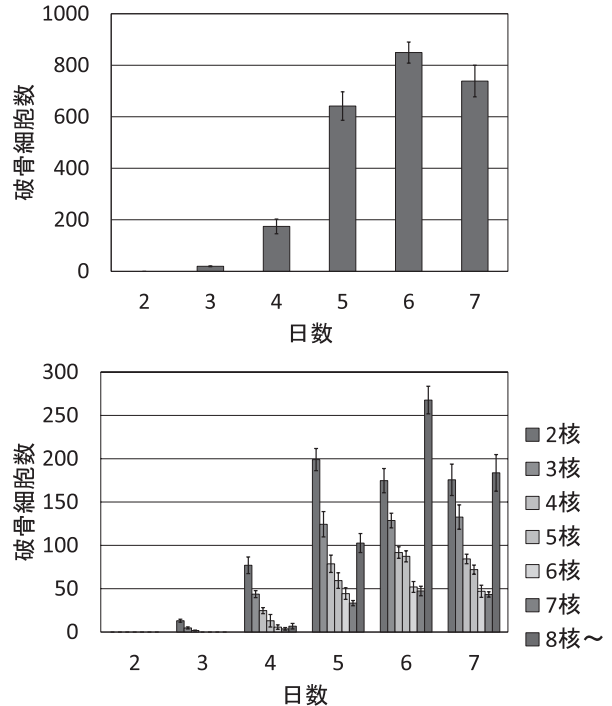


図2 培養日数毎の破骨細胞数の変化

- 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 $\pm$ SD, n = 3.

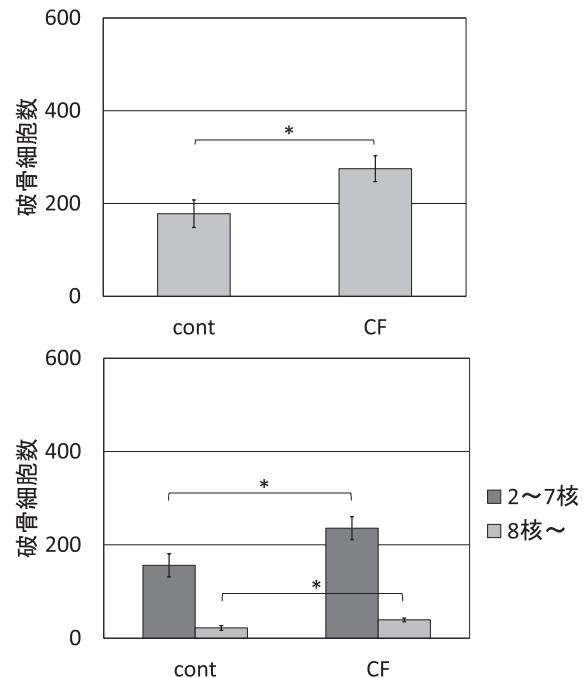


図3 培養4日目の時点における破骨細胞数。総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数はCF群ではcontrol群と比較して有意に増加した。

- 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 $\pm$ SD, n = 4, p < 0.05 (*).

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3 A, 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

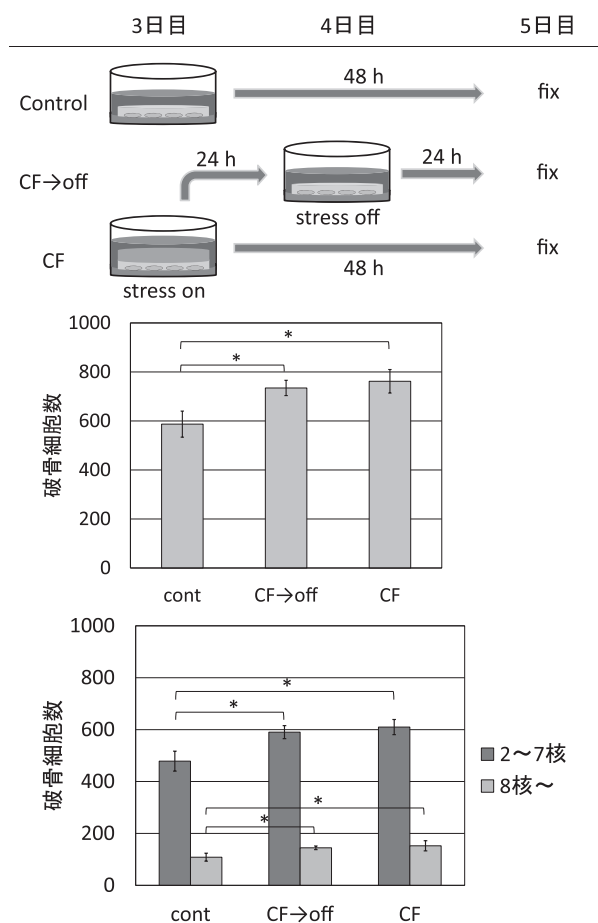


図4 培養5日目までの培養日程および5日目の時点における破骨細胞数。総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数はCF→off, CF群ではcontrol群と比較して有意に増加した。

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 $\pm$ SD, n = 4, p < 0.05 (*).

