



HOKKAIDO UNIVERSITY

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
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第14526号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14526
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96792
Type	doctoral thesis
File Information	Toko_Yanagisawa.pdf



博 士 論 文

RAW 細胞の継代数が破骨細胞分化誘導系に与える影響

令和 3 年 3 月申請

北海道大学
大学院歯学院口腔医学専攻

柳 澤 瞳 子

目 次

抄 録	1 頁
緒 言	3 頁
材料と方法	5 頁
結 果	10 頁
考 察	29 頁
結 語	34 頁
謝 辞	35 頁
利益相反	36 頁
参考文献	37 頁

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・融合に違いが生じた。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。

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、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え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-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100mm 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℃、5 % CO₂-95% 気相下にて一晩培養し、0.48mM 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 1.0×10^4 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、2mM 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 50ng/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 5.0×10^4 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 450nm 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。さらに 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 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法にて計算した^{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 の時に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減少した (図 5A)。細胞融合因子である CD47、DC-STAMP、OC-STAMP、Integrin α V 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 β III 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。

図 1

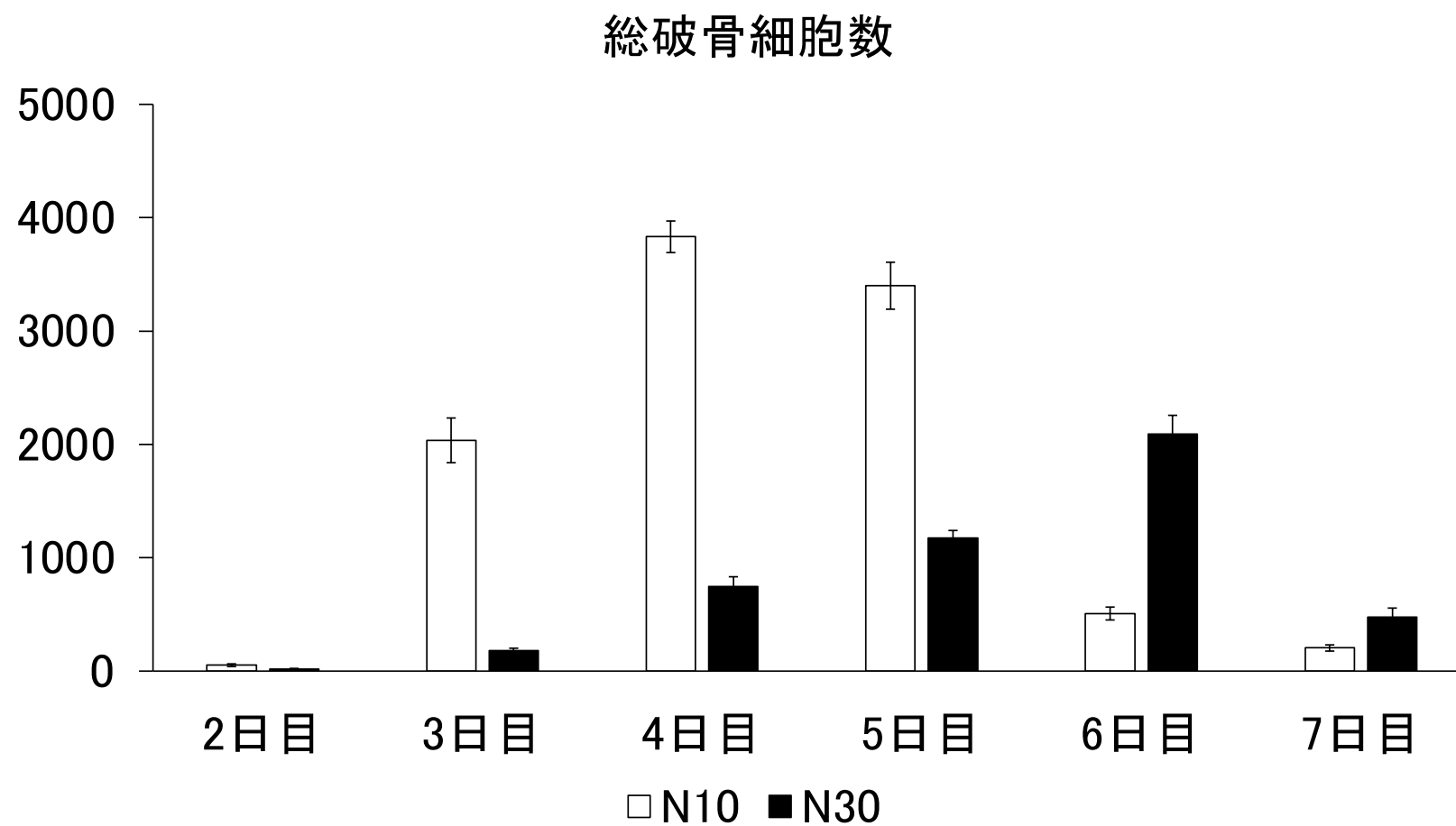


図1 N10 破骨細胞と N30 破骨細胞の培養2日目から培養7日目までの総破骨細胞数

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 $\pm$ SD, n=4。

図 2

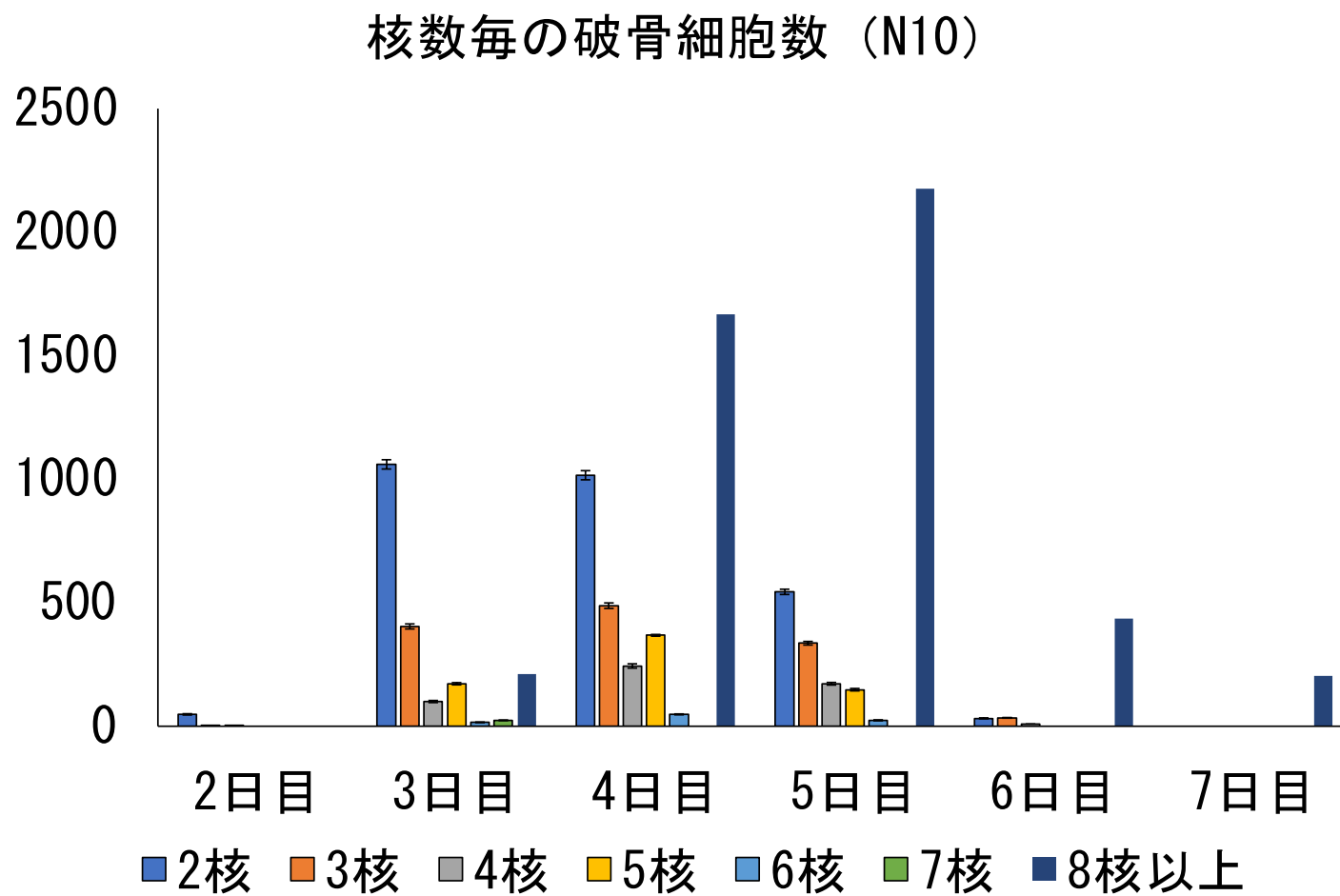


図2 培養2日目から培養7日目における N10 破骨細胞の核数毎の破骨細胞数

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。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 $\pm$ SD, n=4。

図 3

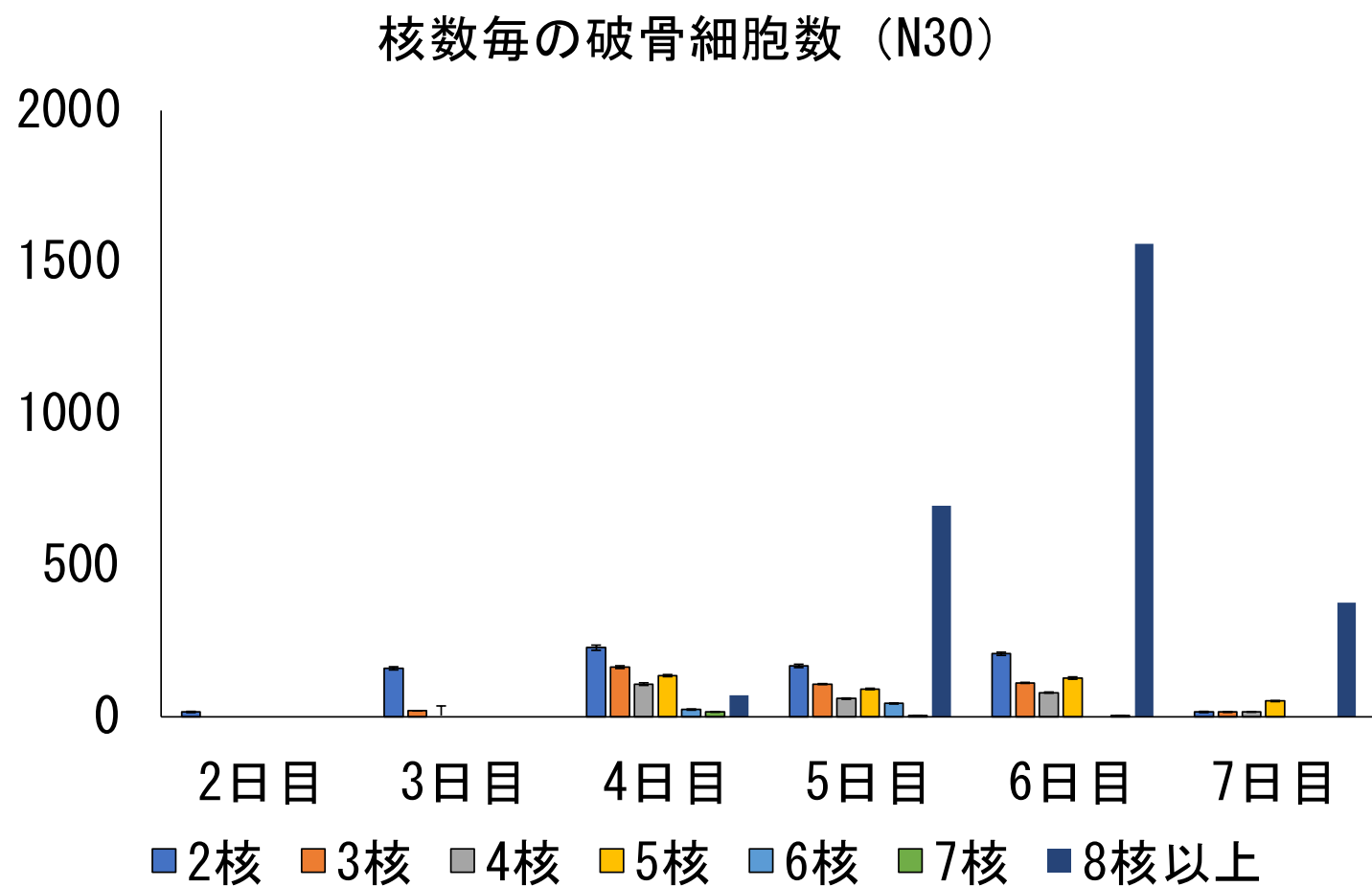


図3 培養2日目から培養7日目における N30 破骨細胞の核数毎の破骨細胞数

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。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 $\pm$ SD, n=4。

図 4

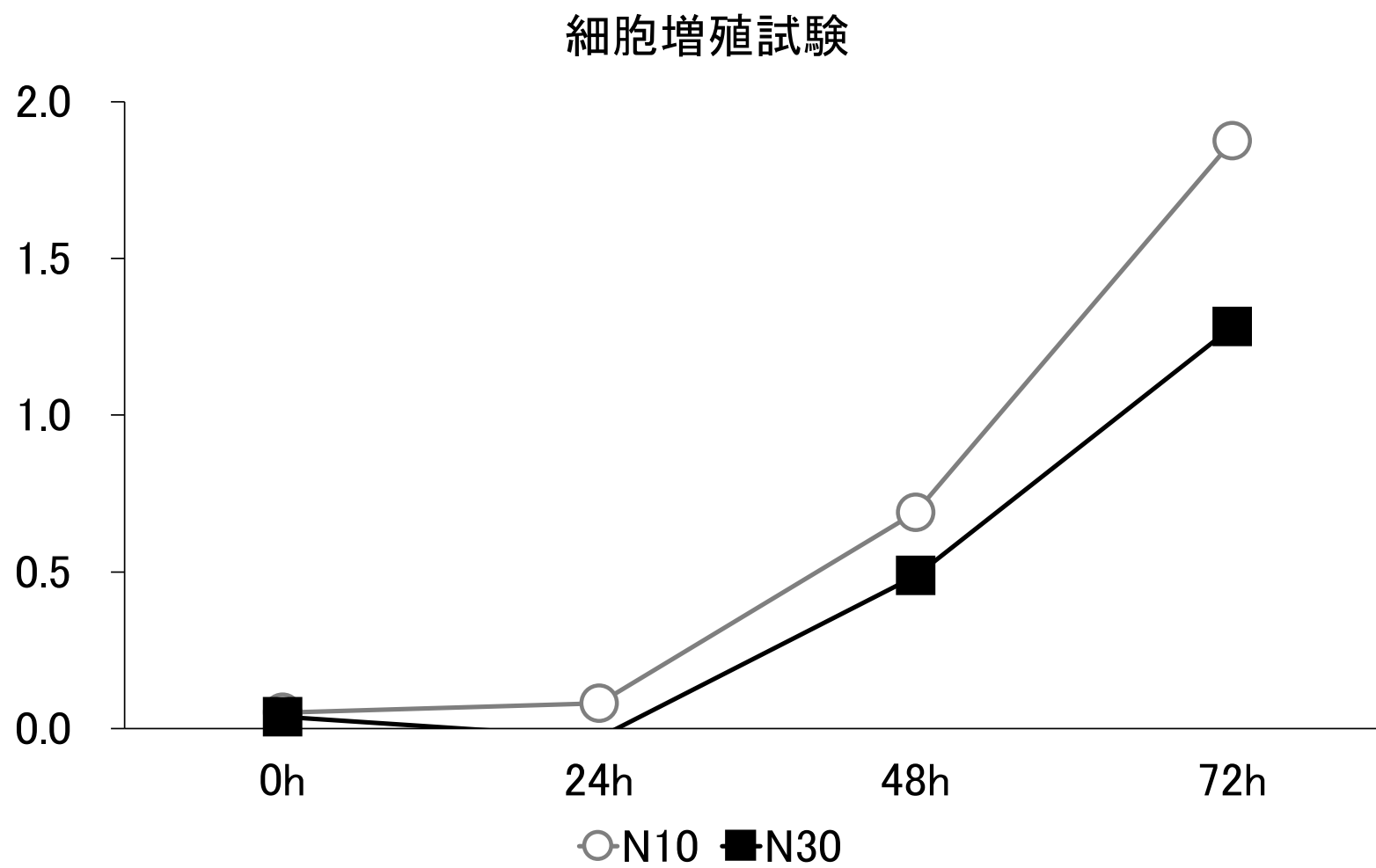


図 4 N10RAW 細胞と N30RAW 細胞の細胞増殖試験

N10RAW 細胞と N30RAW 細胞を細胞増殖用培養液で培養後、0、24、48、72h 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。

図 5A

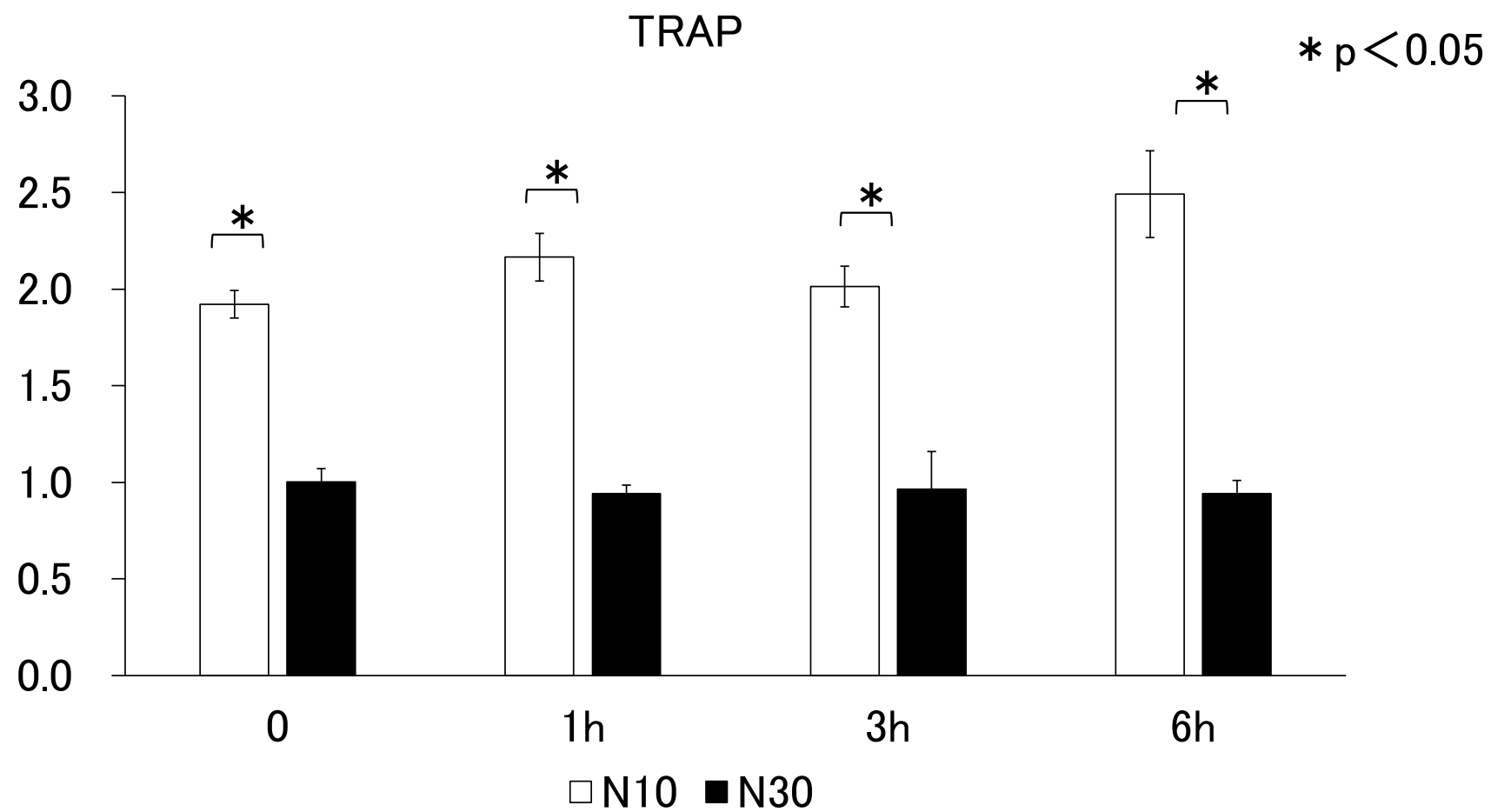


图 5B

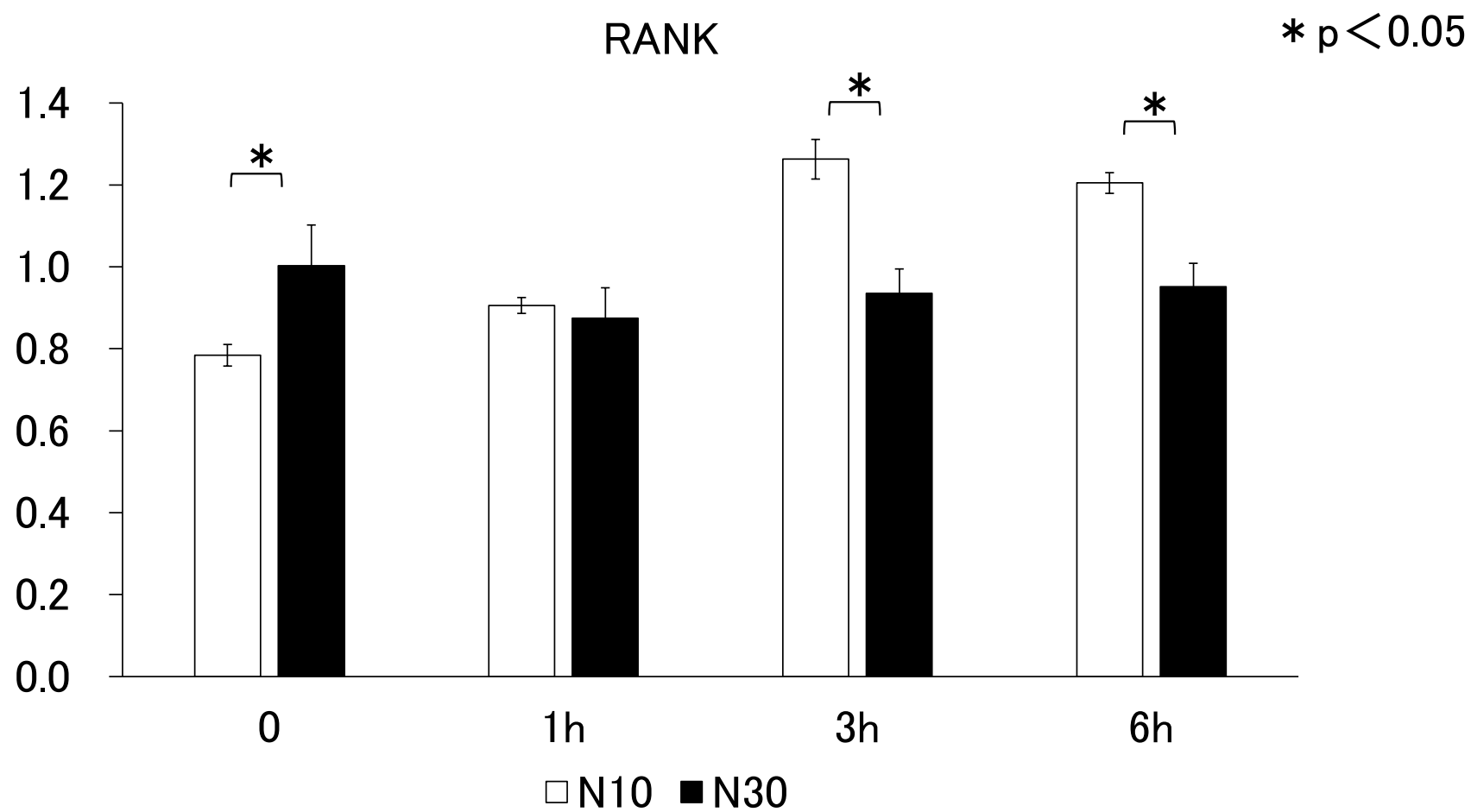


図 5C

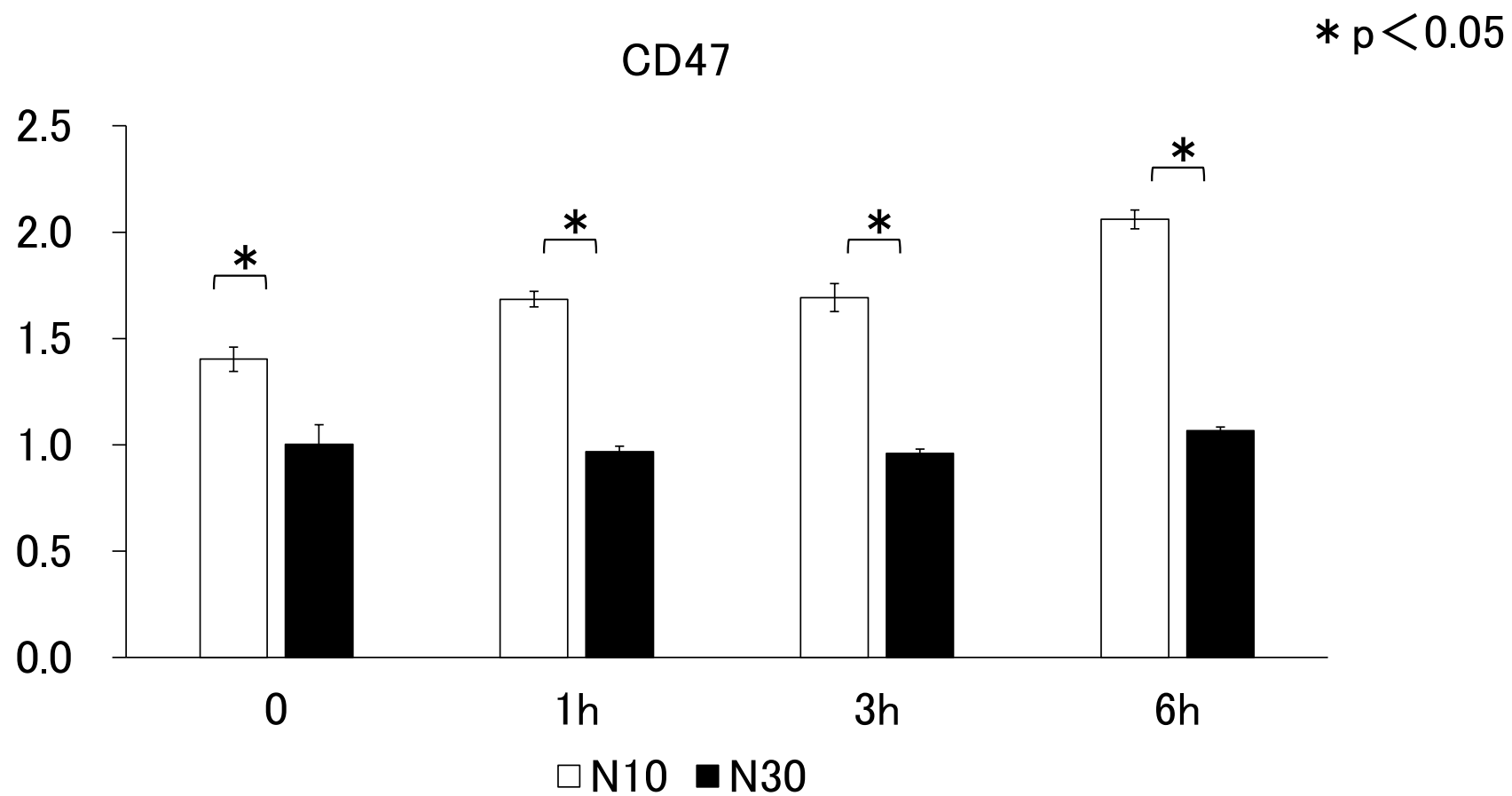


