



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	間歇的な機械的刺激は RAW264.7 細胞において破骨細胞分化を抑制する
Author(s)	加藤, 結香; 吉村, 善隆; 上村, 光太郎 他
Citation	北海道歯学雑誌, 40(1), 5-12
Issue Date	2019-09
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/75689
Type	journal article
File Information	40_01_02 Kato.pdf



原 著

間歇的な機械的刺激は RAW264.7 細胞において破骨細胞分化を抑制する

加藤 結香¹⁾ 吉村 善隆²⁾ 上村光太郎³⁾
 南川 元²⁾ 鈴木 邦明²⁾ 飯田順一郎³⁾

抄 録：骨改造において機械的刺激が重要な役割を果たしていることが明らかとなっているが、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および持続的な機械的刺激による破骨細胞分化の抑制に関して報告してきた。本研究では、可撤式矯正装置の間歇的な使用による組織変化を想定して、間歇的な機械的刺激を加えた場合の破骨細胞分化への影響について検討した。RAW 264.7 細胞を通常に従い3日間培養した。その後、Flexcell tension system を用い、培養4日目から48時間、伸展率10%で、合計刺激時間を24時間とし、1, 2, 3, 4, 6, 12時間毎にそれぞれ持続的機械的刺激と無刺激とを繰り返し、間歇的な機械的刺激とした。48時間無刺激としたものを対照群とした。TRAP 染色にて核数ごとに破骨細胞数を測定し、破骨細胞関連遺伝子の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量した。全ての実験群では破骨細胞数が有意に抑制された。また、1時間毎の刺激付与群（1時間群）と12時間毎の刺激付与群（12時間群）を比較すると、1時間群において総破骨細胞数は有意に抑制された。特に2, 3, 4核の破骨細胞数が有意に抑制された。両群の mRNA 発現量の比較では、DC-STAMP および OC-STAMP, CD47 の発現は1時間群において有意に抑制された。12時間群に比べ1時間群では、単核の前破骨細胞同士、および単核の前破骨細胞と2～4核の少数核の破骨細胞との融合に関与している CD47 の発現抑制により、2～4核の破骨細胞数が抑制され、さらに DC-STAMP および OC-STAMP の発現抑制により総破骨細胞数が抑制されることが示唆された。以上から、間歇的な機械的刺激を付与する回数、時間によって細胞融合因子が抑制され、破骨細胞分化を抑制することが示唆された。

キーワード：間歇的な機械的刺激、破骨細胞、CD47

緒 言

メカニカルストレスに応答する組織は運動骨格系だけではなく生体内に広く分布し、とくに循環器系である血管や内皮細胞については多くの研究が報告されてきた^{1, 2)}。骨がリモデリングを行い、恒常性を維持するためには、重力や運動などの適度なメカニカルストレスが必要である^{3, 4)}。

歯科矯正治療は、歯牙に対し持続的に矯正力を加えることで周囲に骨改造が引き起こされ、歯の移動が起こるという原理に基づいて行われている^{5, 6)}。骨の反応は歯根膜を介して伝達され、歯はその支持組織とともに歯槽骨内を移動する。歯と歯周組織は咀嚼により間歇的な強い力を受け、日常的に骨のリモデリングが引き起こされ、その恒常

性が保たれる。また、歯の移動を引き起こすような矯正力を加えた場合には、組織圧迫側および牽引側では、それぞれ周囲組織に存在する線維芽細胞、骨芽細胞などにメカニカルストレスとして伝達され、歯槽骨にリモデリングが引き起こされる⁷⁾。

破骨細胞は造血幹細胞由来の多核の巨細胞で、生体内で唯一骨吸収能を有し、骨のリモデリングにおいて重要な役割を果たしている。破骨細胞の機能の低下により大理石骨病が引き起こされ⁸⁾、機能の亢進により骨粗鬆症や関節リウマチ、歯周疾患が誘発される^{9, 10)}。破骨細胞はさまざまな骨疾患の標的細胞として注目されており、破骨細胞分化の制御メカニズムの解明は非常に重要である。