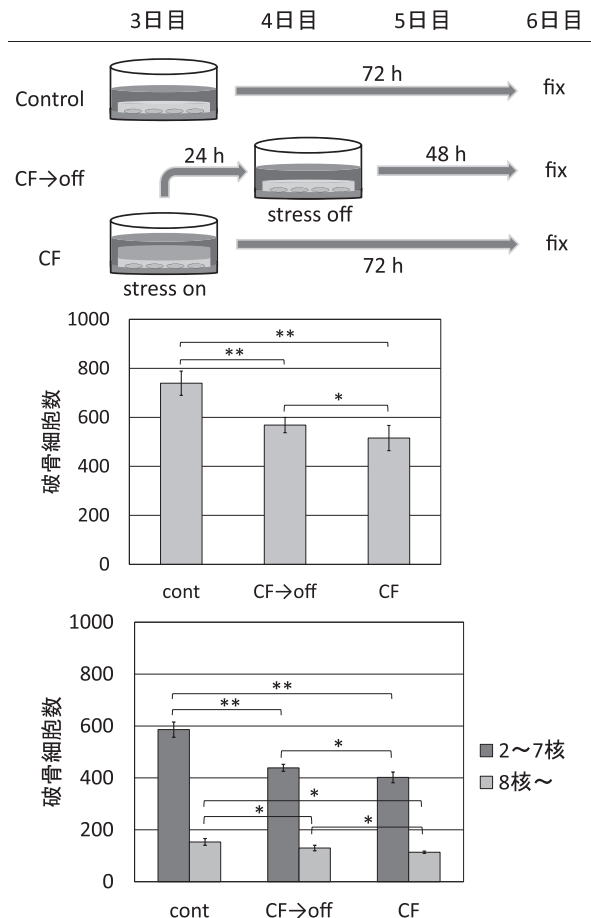


図5 培養6日目までの培養日程および6日目の時点における破骨細胞数。総破骨細胞数、小型破骨細胞数および巨大破骨細胞数はCF→off, CF群ではcontrol群と比較して有意に減少した。

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 $\pm$ SD, n = 4, p < 0.05 (*), p < 0.01 (**).

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4 A-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5 A-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6 A, 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

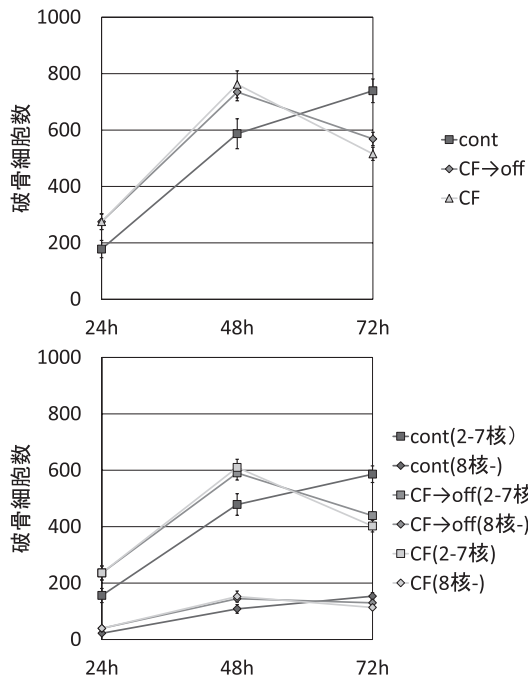


図6 培養4日目から6日目までの破骨細胞数の推移。4日目から5日目の間、いずれの群においても増加した。5日目から6日目の間、control群では増加したが、他の群では減少した。

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 $\pm$ SD, n = 4.

