HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	持続的な機械的刺激はRAW264.7細胞における破骨細胞分化を抑制する
Author(s)	上村, 光太郎; 吉村, 善隆; 南川, 元 他
Citation	北海道歯学雑誌, 38(2), 169-176
Issue Date	2018-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/68802
Type	journal article
File Information	38_02_06_Uemura.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

原　著

持続的な機械的刺激はRAW264.7細胞における破骨細胞分化を抑制する

上村光太郎[1, 2)]　吉村　善隆[2)]　南川　元[2)]　鈴木　邦明[2)]　飯田順一郎[1)]

抄　録：骨の恒常性を保つために機械的刺激が重要な役割を果たしていることが明らかにされつつあるが，破骨細胞の分化誘導系に対し機械的刺激を直接作用させた報告は我々の研究のみである．これまで我々は周期的な機械的刺激による破骨細胞融合の抑制に関して報告してきた．本研究では持続的な機械的刺激が破骨細胞分化誘導系に与える影響について検討した．RANKL添加培養液を用いてRAW264.7細胞をBioFlex plateにて通法に従い培養した．Flexcell tension systemを用いて破骨細胞数の増加が顕著に見られる培養４日目から２日間，伸展率5，10，15 %で刺激を与えると，10，15%の伸展率で破骨細胞数の有意な減少が認められた．また，1，3，6，12 h/日，２日間，伸展率10 %で持続的な機械的刺激を作用させた結果，6，12 hにおいて破骨細胞数の有意な減少が認められた．持続的な機械的刺激は，周期的な機械的刺激と同様に破骨細胞分化誘導系の抑制が認められた．TRAP陽性破骨細胞を2-4核，５核以上で分類し計測した結果，機械的刺激により2-4核の破骨細胞数では経時的な減少が認められた．また，実験群と対照群のNO量を測定した結果，実験群でNO量の有意な増加が認められた．2-4核の破骨細胞数の減少にNOが関与することが示唆されたため，NO合成酵素阻害剤（L-NMMA）で処理した結果，2-4核の破骨細胞数の減少が抑制され，破骨細胞数の減少にNOが関与することが示唆された．また，realtime-PCR法によりmRNAの発現量を測定した結果，破骨細胞の融合因子の１つであるDC-STAMPの有意な減少が認められたが，iNOS，nNOSに有意な差は認められなかった．以上の結果から持続的な機械的刺激は破骨細胞の融合を抑制させる要因の一つであり，その一部にNOが関与していることが示唆された．

キーワード：破骨細胞，機械的刺激，一酸化窒素

緒　　言

歯科矯正治療では，歯に直接外力を加え，歯を支える歯根膜，歯槽骨，その他の歯周組織に負荷をかけることで骨のリモデンリグを部位により変化させる．圧迫側では骨添加の抑制と骨吸収の促進が認められ，反対に牽引側では骨吸収が抑制され，骨添加が促進される．その結果歯の移動が生じる．歯科矯正治療において骨のリモデリングは，歯の移動に重要な役割を担っている[1)]．骨のリモデリングは骨芽細胞と破骨細胞に深く関係している．

破骨細胞は骨の吸収能を持つ多核の巨細胞である．破骨細胞は骨芽細胞と骨細胞等により分化および機能が調節されている．骨芽細胞は破骨細胞の分化に重要な役割を持つM-CSFおよびRANKLを発現する．単球・マクロファージ系である破骨細胞前駆細胞はM-CSFの受容体であるc-FmsおよびRANKLの受容体であるRANKを発現し，骨芽細胞からの刺激を受け，単核の前破骨細胞へと分化する．前破骨細胞は融合因子であるDC-STAMPとOC-STAMPを発現し，それらを介し多核の破骨細胞へと誘導される[2-4)]．

また，骨の恒常性を保つためには外部からの刺激が重要な役割を持つ．そこで，これまで骨芽細胞に対して様々な方法で細胞に応力を加える実験系が報告がされてきた．例えば，灌流刺激，圧迫刺激[5-9)]，伸展刺激[10-12)]，静水圧刺激[13)]，回転刺激[14)]，振動刺激[15)] などがある．しかし，破骨細胞に対し直接的に機械的刺激を加えた報告は少ない．芝田らは，RAW264.7細胞を３日間培養し，Flexcell tension systemを用い，30 cycle/分，10 %の伸展率で２日間にわたり機械的刺激を与え，その後機械的刺激を解放し，破骨細胞の変化について観察した[11)]．千丈らは，RAW264.7細胞を3日間培養し，Flexcell tension systemを用い，30 cycle/分，10%の伸展率で6，12，24 hで機械的刺激を与え破骨細胞の変化について観察した[12)]．いずれも，Flexcell tension systemを用い30 cycle/分，10 %の伸展率で周期的な機械的刺激を与えている．しかし，

[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）

Flexcell tension systemを用いて持続的な機械的刺激を直接破骨細胞に与えた報告はない．本実験では，Flexcell tension systemを用い，矯正臨床上多く用いられる持続的な機械的刺激を直接破骨細胞の分化誘導系に与えることで破骨細胞に及ぼす影響と，そのメカニズムを解明することを目的とした．

材 料 と 方 法

1．細胞の培養

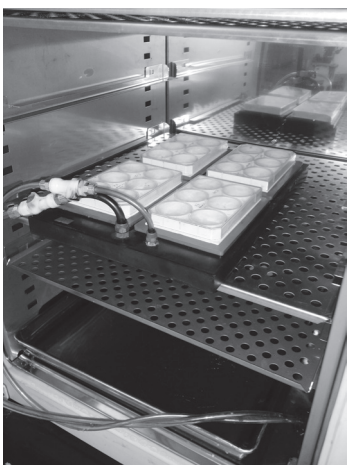
マウス腹水由来の単球マクロファージであるRAW264.7細胞（RAW細胞：ATCC no. TIB-71™；Manassas, VA, USA）を破骨細胞の前駆細胞として使用した．RAW細胞はRANKを発現しており，M-CSFの刺激が無くてもRANKLの刺激により破骨細胞に分化することができる[10]．10 %牛胎児血清（Invitrogen, Carlsbad, CA, USA）と66.7 μg/ml硫酸カナマイシン（Meiji Seika, Tokyo, Japan）を含むDulbecco's modified Eagle's培地（D-MEM : Wako Pure Chemical, Osaka, 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, USA）上の培地の中で，37 ℃，5 % CO_2の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．Ⅰ型コラーゲンコートされたBioFlex plate（Flexcell International Corp, Burlington, NC, USA）に回収したRAW細胞を1-wellあたり9.0 × 10^4個の細胞密度となるように播種した．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-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, USA），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の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，培養液は培養２日毎に交換した．

2．Flexcell tension systemの適用

Flexcll tention system は BioFlex plate（6-well，9.6 cm^2/well）と台座の間を陰圧にすることでシリコン膜を伸展させ細胞に対し機械的刺激を与える．

本実験は，BioFlex plate上で37 ℃，5 % CO_2の気相下にて３日間培養後，FX-3000™ Flexcell Strain Unit（Flexcell International Corp, Burlington, NC, USA）（図１-Ａ）を用いて以下の条件において機械的刺激を与えた．（１）：RANKLを添加した日を培養１日目とし，培養４日目から24時間5，10，15 %，の伸展率で基底シリコン膜を持続的に伸展させ５日目に10 %中性ホルマリンにて固定した．（2）：培養４日目から２日間にわたり10 %の伸展率において1，3，6，12 h/日持続的に機械的刺激を与えた（図１-Ｂ）．機械的刺激の与え方としてこれまでの30 cycle/分のように与える方法を周期的な機械的刺激とし，一定時間，同じ力で刺激を与える続ける方法を持続的な機械的刺激とし，今回，この持続的な機械的刺激を用いた．

A



B

	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5	Day 6
1 h	Culture			→ 1h	→ 1h	Fix
3 h				→ 3 h	→ 3 h	
6 h				⟶ 6 h	⟶ 6 h	
12 h				⟶ 12 h	⟶ 12 h	

図１　Flexcell tension system

Ａ．インキュベーター内のFlexcell tension system．BioFlex plateの底面はⅠ型コラーゲンコートされたシリコン膜になっており，本体から伸びるチューブで本体を陰圧にすることでシリコン膜を伸展させた．Ｂ．Flexcell tension systemを用いて破骨細胞に培養４日目から２日間にわたり1，3，6，12 h/日で機械的刺激を与えた．

3．酒石酸耐性酸性ホスファターゼ（TRAP）陽性細胞数の計測

細胞を各条件のもとで培養した後，10 %中性ホルマリンにて固定し，その後，蒸留水で洗浄した．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核のものを各核数でそれぞれの破骨細胞数を計測し，残りの多核の破骨細胞を８核以上として光学顕微鏡を用いて破骨細胞数の計測をした．

4．NO濃度の測定および阻害

NO濃度の測定にはGriess法を用い，NO_2/NO_3 Assay Kit-CII（Colorimetric）～ Griess Reagent Kit ～（Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan）を使用した．NO合成酵素阻害剤として，N^G-Monomethyl-L-arginine, monoacetate salt（L-NMMA : EMD Millipore Corp, Billerica, MA,

USA）を使用した．過去の研究から，破骨細胞への影響が最もよくみられた0.25 μMを使用濃度とし，培養中のRANKL添加と同じタイミングで添加した[16]．伸展率10 %で12 hを２日間にわたり機械的刺激を与えた．

５．逆転写反応とreal-time PCR

培養６日目に細胞からTrizol（Invitrogen）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．real-time PCRはABI7300を用いた．プライマー（Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA）は以下のものを使用した．NFATc1（Mm00479445_m1），RANK（Mm00437135_m1），TRAP（Mm00475698_m1），DC-STAMP（Mm01168058_m1），OC-STAMP（Mm00512445_m1），iNOS（Mm00440485_m1），nNOS（Mm00435175_m1）およびGAPDH（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[17, 18]．

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を認めると判断した．

結　　果

RANKLで処理した日を１日目とし，破骨細胞の分化・融合の経時的な動態の変化について観察した（図２）．２核以上の破骨細胞が観察されるようになるのは４日目であり，４日目から５日目にかけて破骨細胞数は増加した．また，６日目をピークとし，その後，破骨細胞数は減少した．

Flexcell tension systemを用い，破骨細胞に機械的刺激を与える際，負荷依存的な影響による破骨細胞の変化を観察するため，４日目から持続的な機械的刺激を与えた．機械的刺激を与えた群を実験群とし，伸展率により伸展率５%群，10 %群，15 %群とした．また，機械的刺激を与えなかった群を対照群とした．Flexcell tension systemの性質上，同時に違う伸展率で機械的刺激を与えることはできないため，各実験群を比較検討するため，対照群を100 %とし各実験群の比較を行った（図３）．対照群と比べ5 %群では破骨細胞数の有意な差は認められなかった．対照群と比べ10 %群および15 %群は破骨細胞数の有意な減少が認められた．10 %群と15 %群との間に破骨細胞数の有意な差は認められなかった．

Flexcell tension systemを用い，破骨細胞に機械的刺激を与える際，時間依存的な影響による破骨細胞の変化を観察するため，4日目から持続的な機械的刺激を与えた（図４-A）．機械的刺激を与えなかった群を対照群とし，機械的刺激を与えた群を実験群とした．実験群は伸展率を10 %とし，２日間にわたり，1，3，6，12 h/日で機械的刺激を与え（図１-B），それぞれを1 h群，3 h群，6 h群，12 h群とした．対照群と比べ1 h群，3 h群では破骨細胞数の有意な差は認められなかったが，6 h群，12 h群では有意な減少が認められた．また，この結果を２-７核および８核以上の破骨細胞数の核数別における結果で示すと，２-４核と５核以上の破骨細胞で変化に相関が認められたため，２-４核および５核以上の破骨細胞で分類した（図４-B，C）．対照群と比べ５核以上の破骨細胞数に変化は認められなかったが，対照群と比べ２-４核の破骨細胞は経時的な破骨細胞数の減少が認められた．

過去の実験より，破骨細胞の分化誘導系にNOが大きく影響していることが報告されている[19]．Flexcell tension systemを用いた機械的刺激下において破骨細胞に与えた

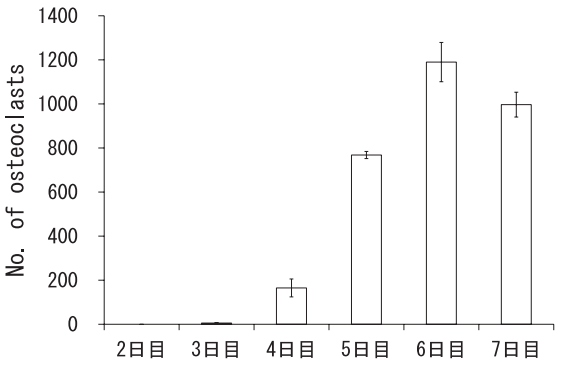


図２　培養日数別の総破骨細胞数

RANKLを添加した日を１日目とし，７日目に10 %ホルマリンにて固定した．２核以上の破骨細胞は４日目から５日目で観察されるようになり，６日目をピークに７日目にかけて減少した．

mean ± SD，n = 3.

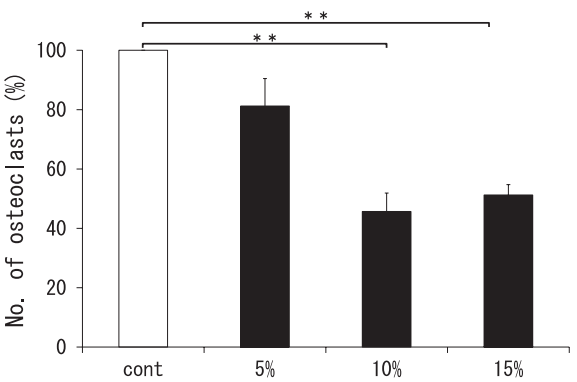


図３　負荷別の破骨細胞の総数

培養４日目からFlexcell tension systemを用いて，伸展率5, 10, 15 %でシリコン膜を伸展させ機械的刺激を与えた．培養６日目に10 %ホルマリンで固定した．対照群と比べ２核以上の破骨細胞は10 %群で有意に減少し，10 %群と15 %群との間では有意な差は認めなかった．

mean ± SD，n = 3，$p < 0.01$（＊＊）．

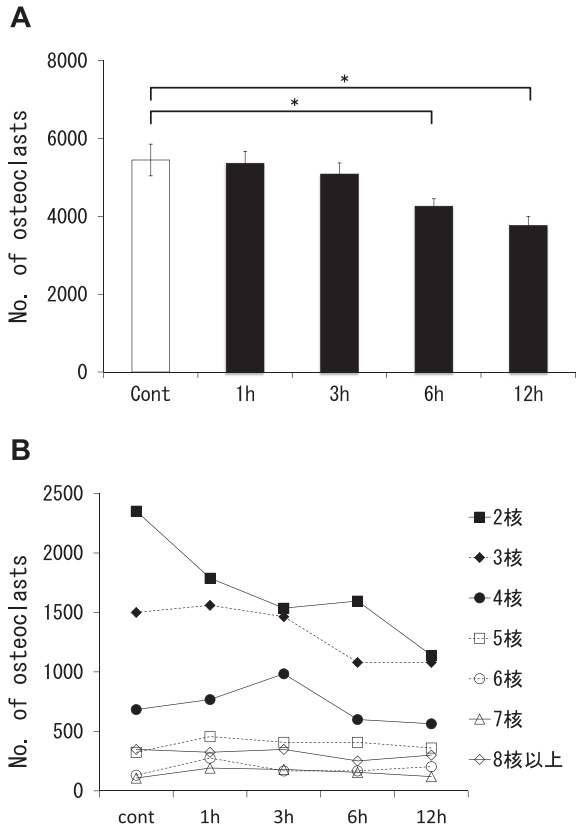


図４　機械的刺激を与えたれた破骨細胞の時間別の総数および核数別の破骨細胞数

A．培養４日目から６日目にわたり1，3，6，12 h/日で，伸展率を10 %としFlexcell tension systemにより機械的刺激を与えた．対照群と比べ破骨細胞数は6 h群と12 h群で有意に減少した．B．核数別の破骨細胞数．C．核数別の破骨細胞を２–４核と５核以上で分類した場合の破骨細胞数．２–４核は機械的刺激を与えている時間の長さで破骨細胞数は減少を認めた．しかし，５核以上の破骨細胞数は時間による影響を認めなかった．

mean ± SD，n = 3，$p < 0.05$（＊）．

るNOの影響について観察した．対照群と比べNO_2^-およびNO_3^-は有意な産生量の増加が認められた（図５）．

機械的刺激による破骨細胞数の減少にNOが影響を与えているか確認するため，伸展率を10 %とし，２日間にわたり12 h/日で持続的機械的刺激を与え，RANKL添加と同じタイミングでNO合成酵素阻害剤であるL-NMMAを添加した．L-NMMAを添加しなかった群は，対照群と比べ２–４核の破骨細胞数の有意な減少が認められたが，５核以上では有意な差は認められなかった．L-NMMAを添加した群では，対照群と比べ２–４核の破骨細胞数に減少傾向を示すが，有意な差は認められなかった．また，対照群と比べ５核以上の破骨細胞数の有意な差は認められなかった（図６）．

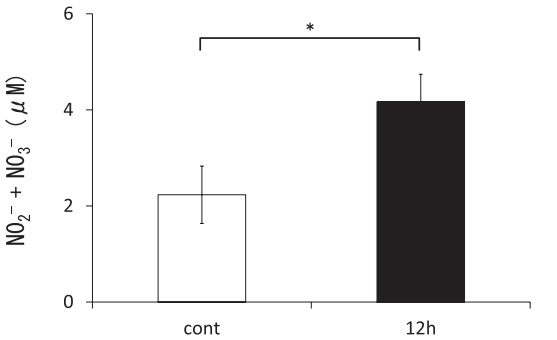


図５　培養液中のNO_2^-とNO_3^-の濃度の測定

図４と同様の方法で培養し，培養液中のNO_2^-とNO_3^-の濃度（μM）をNO_2/NO_3 Assay Kit-CII（Colorimetric）～Griess Reagent Kit用いて測定した．NO_2^-の産生は検出されなかった．NO_3^-は対照群と比べ実験群では有意に増加した．

mean ± SD，n = 3，$p < 0.05$（＊）．

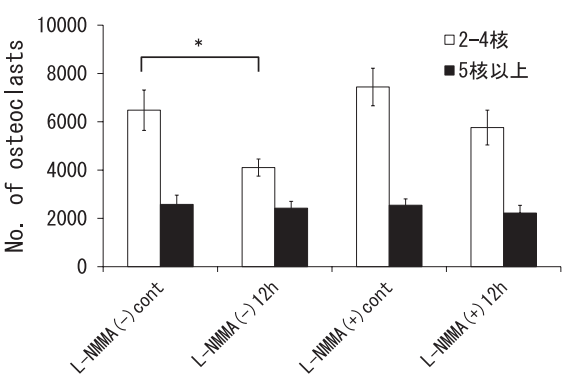


図６　NO合成酵素阻害剤存在下における破骨細胞数の変化

培養４日目から２日間にわたり12 h/日，伸展率10 %で機械的刺激を与えた．実験群にはNO合成酵素阻害剤（L-NMMA）を添加した．L-NMMA添加群において２–４核の破骨細胞は対照群と比べ破骨細胞数の有意な減少を認めなかった．L-NMMA非添加群では対照群と比べ２–４核の破骨細胞数に有意な差を認めた．L-NMMA添加群および非添加群において５核以上の破骨細胞数に有意な差を認めなかった．

mean ± SD，n = 3，$p < 0.05$（＊）．

Flexcell tension systemによる機械的刺激を与えられたものと対照群で，real-time PCR法で破骨細胞関連遺伝子である，TRAP，RANKL，NFATc1，OC-STAMP，DC-STAMP，iNOSおよびnNOSのmRNAの発現量を測定した．破骨細胞の融合因子の１つであるDC-STAMPは機械的刺激により有意に減少した．しかし，それ以外の関連遺伝子で有意な差は認められなかった（図７）．

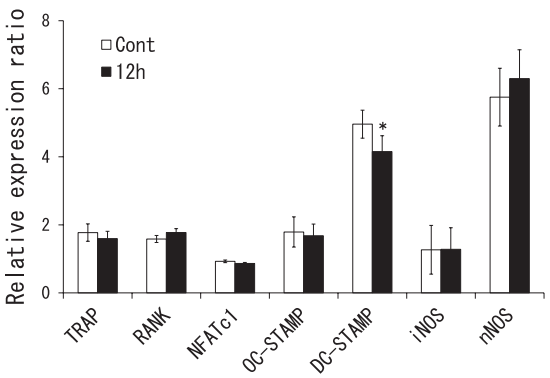


図７　破骨細胞関連遺伝子のmRNA発現量の変化
培養４日目から２日間にわたり12 h/日，伸展率10 %で機械的刺激を与え回収しmRNAの発現量をreal-time-PCR法にて測定した．破骨細胞関連遺伝子において，破骨細胞の融合因子であるDC-STAMPのみ対照群と比べ発現量が有意に減少した．その他のmRNAは対照群と比べ有意な差を認めなかった．mean ± SD，n = 3，$p < 0.05$（＊）．

考　　察

RANKLで処理したRAW細胞から誘導された破骨細胞は，機械的刺激により影響を受けることは報告されている[10-12, 20]．これまで，Flexcell tension systemを用いて破骨細胞に機械的刺激を与えた報告では，周期的な機械的刺激（30 cycle/分）を与えた実験系が多く[10-12]，持続的な機械的刺激を与えた報告はない．本実験では破骨細胞へ持続的な機械的刺激を与えた場合の破骨細胞の動態について観察した．

破骨細胞は機械的刺激を与えない条件下においては，４日目から観察されるようになり，６日目をピークとし破骨細胞数の総数は減少した．過去の文献から[21]，これは，破骨細胞の分化・融合とアポトーシスの関係が，６日目をピークとしアポトーシスが優位になったためである．そのため本実験系においては培養６日目を上限とし実験を行った（図２）．

芝田ら，千丈らの実験ではFlexcell tension systemの周期的な伸展率は10 %に設定されている[10-12]．本実験において負荷依存的な破骨細胞の変化を観察した結果，10 %以上の持続的な機械的刺激において有意な破骨細胞数の減少が認められ，10 %以上では破骨細胞数の変化は認められなかった（図３）．この結果より，Flexcell tension systemを用いたRAW264.7細胞の破骨細胞分化誘導系に機械的刺激を与える場合，10 %が適当であることが示唆された．Flexcell tension systemの伸展率を10 %とした場合の時間依存的な破骨細胞数の変化を観察するために２日間にわたり1，3，6，12 h/日の機械的刺激を与え各時間の総破骨細胞数を測定した．破骨細胞数は時間依存的に減少傾向を示し，対照群と比べ6h群と12 h群で破骨細胞数の有意な減少が認められた．以上の結果より，RAW264.7細胞を用いた破骨細胞の分化誘導系にFlexcell tension systemを用いて機械的刺激を与える場合，時間依存的に破骨細胞数の減少が認められた（図４-Ａ）．破骨細胞はFlexcell tension systemにより周期的な機械的刺激を受けると破骨細胞数が減少することは報告されている[10-12]．今回の実験では，Flexcell tension systemによる持続的な機械的刺激によって破骨細胞の分化誘導系に対して抑制的な影響を与えることが示唆された．２-４核では時間依存的な破骨細胞数の減少が認められたが，５核以上では変化は認められなかった（図４-Ｃ）．２-４核の破骨細胞の減少はFlexcell tension systemによる持続的な機械的刺激により，破骨細胞の分化誘導系に抑制的な影響を受け，５核以上では影響を受けない可能性が示唆された．

NOの存在により破骨細胞の融合に影響を与えることは報告されている[16]．NOは非常に不安定であり，産生後直ちに酸素と反応し酸化物であるNO_2^-およびNO_3^-へと変化する．我々はFlexcell tension systemによる機械的刺激を与えられた実験群と対照群とでNO_2^-およびNO_3^-の産生量を測定した（図５）．対照群と比べNO_2^-およびNO_3^-産生量の有意な増加が認められた．また，L-NMMAで処理し同様に培養した場合，２-４核の破骨細胞数はL-NMMA存在下では対照群と比べ破骨細胞数の有意な減少が認められなかったが，L-NMMA非存在下では対照群と比べ有意な減少が認められた（図６）．また，real-time PCR法によりmRNA量を測定した結果，破骨細胞の融合因子であるDC-STAMPは対照群と比べ有意な減少が認められた．また，破骨細胞の分化の起点となるNFATc1では対照群と比べ有意な差は認められなかった．破骨細胞のNO産生に関連するiNOSおよびnNOSの発現は対照群と比べ有意な差は認められなかった．しかし，NO量の増加が認められたことから機械的刺激が破骨細胞のNOによるシグナル伝達に何らかの影響を与えていることが示唆された．芝田らは周期的な機械的刺激によりNOSの発現が増強し，NO濃度が増加し，破骨細胞数が減少したことを報告した．我々はNOSの発現量に有意な差が無く，NO濃度に有意な差が認められた．これは，周期的な機械的刺激と持続的な機械的刺激という方法の違いによる可能性が示唆されるが，今後さらなる検討が必要と考えられる．以上の結果より，Flexcell tension systemによる持続的な機械的刺激は破骨細胞の融合を抑制させる要因の一つであり，その一部にNOが関与していることが示唆された．

結　　論

破骨細胞の分化誘導系においてFlexcell tension systemによる持続的な機械的刺激が破骨細胞の融合を抑制す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院口腔機能学分野歯科矯正学教室ならびに口腔病態学分野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) Murshid SA : The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement : A review. Arch Oral Biol 73 : 25-33, 2016.
2) 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.
3) 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.
4) Kukita T, Wada N, Kukita A, Kakimoto T, Sandra F, Toh K, Nagata K, Iijima T, Horiuchi M, Matsusaki H, Hieshima K, Yoshie O, Nomiyama H : RANKL-induced DC-STAMP is essential for osteoclastogenesis. J Exp Med 200 : 941-946, 2004.
5) 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.
6) 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.
7) 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 Craniofacial Res 9 : 63-70, 2006.
8) 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.
9) Zhang F, Wang C-L, 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.
10) 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.
11) Shibata K, Yoshimura Y, Kikuiri 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.
12) 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.
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) Hong ZQ, Tao LM, Yi Z, Wei L, Xiang SJ, Li L : The effect of rotative stress on CAII, FAS, FASL, OSCAR, and TRAP gene expression in osteoclasts. J Cell Biochem 114 : 388-397, 2013.
15) Kulkarni RN, Voglewede PA, Liu D : Mechanical vibration inhibits osteoclast formation by reducing DC-STAMP receptor expression in osteoclast precursor cells. Bone 57 : 493-498, 2013.
16) Nilforoushan D, Gramoun A, Glogauer M, Manolson MF : Nitric oxide enhances osteoclastogenesis possibly by mediating cell fusion. Nitric Oxide - Biol Chem 21 : 27-36, 2009.
17) Pfaffl MW : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 29 : e45, 2001.
18) Schmittgen TD, Zakrajsek BA : Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression : validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods 46 : 69-81, 2000.
19) Zheng H, Yu X, Collin-Osdoby P, Osdoby P, Resorption B : RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-

beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone. J Biol Chem 281 : 15809-15820, 2006.

20) Hayakawa T, Yoshimura Y, Kikuiri T, Matsuno M, Hasegawa T, 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.

21) Nomura M, Yoshimura Y, Kikuiri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Koshiro K, Sano 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.

Hokkaido J. Dent. Sci., 38 : 169−176, 2018.

ORIGINAL

Continuous mechanical stress suppresses osteoclastogenesis in RAW264.7 cells

Kotaro Uemura[1, 2], Yoshitaka Yoshimura[2], Hajime Minamikawa[2], Kuniaki Suzuki[2] and Junichiro Iida[1]

ABSTRACT : Osteoclasts are bone-resorbing cells that play a pivotal role in bone remodeling. Our previous studies have been among the few in which the direct effects of mechanical stress on osteoclastogenesis were assessed. Our reports have shown inhibition of osteoclast fusion by cyclic mechanical stress. In this study, we examined the effect of continuous mechanical stress on osteoclastogenesis. We cultured RAW264.7 cells stimulated with the receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) using a BioFlex plate. Osteoclasts were stimulated using a Flexcell tension system at elongation rates of 5 %, 10 %, and 15 % for two days. (This was 4 days after the culture was initiated.) On the second day a notable increase in the number of osteoclasts was found. The number of osteoclasts showed significant decreases compared with control osteoclasts after stimulation at elongation rates of 10 % and 15 %. Osteoclasts were also stimulated at an elongation rate of 10 % for 1, 3, 6, and 12 h each day for two days, and significant decreases in the numbers of osteoclasts were found for osteoclasts that were stimulated for 6 h and 12 h. Continuous mechanical stress inhibited osteoclastogenesis were found for cyclic mechanical stress. We counted the numbers of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive osteoclasts that had 2-4 nuclei and 5 or more nuclei. We found that the number of osteoclasts with 2-4 nuclei was decreased by continuous mechanical stress. Measurement of the quantity of NO showed that the quantity increased in stimulated osteoclasts compared to that in control osteoclasts. Since the results suggested that NO was related to the decrease in the number of osteoclasts with 2-4 nuclei, we treated the cells with an NOS inhibitor (L-NMMA). Treatment with L-NMMA suppressed the decrease in number of osteoclasts with 2-4 nuclei. Measurement of mRNA expression by real-time PCR showed that the quantity of dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), which is one of the fusion factors for osteoclasts, was significantly decreased in stimulated osteoclasts compared with that in the control osteoclasts. However, there were no changes in inducible nitric oxide synthase (iNOS) and neuronal nitric oxide synthase (nNOS). The results suggest that continuous mechanical stress is one of the factors that inhibit fusion of osteoclasts and that NO is involved in the inhibition.

Key Words : mechanical stress, osteoclast, nitric oxide (NO)

[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