これまでに、メカニカルストレスが骨組織に受容、伝達

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⁾ 〒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科口腔病態学分野細胞分子薬理学教室（主任：鈴木 邦明 教授）

³⁾ 〒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科口腔機能学分野歯科矯正学教室（主任：飯田順一郎 教授）

される分子メカニズムを解明するため、様々な実験系が考案され、灌流刺激・圧迫刺激¹¹⁻¹⁴⁾・伸展刺激¹⁵⁻¹⁹⁾・静水圧刺激²⁰⁾・回転刺激²¹⁾・振動刺激²²⁻²⁴⁾などがメカニカルストレスとして用いられている。骨芽細胞や歯根膜由来線維芽細胞に対してメカニカルストレスを加えた実験系や、骨芽細胞と破骨細胞を共培養しメカニカルストレスを加えた実験は数多く報告されている一方で、破骨細胞を単独培養して、直接メカニカルストレスを加えた研究は少ない。Shibata ら¹⁶⁾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48時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。その結果、機械的刺激の付与により、破骨細胞の融合は有意に抑制されたと報告している。Kameyama ら¹⁷⁾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時間にわたり機械的刺激を与え、短時間刺激を作用させた場合の破骨細胞の変化について観察した。いずれの条件においても破骨細胞数の抑制が認められ、特に24時間作用させた場合に顕著に抑制されたと報告した。その後、上村ら¹⁸⁾は、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場合の破骨細胞の変化を観察した。RAW264.7 細胞を3日間培養し、その後、5, 10, 15 %の伸展率で24時間機械的刺激を持続的に付与した場合、対照群と比較し、10 %および15 %で有意な破骨細胞数の抑制を認めた。さらに、刺激付与時間を1, 3, 6, 12 時間/日とし、2日間刺激を与えた場合、6時間、12時間で有意な破骨細胞数の抑制が認められた。

歯科矯正の臨床において、日常的に可撤式の装置は選択される。成長期の患者の成長のコントロールや、マルチブラケット装置での治療後の保定など、その使用目的は多岐にわたる。我々矯正歯科医は、患者に対し可能な限り長時間使用するよう協力を要請するが、可撤式であるが故にその協力度は患者自身に委ねられる。また、日中の使用に関しては、食事や学校、仕事など様々な場面において外す必要性が出てくるとも容易に想像できる。このように、可撤式の装置は1日の使用の中で、その頻度に個人差はあるものの、頻回に着脱が繰り返されている。可撤式の装置の使用においては1日に12時間以上、間歇的な力が歯および歯周組織に加えられることが望ましいとされる。そこで、合計刺激時間を一定とした場合に、間歇的な機械的刺激の間隔差が破骨細胞に対しどのような影響を与えるのか、我々は破骨細胞もメカニカルストレスを感知していると考え、牽引側歯根膜での破骨細胞の反応を想定して、間歇的な機械的刺激が破骨細胞の分化に与える影響を検索した。

材 料 と 方 法

1. 細胞の培養

破骨細胞の前駆細胞として、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, USA) を使用した。RAW 細胞は RANK を発現しており、M-CSF による刺激が無くとも RANKL の刺激により破骨細胞に分化することが可能である。10 %牛胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 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, USA) 上の培地の中で、37 $^{\circ}\text{C}$ 、5 % CO_2 の気相下にて一晚培養し、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。well底部がシリコン膜で構成され、表面を 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 細胞を播種した。細胞密度は、1-well あたり 9.0×10^4 個となるように調整した。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, USA), 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 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

Flexcell tension system は BioFlex plate (6-well, 9.6 cm^2 /well) と台座の間を陰圧にし、細胞が播種されたシリコン膜を伸展することで細胞に対し機械的刺激を与える。

本実験は、Bio Flex plate 上で 37 $^{\circ}\text{C}$ 、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) を用いて次の条件で機械的刺激を与えた。RAW 細胞を RANKL で処理して破骨細胞を誘導した日を 1 日目とし、培養 4 日目から 2 日間、伸展率 10 % で、合計刺激時間を 24 時間とし、1, 2, 3, 4, 6, 12 時間毎にそれぞれ持続的な機械的刺激と無刺激とを繰り返し、間歇的な持続的な機械的刺激を与えた (図 1)。なお、機械的刺激の付与方法は、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、今回のような一定時間、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た。

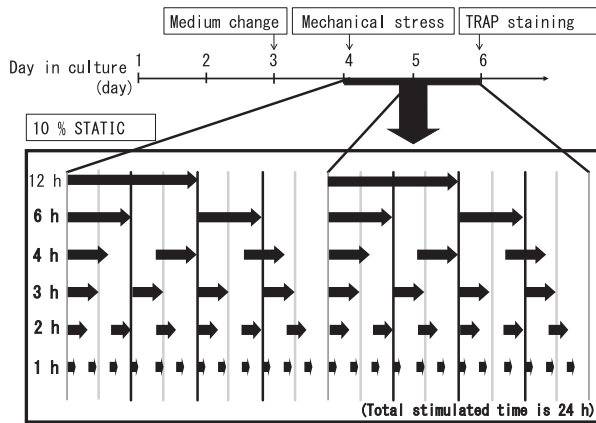


図1 間歇的な機械的刺激の付与日程

RAW 細胞を RANKL で処理して破骨細胞を誘導した日を1日目とし、培養4日目から Flexcell tension system を用いて、伸展率10 %でシリコン膜を伸展させ機械的刺激を与えた。合計刺激時間は24時間とし、それぞれ12 h, 6 h, 4 h, 3 h, 2 h, 1 h持続的機械的刺激と無刺激を交互に繰り返した。

3. 酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性細胞数の計測

細胞を各条件下で培養後、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。光学顕微鏡を用い、2 から7核のそれぞれの細胞数、および残りの多核の破骨細胞を8核以上として細胞数を計測した。

4. 逆転写反応と real-time PCR

培養4日目の1回目の持続的刺激 (12時間および1時間) 除去後、15分後、30分後に Trizol (Invitrogen) を用いて細胞から 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。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), CD47 (Mm00495011_m1), syncytin-A (Mm02744887_s1) 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^{25, 26)}。

5. 統計学的分析

すべての結果は平均値 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) で示し、2 群間における統計処理には、Student's t-test を行った。p<0.05 のときに統計的に有意差を認めるとした。

結 果

1. TRAP 陽性破骨細胞数の経時的变化

RAW 細胞を RANKL で処理して破骨細胞を誘導した日を1日目とし、破骨細胞の分化・融合の経時的な変化について観察した。培養2日目には破骨細胞は認められなかったが、3日目から6日目にかけて細胞数は増加した。6日目をピークとし、破骨細胞数は減少した (図2)。以上から、以降の実験については、機械的刺激は4日目~5日目に付与することとし、以降の実験日程は6日目を上限とした。

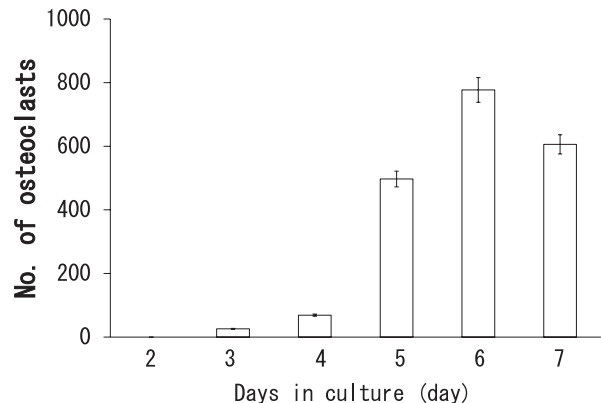


図2 培養日数別の総破骨細胞数

RAW 細胞を RANKL で処理して破骨細胞を誘導した日を1日目とし、2~7日目に10 %中性ホルマリンにて固定した。2核以上の破骨細胞は3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 $\pm$ SD, n = 4.

2. 間歇的な機械的刺激が破骨細胞に与える影響

Flexcell tension system を用い、破骨細胞に機械的刺激を与える際、合計刺激時間が24時間となるように、4日目から間歇的な機械的刺激を与えた。伸展率は10 %で、機械的刺激を与えなかった群を対照群とし、対照群の細胞数を100 %として各実験群の細胞数を比較した。その結果、対照群に対し、全ての実験群で破骨細胞数は有意に抑制された。特に1時間毎の刺激付与群 (1時間群) で破骨細胞数が大きく抑制され、12時間毎の刺激付与群 (12時間群) と比較すると、1時間群において総破骨細胞数の増加は有意に抑制された (図3-A)。特に、2, 3, 4核の破骨細胞数が有意に抑制されていた (図3-B)。5, 6, 7核および8核以上の破骨細胞数は1時間群と12時間群の間で有意な差は認められなかった。

3. 破骨細胞関連遺伝子の発現

破骨細胞の抑制に差が認められた1時間群と12時間群を比較するため mRNA 発現量を real-time PCR を用いて、刺激除去後15分後、30分後に測定した。その結果、DC-STAMP および OC-STAMP, CD47 の発現量は1時間群

において有意に抑制されたが、刺激除去後15分後、30分後のいずれにおいても TRAP, RANK, NAFTc1 および syncytin-A の mRNA 発現量においては有意な差を認めなかった (図4-A, B, C, D)。

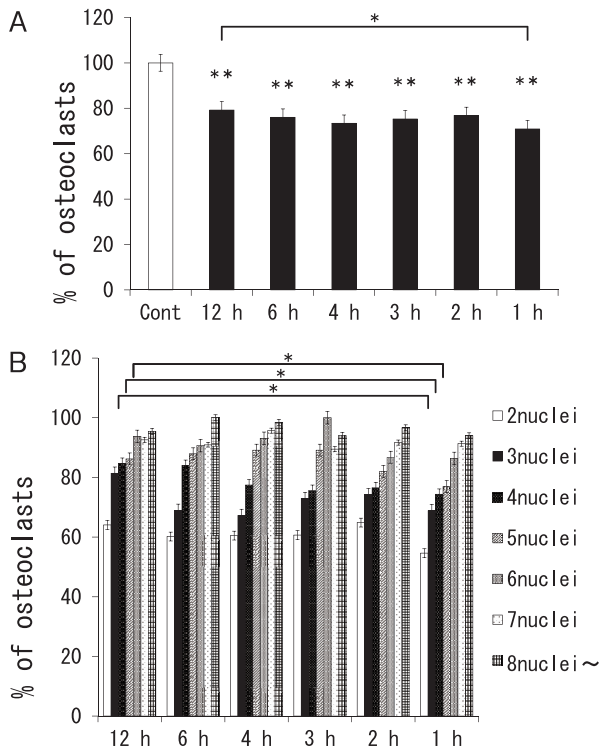


図3 刺激時間毎の破骨細胞の抑制率

培養4日目から Flexcell tension system を用いて、伸展率10 % でシリコン膜を伸展させ機械的刺激を与え、培養6日目に10 % 中性ホルマリンで固定後、TRAP 染色を行った。対照群を100 % とし各実験群の細胞数を比較した。

A. 対照群に比較し、実験群では破骨細胞数は有意に抑制された。また、12時間群 (12 h) と1時間群 (1 h) で比較すると1 h で有意に抑制を認めた。

B. 核数別の破骨細胞数では対照群に比較し、全ての実験群において2, 3, 4核の破骨細胞は有意に増加が抑制された。特に2核において抑制された。12 h と1 h で比較すると、2, 3, 4核の少数核の破骨細胞は1 h で有意にその増加が抑制された。

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

考 察

今回の実験において、機械的刺激は培養開始4日目から付与し、6日を上限として行った。これは、これまでの研究において、RAW 細胞から誘導された破骨細胞は培養3日目に出現し、その後6日目まで増加を続けた後、細胞死に至ることが報告されてきたためであり²⁷⁾、今回の結果 (図2) から証明された。Shibata ら、Kameyama らの実験では、培養4日目から Flexcell tension system の周期的な機械的刺激を与えており、その伸展率は10 % に設定されていた^{16, 17)}。上村らの実験から、RAW 細胞を用

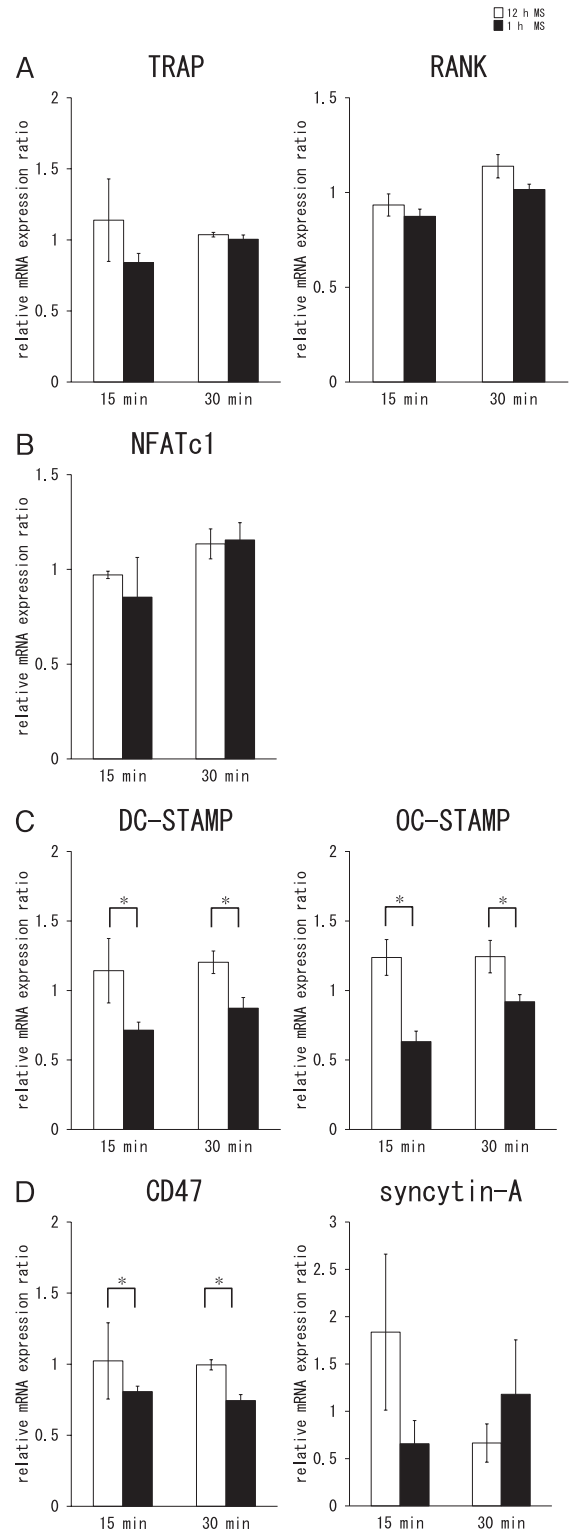


図4 破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化

培養4日目から伸展率10 % で、それぞれ12 h (12 h MS: □), 1 h (1 h MS: ■) 機械的刺激を付与し、刺激除去15分後、30分後に回収した mRNA の発現量を、real-time PCR 法にて測定した (MS: Mechanical Stress)。破骨細胞の融合因子である DC-STAMP, OC-STAMP, CD47 において、対照群と比べ発現量が有意に減少した (C, D)。TRAP, RANK, NAFTc1, syncytin-A では対照群に比べ有意な差を認めなかった (A, B, D)。

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

いた破骨細胞の分化誘導系に Flexcell tension system を用いて持続的機械的刺激を与える場合においても10 %の伸展率が適当であることが示されたことから¹⁸⁾、本研究においても同様の条件を設定した。また、本研究では間歇的な機械的刺激の影響を観察するため、2日間の刺激付与時間を合計で24時間とし、各群に刺激を与えた。これは、上村らの結果から対照群に対し特に12時間群において破骨細胞の増加が抑制され、また、臨床においても装置の使用時間は一日に12時間程度を目安とすることが多いためである。今回の結果において、間歇的な機械的刺激により、2, 3, 4核の破骨細胞の増加が有意に抑制されたが、5, 6, 7核および8核以上の破骨細胞数は有意な差が認められなかった。従って、Flexcell tension system による間歇的な機械的刺激は、2～4核の少数核の破骨細胞の増加を抑制し、総破骨細胞数の減少を引き起こす要因となっていることが示唆された。機械的刺激と核数別の破骨細胞数について報告しているのは上村らのみであり¹⁸⁾、少数核の破骨細胞の分化・融合の抑制に破骨細胞の産生する NO 量が関与していると報告したが、詳細は不明のままである。

本研究において、12時間群、1時間群の核数別の破骨細胞数を比較すると、1時間群で2～4核の破骨細胞数は増加抑制された。この間歇的な機械的刺激による少数核の破骨細胞の増加抑制の原因因子を探るために、破骨細胞のマーカー遺伝子である TRAP, RANK やマスター遺伝子と言われる NAFTc1 に加え、破骨細胞融合に関連する遺伝子である DC-STAMP, OC-STAMP, CD47 および syncytin-A に注目した。骨吸収を引き起こすために、破骨細胞の融合は必須の現象であり、細胞融合において最も重要な遺伝子は DC-STAMP である。DC-STAMP は細胞融合の中心的役割を担っており²⁸⁾、樹状細胞、マクロファージおよび破骨細胞に存在し、破骨細胞の多核化に必要不可欠とされている²⁹⁾。さらに、細胞融合は DC-STAMP だけでなく、CD47³⁰⁻³³⁾、syncytin-1^{33, 34)} および syncytin-A^{35, 36)}、OC-STAMP^{37, 38)} などの複数の転写因子により調節されていることが明らかとなってきた。syncytin-1 はヒト、syncytin-A はマウスに特有であり、同じ働きをしている。タイムラプスにより破骨細胞の融合をリアルタイムで観察した報告³³⁾によると、CD47 は単核の前破骨細胞同士、および単核の前破骨細胞と2～5核の少数核の破骨細胞との融合に関与し、中和抗体の添加により少数核の破骨細胞の増加が抑制されたと報告されている。一方で syncytin-1 および syncytin-A は多数核の破骨細胞同士の融合に関与しており、多核の破骨細胞数の増加および単核の前破骨細胞同士の融合の抑制に関与していると報告された^{33, 34)}。また、OC-STAMP^{37, 38)}においても3核以上の破骨細胞の融合への関与が報告されている。今回の結果において、12時間群、1時間群の刺激除去後の変化を比較すると、TRAP, RANK, NAFTc1 およ

び syncytin-A では両群においての差は認められず、DC-STAMP, OC-STAMP および CD47 において、1時間群で mRNA の発現は有意に抑制された。このことから、間歇的な機械的刺激は、単核の前破骨細胞同士および単核の前破骨細胞と2～5核の少数核の破骨細胞との融合に関与している CD47 の発現抑制により、2～4核、特に2核の破骨細胞数を減少させたことが示唆された。一方、OC-STAMP の発現は抑制されたものの、syncytin-A の発現は抑制されていないため、多数核の破骨細胞同士の融合は抑制されておらず、5核以上の破骨細胞数の有意な増加抑制が認められないことが示唆された。破骨細胞の融合ではそれぞれの破骨細胞が持つ核数には様々な組合せが考えられるが、始めに単核同士の融合が生じて2核の破骨細胞が生じるため、CD47 の発現抑制は破骨細胞数の増加抑制に大きく関与していることが示唆された。

以上より、間歇的な機械的刺激は、CD47 の発現抑制に加えて、OC-STAMP, DC-STAMP の抑制を引き起こし、破骨細胞の増加を抑制したことが示唆された。