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

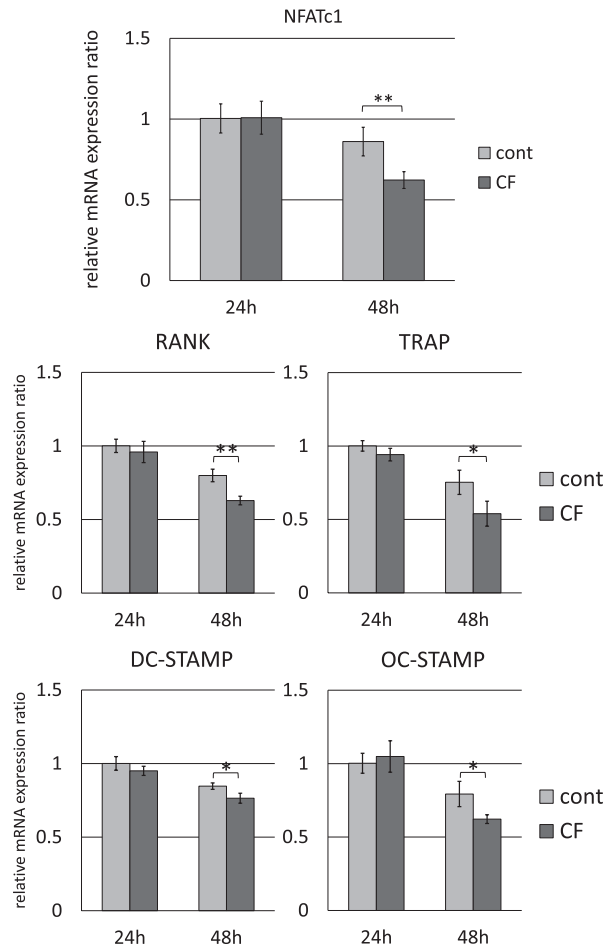


図7 破骨細胞関連遺伝子のmRNA発現量の変化。培養3日目から24, 48時間後にcontrol, CF群のRNAを回収して比較した。24時間後の時点においては、control群とCF群の間に有意差が認められなかった。48時間後においては、いずれの関連遺伝子においてもCF群ではcontrol群と比較して発現が有意に抑制された。

mean $\pm$ SD, n = 4, $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**).

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。

コラーゲングル (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、コラーゲング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、コラーゲング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グ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グ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) Krissshnan 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, Kikuri 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, Kikuri 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, Kikuri 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, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Ssno H, Suzuki K, Inoue N : Platinum nanoparticles suppress osteoclastogenesis 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*, 14(5) : 4699-4705, 2016.
- 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.

ORIGINAL

Compressive force suppresses osteoclast differentiation and fusion in the late stage of osteoclastogenesis

Yuki Miyakami^{1, 2)}, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Hajime Minamikawa²⁾, Kuniaki Suzuki²⁾
and Junichiro Iida¹⁾

ABSTRACT : Orthodontic force consists of tensile and compressive force. On the pressure side, osteoclasts are subjected to compressive force. In contrast, on the tension side, osteoclasts are subjected to tensile force. Here we present our reports about the direct effects of compressive force on osteoclast. We found no other reports that demonstrated the change of the osteoclasts when they are cultured long term after compression. Therefore, we investigated the effects of compressive force on osteoclastogenesis when we cultured osteoclasts long term after application of a compressive force in this study. We cultured RAW264.7 (RAW) cells with a culture medium added receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) for 7 days and observed the change in the number of osteoclasts. Osteoclasts increased up to the 6th day, but decreased after that. To investigate the effects of compressive force, we added weight to osteoclasts at day 3, and cultured them for 24, 48 and 72 h. The control group was cultured without weight. The compressed off (CF→ off) group was cultured for 24 h with weight, and then cultured without it. The compressed (CF) group was cultured with weight. The number of osteoclasts were counted and compared. The number of osteoclasts increased when we applied compressive force for 24 h from the 3rd day. At day 5, CF→ off group and CF group increased more than the control group. No significant difference was recognized among the former two groups. This suggested the possibility that over 24 h compression did not promote osteoclast differentiation and fusion. On the 6th day, the control group increased more than the other groups. In addition, the control group increased during the culture of the 5th day to the 6th day, but the other groups decreased. These results suggested the possibility that the compressive force suppressed differentiation and fusion of osteoclasts in late stages. Comparing the control group with the CF group about mRNA expression of osteoclast-associated genes, including nuclear factor of activated T cells c1 (NFATc1), TRAP, receptor activator of NF- κ B (RANK), dendritic cell specific trans membrane protein (DC-STAMP), and osteoclast stimulatory trans membrane protein (OC-STAMP) on the 4th day, no significant differences were observed. But on the 5th day, the CF group was significantly suppressed. This showed the compressive force suppressed expression of osteoclast-associated genes in the late stages. These results suggested that compressive force suppressed osteoclast differentiation and fusion by suppressing expression of osteoclast-associated genes in late stages of the experiment.

Key Words : osteoclast, compressive force, mechanical stress

¹⁾Orthodontics, Department of Oral Functional Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Specially Appointed Prof. Junichiro Iida), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan

²⁾Molecular Cell Pharmacology, Department of Oral Pathobiological Science, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Specially Appointed Prof. Kuniaki Suzuki), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan