



Title	RAW細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響
Author(s)	柳澤, 瞳子; Yanagisawa, Toko; 吉村, 善隆 他
Citation	北海道歯学雑誌, 43, 29-35
Issue Date	2022-09-15
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/86833
Type	journal article
File Information	43_05.pdf



原 著

RAW細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響

柳澤 瞳子^{1,2)} 吉村 善隆²⁾ 早川 貴子²⁾ 福島 久夢²⁾
飯村 忠浩²⁾ 佐藤 嘉晃¹⁾

抄 録 : 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反応として捉えることができる。歯周組織に矯正力が加わることにより、圧迫側では骨添加の抑制と骨吸収の促進が、牽引側では骨吸収の抑制と骨添加の促進が起こり、骨のリモデリングが生じる。

細胞に直接的に機械的刺激を加えることで、RAW264.7 (RAW) 細胞から破骨細胞への分化誘導系に与える影響を調べようとしたところ、RAW細胞の継代数により破骨細胞の分化・誘導に違いが生じた。RAW細胞の継代数と破骨細胞の分化誘導系の関連を検討した報告は未だないため、本研究で検討した。継代数が10未満であるN10RAW細胞と継代数が30以上であるN30RAW細胞に対して破骨細胞誘導培地を用いて7日間培養し、破骨細胞数の推移を観察した。N10RAW細胞から分化したN10破骨細胞は4日目をピークとして増加し、その後減少した。N30RAW細胞から分化したN30破骨細胞は6日目をピークとして増加し、その後減少した。次に細胞増殖試験を行った結果、N10RAW細胞とN30RAW細胞に有意差を認めなかった。破骨細胞関連遺伝子であるTRAP, RANK, CD47, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin α V, Integrin β III, CD11a, CD11bの発現量の差を調査するために、Real time RT-PCR法を行った。培養3日目ではRANK, NFATc1, Integrin β IIIでは有意差を認めなかったが、細胞融合因子であるCD47, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin α Vにおいて、N10破骨細胞と比較してN30破骨細胞では有意に減少した。これらの結果から培養3日目にN10破骨細胞と比較してN30破骨細胞では破骨細胞の細胞融合が抑制されることが示唆された。以上の結果から、破骨細胞への分化が早いN10破骨細胞と分化が遅いN30破骨細胞を実験に用いる際には、それぞれの特性を活かして用いなければならないことが示唆された。

キーワード : RAW264.7細胞, 破骨細胞, 継代数

緒 言

歯科矯正治療による歯の移動は、持続的な機械的刺激である圧縮力や牽引力といったメカニカルストレスに対する歯周組織の反応として捉えることができる。歯周組織には、線維芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞などが存在しており、それらに矯正力が加わることにより、圧迫側では骨添加の抑制と骨吸収の促進が認められ、牽引側では骨吸収が抑制され、骨添加が促進され、骨のリモデリングが生じる¹⁻⁴⁾。

破骨細胞は多核の巨大細胞で、receptor activator of nuclear factor κ B ligand (RANKL) が破骨細胞の細胞膜上にある受容体receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) に結合し、細胞内シグナルを活性化し、破骨細胞関連遺伝子を活性化することで骨吸収を生じる。造血幹細胞から分化した単球は、macrophage colony-stimulating

factor (M-CSF) の受容体であるc-FMSを発現していて、M-CSF刺激を受けることによりRANKを発現する。RANKL刺激を受けると、単核の破骨細胞前駆細胞、前破骨細胞へと分化する⁵⁻⁸⁾。前破骨細胞は、破骨細胞の細胞融合に必要なシグナルであるdendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP), osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP), CD47やシンシチンなどが関与し、多核の破骨細胞が形成される⁹⁻¹²⁾。

これまで、破骨細胞の分化誘導系に対して直接機械的刺激を加え、その動態を調査した研究が報告されている。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。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¹³⁾。また、宮上らは培養3日目に破骨細胞に圧縮力を加えた後、

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: 佐藤 嘉晃 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 薬理学教室 (主任: 飯村 忠浩 教授)

長期的に培養した場合、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により、破骨細胞の分化・融合を抑制することを報告した¹⁴⁾。

早川らや宮上らの研究と同様に、破骨細胞の分化誘導系に圧縮力を加えて分化・融合の動態を観察しようとしたところ、RAW264.7細胞 (RAW細胞) の継代数により破骨細胞の分化・融合に違いが生じた。これまでRAW細胞の継代数が細胞の増殖や機能にあたる影響についての報告はなされているが、RAW細胞の継代数と破骨細胞の分化誘導系との関連をみた報告はない。

このような背景から、RAW細胞の継代数が破骨細胞の分化誘導系にどのような影響を与えるか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RAW細胞 (ATCC no. TIB-71TM; 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を恒常的に発現しており、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可能である。10%牛胎児血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と66.7 μ 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。ATCC入手後継代数が10未満のRAW細胞 (N10RAW細胞) と、継代数が30以上のRAW細胞 (N30RAW細胞) を各々100 mmスタンダードディッシュ (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) 上の培地の上で、37°C、5%CO₂-95%気相下にて一晩培養し、0.48 mM EDTA含有Dulbecco's phosphate-buffered saline (Ca²⁺, Mg²⁺ 不含) で洗浄後、細胞を回収した。24穴マルチウェルプレート (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルにRAW細胞を1ウェルあたり1.0 \times 10⁴個の細胞密度に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 μ M L-アスコルビン酸-2-リン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 66.7 μ g/ml硫酸カナマイシン及び50 ng/ml RANKL (Oriental Yeast Crop, Tokyo, Japan) を含む α -minimum essential培地 (α -MEM; Wako Pure Chemical) (分化誘導培養液) を用いて37°C、5%CO₂-95%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、7日目まで培養を行った。また、培養液は培養2日ごとに交換した。

2. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 陽性細胞数の計測

RAW細胞から誘導された破骨細胞の動態を調べるため

に、24穴マルチウェルプレート上でN10RAW細胞とN30RAW細胞を、分化誘導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N10RAW細胞から誘導されたN10破骨細胞とN30RAW細胞とから誘導されたN30破骨細胞を10%中性ホルマリン溶液にて固定した。その後、蒸留水で洗浄し、Naphthol AS-MX phosphate (Sigma-Aldrich) とFast Red Violet LB salt (Sigma-Aldrich) を加えた0.1M sodium acetate bufferを用いて酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色液 (pH: 5.0) にて染色を行った。光学顕微鏡にて、総破骨細胞 (2核以上) 数、2から7核 (小型破骨細胞数) を各核数でそれぞれ計測し、残りの多核の破骨細胞 (8核以上) 数を計測した。

3. 細胞増殖試験

N10RAW細胞とN30RAW細胞の細胞増殖能の差を調べるためにRAW細胞増殖用培養液を用いて細胞増殖試験を行った。細胞増殖試験にはCell Counting Kit-8 (Dojindo Laboratories) を使用した。96穴プレートの各ウェルにRAW細胞を1ウェルあたり5.0 \times 10⁴個となるように播種し、5%CO₂-95%気相下にて培養した。播種した時間を0時間とし、24, 48, 72時間ごとにCCK-8溶液を10 μ lずつ添加し、呈色反応を行ったのちに、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定した。

4. Real time RT-PCR

細胞の継代数が破骨細胞関連遺伝子に及ぼす影響について調査するためにReal time RT-PCR法を行った。分化誘導培養液にて培養を開始してから3日目に分化誘導培養液を交換した後、1, 3, 6時間後にTRIzol (Invitrogen, MD, USA) を用いてRNAを回収し、N10破骨細胞とN30破骨細胞の破骨細胞関連遺伝子の発現量を比較した。Rever Tra Ace reverse transcriptase (Toyobo, Osaka, Japan) とOligo (dT) primerを用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。N30RAW細胞とN10RAW細胞の破骨細胞関連遺伝子の発現量を比較するために、ABI7300 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) を用いてReal time PCRを行った。プライマー (Applied Biosystem) は以下のものを使用した。TRAP (Mm00475698_m1), RANK (Mm00477135_m1), CD47 (Mm00495011_m1), nuclear factor of activated T cells-cytoplasmic 1 (NFATc1) (Mm01265944_m1), DC-STAMP (Mm04209236_m1), OC-STAMP (Mm00512445_m1), Integrin α V (Mm00434506_m1), Integrin β III (Mm00443980_m1), CD11a (Mm00801807_m1), CD11b (Mm00434455_m1) およびglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Mm99999915_g1) である。各サンプルの遺伝子発現量はGAPDHの発現量を用いて標準化して2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法

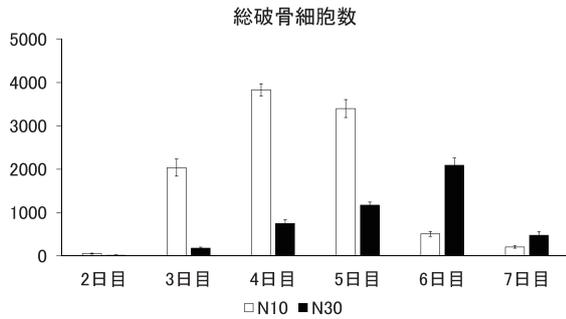


図1 N10破骨細胞とN30破骨細胞の培養2日目から培養7日目までの総破骨細胞数

N10RAW細胞とN30RAW細胞を破骨細胞誘導培養液で培養後、2日目から7日目に10%中性ホルマリンにて固定した。N10破骨細胞は4日目をピークに5日目以降減少している。N30破骨細胞は6日目をピークに7日目以降減少している。mean ± SD, n=4

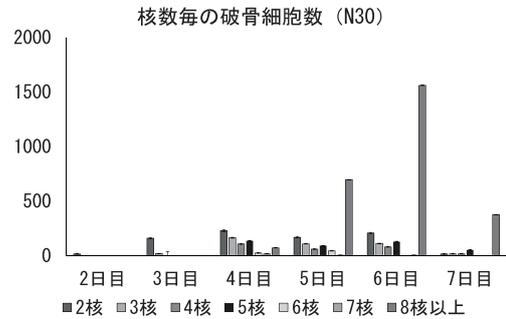


図3 培養2日目から培養7日目におけるN30破骨細胞の核数毎の破骨細胞数

N30RAW細胞を破骨細胞誘導培養液で培養後、2日目から7日目に10%中性ホルマリンにて固定した。8核以上の破骨細胞も含めて6日目をピークにそれ以降は減少した。mean ± SD, n=4

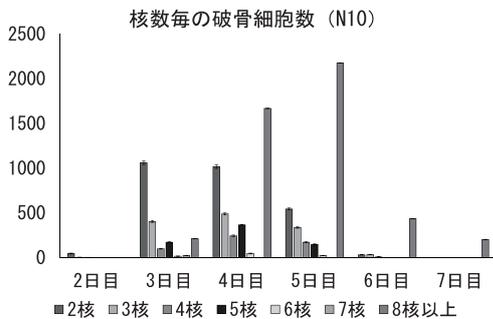


図2 培養2日目から培養7日目におけるN10破骨細胞の核数毎の破骨細胞数

N10RAW細胞を破骨細胞誘導培養液で培養後、2日目から7日目に10%中性ホルマリンにて固定した。8核以上の細胞は5日目を過ぎても観察されるが、その他の核数の破骨細胞は4日目をピークとして5日目には減少した。mean ± SD, n=4

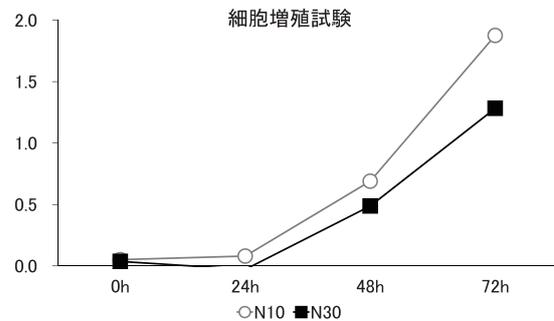


図4 N10RAW細胞とN30RAW細胞の細胞増殖試験

N10RAW細胞とN30RAW細胞を細胞増殖用培養液で培養後、0, 24, 48, 72 h後に測定した。両者の細胞増殖能に有意な差は認められない。n=4

にて計算した^{15,16)}。

5. 統計学的分析

全ての結果は平均値 ± 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の時、有意差を認めることとした。