結 論

破骨細胞の分化誘導系において Flexcell tension system による間歇的な機械的刺激の回数および時間が破骨細胞の分化・融合に影響を与えることが示された。以上より、破骨細胞もメカニカルストレスを感じし、間歇的な機械的刺激の付与により種々のシグナル伝達に変化が生じ、破骨細胞の分化・融合の抑制が起こ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) Civelekoglu-Scholey G, Orr AW, Novak I, Meister JJ, Schwartz MA, Mogilner A : Model of coupled transient changes of Rac, Rho, adhesions and stress fibers alignment in endothelial cells responding to shear stress. *J Theor Biol* 232 : 569-585, 2005.
- 2) Bassey EJ, Ramsdale SJ : Increase in femoral bone density in young women following high-impact exercise. *Osteoporos Int* 4 : 72-75, 1994.
- 3) Thompson WR, Rubin CT, Rubin J : Mechanical regulation of signaling pathways in bone. *Gene* 503 : 179-193, 2012.

- 4) Al Nazer R, Lanovaz J, Kawalilak C, Johnston JD, Kontulainen S : Direct in vivo strain measurements in human bone-a systematic literature review. *J Biomech* 45 : 27-40, 2012.
- 5) Murshid SA : The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review. *Arch Oral Biol* 73 : 25-33, 2016.
- 6) Krisshnan V, Davidovitch Z : Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129 : 469.e1-32, 2006.
- 7) Terai K, Takano-Yamamoto T, Ohba Y, Hiura K, Sugimoto M, Sato M, Kawahata H, Inaguma N, Kitamura Y, Nomura S : Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J Bone Miner Res* 14 : 839-849, 1999.
- 8) Milhaud G, Labat ML : Thymus and osteopetrosis. *Clin Orthop Relat Res* 135 : 260-271, 1978.
- 9) Bromley M, Woolley DE : Chondroclasts and osteoclasts at subchondral sites of erosion in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum* 27 : 968-975, 1984.
- 10) Belibasakis GN, Bostanci N : The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* 39 : 239-248, 2012.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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.
- 17) 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.
- 18) 上村光太郎, 吉村善隆, 南川 元, 鈴木邦明, 飯田順一郎 : 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. *北海道歯学雑誌*, 38 : 169-176, 2018.
- 19) Li F, Sun X, Zhao B, Ma J, Zhang Y, Li S, Li Y, Ma X : Effects of cyclic tension stress on the apoptosis of osteoclasts in vitro. *Exp Ther Med* 95 : 1955-1961, 2015.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.
- 23) Hanmoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo T, Kitamura KI, Endo M, Kobayashi I, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A, Suzuki N : Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts : Analysis with goldfish scales as a model of bone. *Biomed Res* 38 : 71-77, 2017.
- 24) 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.
- 25) Pfaffl MW : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 : e45, 2001.
- 26) 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.