图 5D

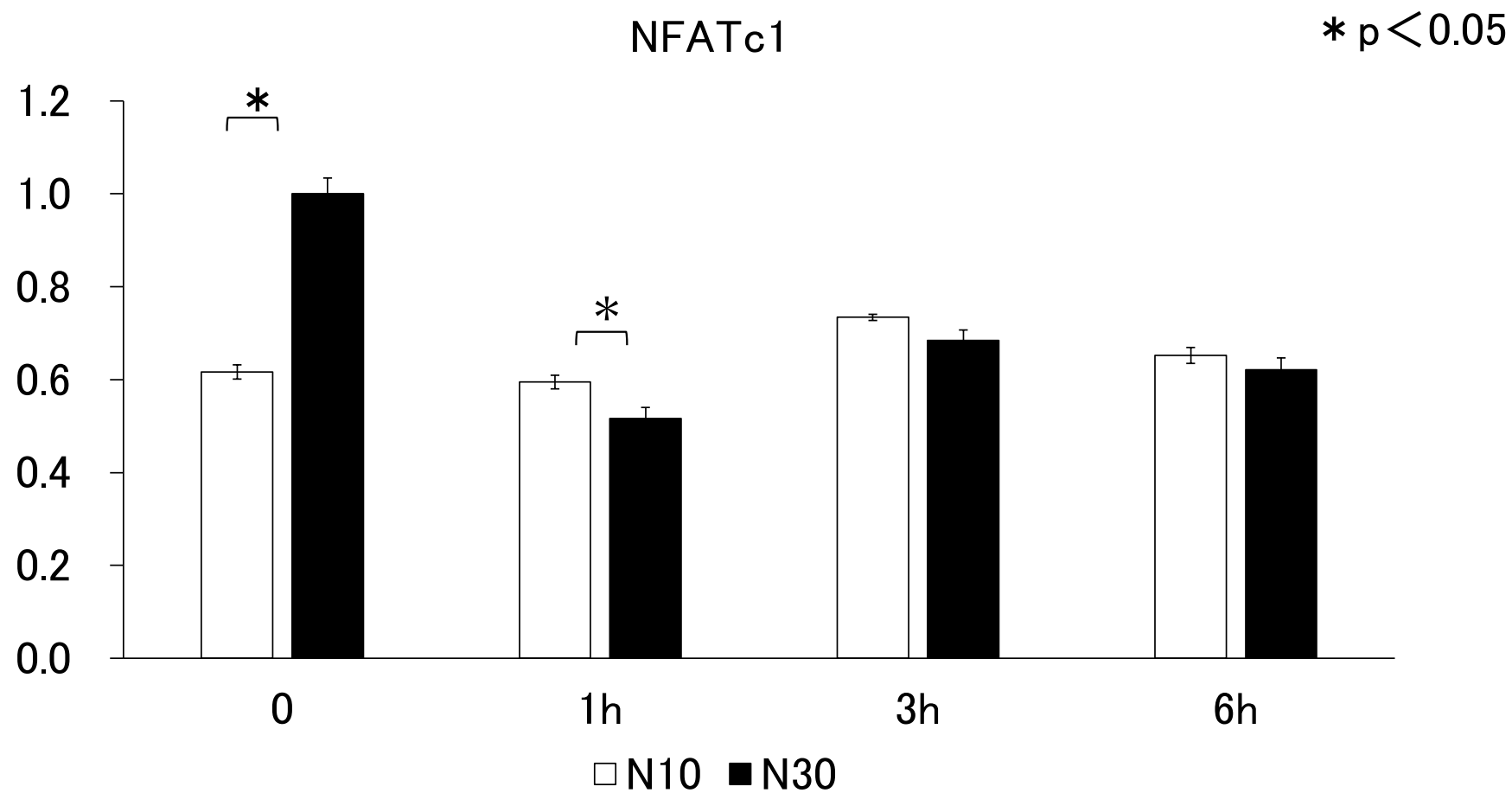