結 果

1. TRAP陽性破骨細胞数の動態変化

RAW細胞から誘導された破骨細胞の動態を観察した。総破骨細胞数は両者とも培養2日目から2核以上の破骨細胞が少量観察されるようになり、N10破骨細胞では2日目から3日目にかけて増加し、4日目をピークとしてその後は減少した。N30破骨細胞では3日目から4日目にかけて増加し、6日目をピークとしてその後は減少した (図1)。核数別の破骨細胞数は、N10破骨細胞では2核の細胞のピークは3~4日目であるのに対し、8核以上の破骨細胞は5

日目を過ぎても観察され、総破骨細胞のピークが4日目の結果と異なった (図2)。N30破骨細胞では、8核以上の破骨細胞も含めて6日目をピークとし、それ以降は減少した (図3)。

2. 細胞増殖能の比較

N10RAW細胞とN30RAW細胞の細胞増殖能を比較するために、Cell Counting Kit-8を使用し、細胞増殖試験を行った。N10RAW細胞と比較してN30RAW細胞は増殖能が低下しているが、有意な差は認められなかった (図4)。

3. 破骨細胞関連遺伝子の発現

細胞の継代が破骨細胞関連遺伝子の発現に対する影響について検討するために、Real time RT-PCR法を行った。破骨細胞関連遺伝子のTRAP, RANK, CD47, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin α V, Integrin β III, CD11a, CD11bについて検討した。TRAPは1, 3, 6時間全てでN10破骨細胞に対してN30破骨細胞は有意に発現量が

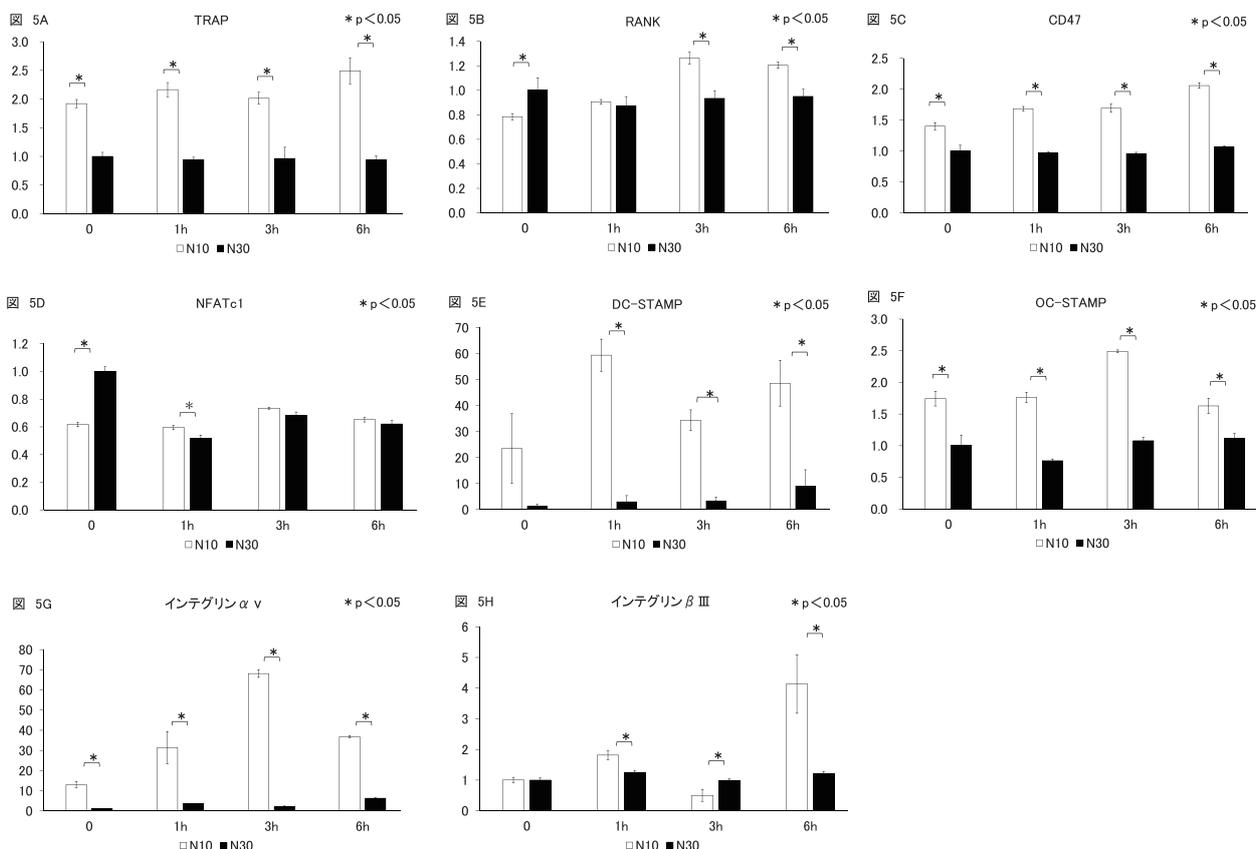


図5 破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化

N10破骨細胞, N30破骨細胞を培養3日目に1, 3, 6時間後にRNAを回収して比較を行った。TRAPはN30破骨細胞は有意に発現量が減少した。(A) 細胞融合因子であるCD47, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin αv でもN30破骨細胞がN10破骨細胞に対して有意に減少していた(C,E-G)。RANK, NFATc1, Integrin βIII ではN30破骨細胞とN10破骨細胞の間に有意な差は認められなかった(B,D,H)。A-H : mean \pm SD, n=3, p<0.05 (*)

減少した(図5A)。細胞融合因子であるCD47, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin αv でもN30破骨細胞がN10破骨細胞に対して有意に減少していた(図5C, 5E-G)。RANK, NFATc1, Integrin βIII ではN30破骨細胞とN10破骨細胞の間に有意な差は認められなかった(図5B, 5D, 5H)。CD11a, CD11bは検出されなかった。

考 察

本研究では, RAW細胞の継代数が破骨細胞の分化誘導系に及ぼす影響について観察した。

総破骨細胞数はN10破骨細胞では, 培養2日目から破骨細胞に形成を開始し, 4日目にかけて増加した後, 減少した。N30破骨細胞も同様に培養2日目から破骨細胞形成を開始したが, 6日目まで増加し, それ以降減少した(図1)。破骨細胞は, 分化・誘導が完了するとアポトーシスを引き起こすことが報告されており¹⁷⁾, 破骨細胞が増加のピークを迎えた後に減少傾向を示すのは, アポトーシスによる細胞死が, 細胞の分化・誘導に対し優位になったことを示唆

している。核数別に見ると, N10破骨細胞では8核以上の破骨細胞は4日目をすぎても増加しているが, それ以外の核数の破骨細胞は減少している。対してN30破骨細胞は8核以上の破骨細胞も含めて5日目以降も増加している(図2, 3)。そのためN10破骨細胞と比較して, N30破骨細胞では細胞の分化, 細胞同士の融合が遅くなっていることが示唆された。また, 連続継代18代以上のRAW細胞は破骨細胞への分化能が低下することが報告されているが¹⁸⁾, N30破骨細胞のように分化・融合のピークが遅れているものは, 破骨細胞を培養初期・中期・後期と区別することで薬物の作用や, 圧縮力などの機械的刺激を長期的に加えた際の破骨細胞の動態の変化を観察する実験などに適していることが示唆される。

今回, RAW細胞の連続継代がRAW細胞の細胞増殖能に影響を与える可能性について検討するために, RAW細胞にRANKL無添加にて細胞増殖試験を行った。本研究ではN10RAW細胞とN30RAW細胞の増殖能力に大きな差は認められなかった。このことから, RAW細胞の30継代までの継代数はRAW細胞の増殖能に影響を与えないことが示

唆された。

本研究ではReal time RT-PCR法によってN10破骨細胞とN30破骨細胞の破骨細胞関連遺伝子であるTRAP, RANK, CD47, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin α V, Integrin β III, CD11a, CD11bの発現量の違いを調査した。破骨細胞のマーカー遺伝子であり、破骨細胞のマーカー酵素であるTRAPはN30破骨細胞で有意に減少していた(図5A)。RANKLの添加により発現したRANKは3, 6時間でN30破骨細胞が有意に減少していた(図5B)。CD47は全ての時間においてN30破骨細胞は有意に発現量が減少していた(図5C)。LundbergらはCD47欠損マウスにおいて大腿骨破骨細胞が有意に減少したことから、CD47は破骨細胞の融合に関与していると報告している²⁰⁾。また、CD47は単核の前破骨細胞を含む細胞融合を促進すると報告されている²¹⁾。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²²⁾。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²²⁾。そのため、NFATc1は破骨細胞分化のマスター遺伝子であると言われている。今回の結果では0hでN30破骨細胞がN10破骨細胞より有意に増加しているが、1hで有意に減少していることが認められた。このことからNFATc1以外のシグナルが関与されていると考えられることが示唆された(図5D)。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⁹⁾。その後、OC-STAMPも破骨細胞の多核の融合に関連していることが報告されている^{10,11)}。DC-STAMP, OC-STAMPは共にRANKL刺激によって誘導され、NFATc1によって制御されており、破骨細胞の形成と分化を促進している。どちらも7回膜貫通型タンパク質であり、構造上非常に似ていることが報告されているが、DC-STAMPはOC-STAMP欠損単核破骨細胞でも発現し、逆にOC-STAMPはDC-STAMP欠損単核破骨細胞でも通常発現する。そのため、DC-STAMPおよびOC-STAMPは互いの発現を調整しないことが報告されている^{10,11,23,24)}。今回、総破骨細胞数を比較したところ、N10破骨細胞と比較してN30破骨細胞で総破骨細胞数の減少を認めた。また、核数別破骨細胞数では、N30破骨細胞の多核化の時期の遅延を認めた。遺伝子発現解析よりDC-STAMP, OC-STAMP共にN30破骨細胞で有意に発現量が減少していることから、N30破骨細胞では破骨細胞の融合が抑制されていることが示唆される(図5E, F)。Integrin α V, Integrin β IIIは共に破骨細胞が細胞外基質である骨に接着するために必要であり、N30破骨細胞でIntegrin α Vの発現量は有意に減少し

ていた(図5G)。以上の結果から培養3日目にN10破骨細胞と比較してN30破骨細胞では破骨細胞の細胞融合が抑制されることが示唆された。

RAW細胞はRANKLを添加することによって破骨細胞に分化することが可能である。RAW細胞から分化させた破骨細胞を用いて実験を行う際には、ある程度の細胞数が必要となり、そのためには細胞を継代して増やす必要がある。その際、実験者が注意しなくてはならないことは、一つの研究室内で、同様の実験を行うにあたり、RAW細胞の継代数によっては実験結果に差が生じる可能性があることである。株化細胞には継代により特性を変化しないと言われているが¹⁸⁾、RAW細胞の継代数の違いによって、同様の実験において再現性の得られない可能性があるということが本研究で示唆された。また、N10RAW細胞は破骨細胞の増殖や、分化・融合のピークが早いいため、破骨細胞数に関する実験系に用いるのが望ましいと考えられる。また、N30RAW細胞は破骨細胞の分化・融合のピークが遅れているため、培養初期・中期・後期と分けることができる。そのため、薬物の作用や、長期的な機械的刺激を加えた際の破骨細胞の動態の変化を観察する実験に用いるのが望ましいと考えられる。

結 語

継代数が10未満のRAW細胞に比べて、継代数が30以上のRAW細胞は培養3日目の破骨細胞の融合を抑制し、破骨細胞の分化・融合のピークを遅らせた。RAW細胞の継代数によって破骨細胞の特性が異なるので、各々の特性を活かした実験を行う必要性が示唆された。