- 27) 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.
- 28) Hartgers FC, Vissers JL, Looman MW, van Zoelen C, Huffine C, Figdor CG, Adema GJ : DC-STAMP, a novel multimembrane-spanning molecule preferentially expressed by dendritic cells. *Eur J Immunol* 30 : 3585-3590, 2000.
- 29) Xing L, Xiu Y, Boyce BF : Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop* 3 : 212-222, 2012.
- 30) Han X, Sterling H, Chen Y, Saginario C, Brown EJ, Frazier WA, Lindberg FP, Vignery A : CD47, a ligand for the macrophage fusion receptor, participates in macrophage multinucleation. *J Biol Chem* 245 : 37984-37992, 2000.
- 31) Lundberg P, Koskinen C, Baldock PA, Lothgren H, Stenberg A, Lerner UH, Oldenborg PA : Osteoclast formation is strongly reduced both in vivo and in vitro in the absence of CD47/SIRPalpha-interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352 : 444-448, 2007.
- 32) Hobolt-Pedersen AS, Delaisse JM, Soe K : Osteoclast fusion is based on heterogeneity between fusion partners. *Calcif Tissue Int* 95 : 73-82, 2014.
- 33) Moller AM, Delaisse JM, Soe K : Osteoclast Fusion: Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at different stages of Nuclearity. *J Cell Physiol* 232 : 1396-1403, 2017.
- 34) Soe K, Andersen TL, Hobolt-Pedersen AS, Bjerregaard B, Larsson LI, Delaisse JM : Involvement of human endogenous retroviral syncytin-1 in human osteoclast fusion. *Bone* 48 : 837-846, 2011.
- 35) Mangeney M, Renard M, Schlecht-Louf G, Bouallaga I, Heidmann O, Letzelter C, Richaud A, Ducos B, Heidmann T : Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 104(51) : 20534-20539, 2007.
- 36) Dupressoir A, Vernochet C, Bawa O, Harper F, Pierron G, Opolon P, Heidmann T : Syncytin-A knockout mice demonstrate the critical role in placentation of a fusogenic, endogenous retrovirus-derived, envelope gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(29) : 12127-12132, 2009.
- 37) 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.
- 38) Witwicka H, Hwang SY, Reyes-Gutierrez P, Jia H, Odgren PE, Donahue LR, Birnbaum MJ, Odgren PR : Studies of OC-STAMP in Osteoclast fusion: A New knockout mouse model, rescue of cell fusion, and transmembrane topology. *PLoS ONE* 10 : 0128275, 2015.

ORIGINAL

Suppression of Osteoclast Differentiation with Intermittent Mechanical Stress in RAW264.7 Cells

Yuka Kato¹⁾, Yoshitaka Yoshimura²⁾, Kotaro Uemura³⁾, Hajime Minamikawa²⁾,
Kuniaki Suzuki²⁾ and Junichiro Iida³⁾

ABSTRACT :

Mechanical stress plays an important role in the remodeling of bone. In previous reports by this research team, we showed the suppression of osteoclast fusion by cyclic mechanical stress. In this study, we examined the effects of intermittent continuous mechanical stress on osteoclastogenesis. We cultured RAW264.7 cells stimulated with the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL) using a BioFlex plate. Osteoclasts were stimulated using a Flexcell tension system at elongation rates of 10 % for 2 days from the fourth day of culture. In different treatments, mechanical stress was applied for 24 h, followed by bouts of continuous mechanical stress and no stress alternating at 1, 2, 3, 4, 6, or 12 h. In addition, we assayed osteoclast-related genetic mRNA expression using the real-time PCR method. We counted the number of tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP)-positive osteoclasts with 2, 3, 4, 5, 6, or 7 nuclei, and those with more nuclei. The number of osteoclasts was lower after mechanical stress when compared with no mechanical stress. The number of total osteoclasts was significantly suppressed in the group stimulated every hour (1-h group) when compared with the group that was stimulated every 12 h (12-h group). Furthermore, we found that the number of osteoclasts with 2-4 nuclei was significantly reduced by intermittent continuous mechanical stress. The measurement of mRNA expression using real-time PCR showed the suppression of DC-STAMP, OC-STAMP, and CD47, which are fusion factors for osteoclasts. These significantly decreased in the 1-h group compared with that in 12-h group. CD47 participates in cell fusion with the mononuclear preosteoclasts among each other, and among the mononuclear preosteoclasts and those with 2-5 nuclei. Thus, the suppression of CD47 expression could reduce the number of osteoclasts with 2–4 nuclei. Furthermore, the total number of osteoclasts was reduced by the suppression of DC-STAMP and OC-STAMP expression. These results suggest that intermittent continuous mechanical stress is one factor that suppresses the fusion of osteoclasts, and that the cell fusion factor is controlled by the duration and frequency of intermittent stimulation by sustained extension.

Key Words : intermittent mechanical stress, osteoclast, CD47

¹⁾Department of Orthodontics, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Junichiro Iida), North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.

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

³⁾Department of Orthodontics, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Junichiro Iida), North 13, West 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586, Japan.