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医学部門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 Orafac Orthop/Fortschr Kieferorthop 61 : 266-279, 2000.
- 2) Krishnan V, Davidovitch Z : Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. Am J Orthod Dentofacial Orthop 129 : 469.e1-469. e32, 2006.
- 3) Melsen B : Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. Angle Orthod 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) Kurihara N, Suda T, Miura Y, Nakauchi H, Kodama H, Hiura K, Kumagawa M : Generation of osteoclasts from isolated hematopoietic progenitor cells. *Blood* 74 : 1295-1302, 1989.
 - 6) Boyel WJ, Simonet WS, Lacey DL : Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423 : 337-342, 2003.
 - 7) Teitelbaum SL, Ross FP : Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet* 4 : 638-649, 2003.
 - 8) Vaananen HK, Laitala-Leinonen T : Osteoclast lineage and function. *Arch Biochem Biophys* 473 : 132-138, 2008.
 - 9) 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 function in osteoclasts and foreign body giant cells. *J Exp Med* 202 : 345-351, 2005.
 - 10) Yang M, Birnbaum MJ, Mackey 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.
 - 11) 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, Fuji 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.
 - 12) 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.
 - 13) 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.
 - 14) 宮上雄希, 吉村喜隆, 南川元, 鈴木邦明, 飯田順一郎 : 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. *北海道歯誌* 38 : 131-139, 2018.
 - 15) Pfaffl MW : A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 : e45, 2001.
 - 16) Schmittegen 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.
 - 17) 水野貴行, 吉村喜隆, 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. *北海道歯誌* 26 : 210-217, 2005.
 - 18) Taciak B, Biatasek M, Braniewska A, Sas Z, Sawicka P, Kiraga L, Rygiel T, Krol M (2008) Evaluation of phenotypic and functional stability of RAW264.7 cell line through serial passages. *PLoS ONE* 13(6) : e0198943.
 - 19) Martin TJ, Sims NA : Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. *Trends in Mol Med* 11 : 76-81, 2002.
 - 20) 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/SIRP α -interaction. *Biochem Biophys Res Commun* 352 : 444-448, 2007.
 - 21) Anais M, Julie M, Jean MD, Kent S : Osteoclast Fusion : Time-Lapse Reveals Involvement of CD47 and Syncytin-1 at Different Stage of Nuclearity. *J cell Physiol* 232 : 1396-1403, 2017.
 - 22) Tkayanagi, H, Kim S, Koga T, Nishina H, Issiki 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.
 - 23) 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 : e0128275, 2015.
 - 24) Chiu YH, Ritchlin CT : DC-STAMP : A Key Regulator in Osteoclast Differentiation. *J Cell Physiol* 231 : 2402-2407, 2016.

ORIGINAL

Effect of RAW cell passage number on osteoclast differentiation induction system

Toko Yanagisawa^{1,2)}, Yoshitaka Yosimura²⁾, Takako Hayakawa²⁾, Kumu Fukushima²⁾
Tadahiro Iimura²⁾ and Yoshiaki Sato¹⁾

ABSTRACT : Teeth movement after orthodontic treatment can be regarded as the reaction of periodontal tissue to mechanical stress. By applying orthodontic force to the periodontium, bone addition is suppressed and bone resorption is promoted on the compression side. Furthermore, bone resorption is suppressed and bone addition is promoted on the traction side, resulting in bone remodeling.

When we investigated the effect of RAW 264.7 (RAW) cells on the osteoclast differentiation-inducing system by directly applying mechanical stimulation to the cells, we showed the differentiation of osteoclasts by the number of passages of RAW cells. Additionally, there was a difference in induction. Therefore, in this study, we assessed the relationship between the passage number of RAW cells and the differentiation-inducing system of osteoclasts as there are no available reports in this regard. N10 RAW cells having a passage number <10 and N30 RAW cells having a passage number ≥30 were cultured for seven days in an osteoclast-inducing medium, and changes in the number of osteoclasts were observed. N10 osteoclasts differentiated from N10 RAW cells increased after peaking on the day 4 and then decreased. Similarly, N30 osteoclasts differentiated from N30 RAW cells increased after peaking on day 6 and then decreased. Next, as a result of the cell proliferation test, no significant difference was observed between N10 and N30 RAW cells. Real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed to investigate the differences in the expression levels of osteoclast-related genes including TRAP, RANK, CD47, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP, Integrin α V, Integrin β III, CD11a, and CD11b. No significant difference was observed in RANK, NFATc1, and Integrin β III expression levels on the day 3 of culture. In contrast, it decreased significantly in the cell fusion factors (CD47, DC-STAMP, OC-STAMP, and Integrin α V) in N30 osteoclasts compared with those in N10 osteoclasts. These results suggest that cell fusion of osteoclasts is suppressed in N30 osteoclasts compared with N10 osteoclasts on day 3 of culture. The above results suggested that when using N10 osteoclasts, which differentiate rapidly into osteoclasts, and N30 osteoclasts, which differentiate slowly into osteoclasts, it is necessary to take advantage of their characteristics.

Key Words : RAW264.7cell, osteoclast, passage number

¹⁾ Department of Orthodontics, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Yoshiaki Sato), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586 Japan.

²⁾ Department of Pharmacology, Faculty of Dental Medicine and Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University (Chief : Prof. Tadahiro Iimura), Kita 13, Nishi 7, Kita-ku, Sapporo, 060-8586 Japan.