図 5E

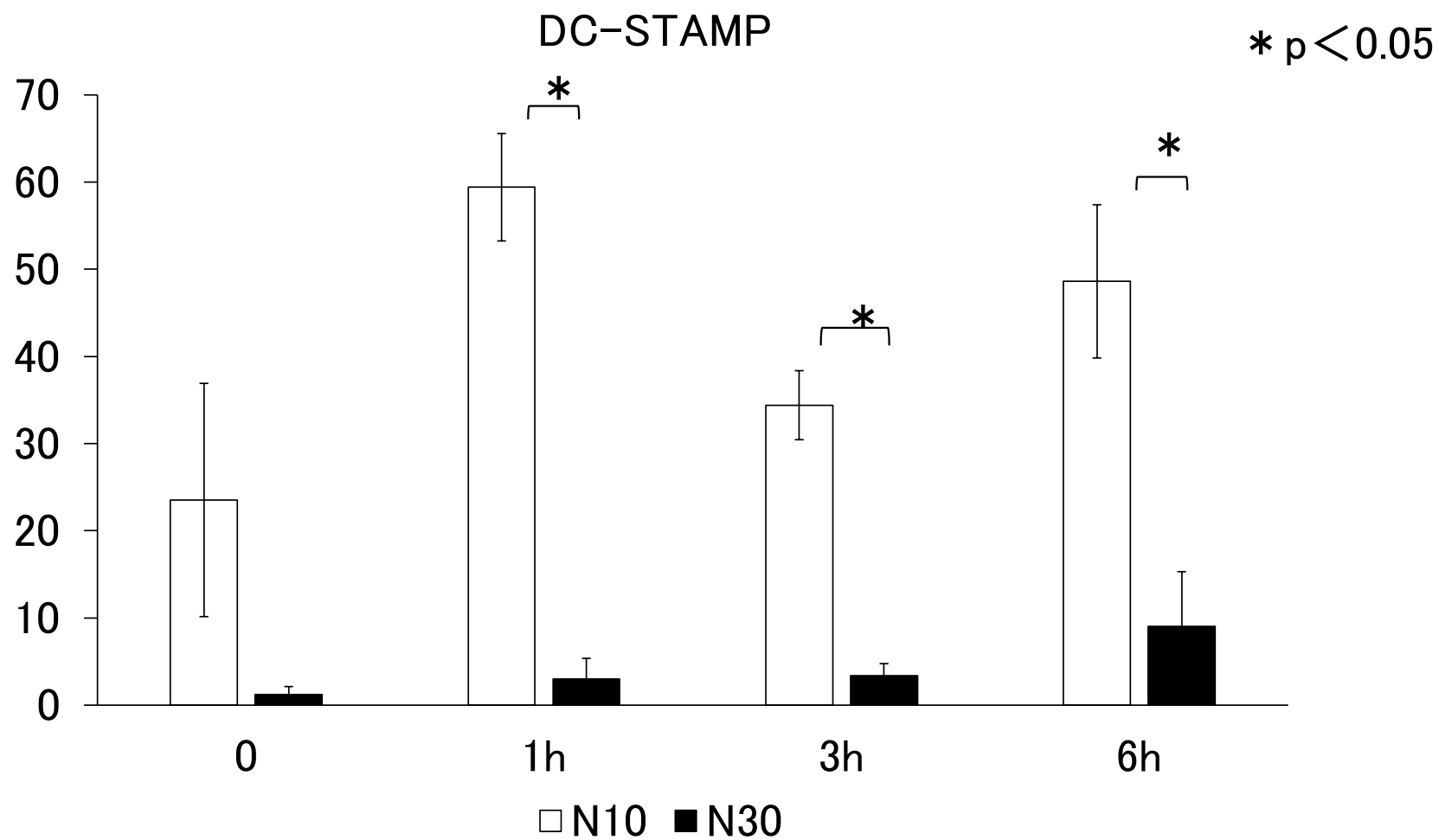


図 5F

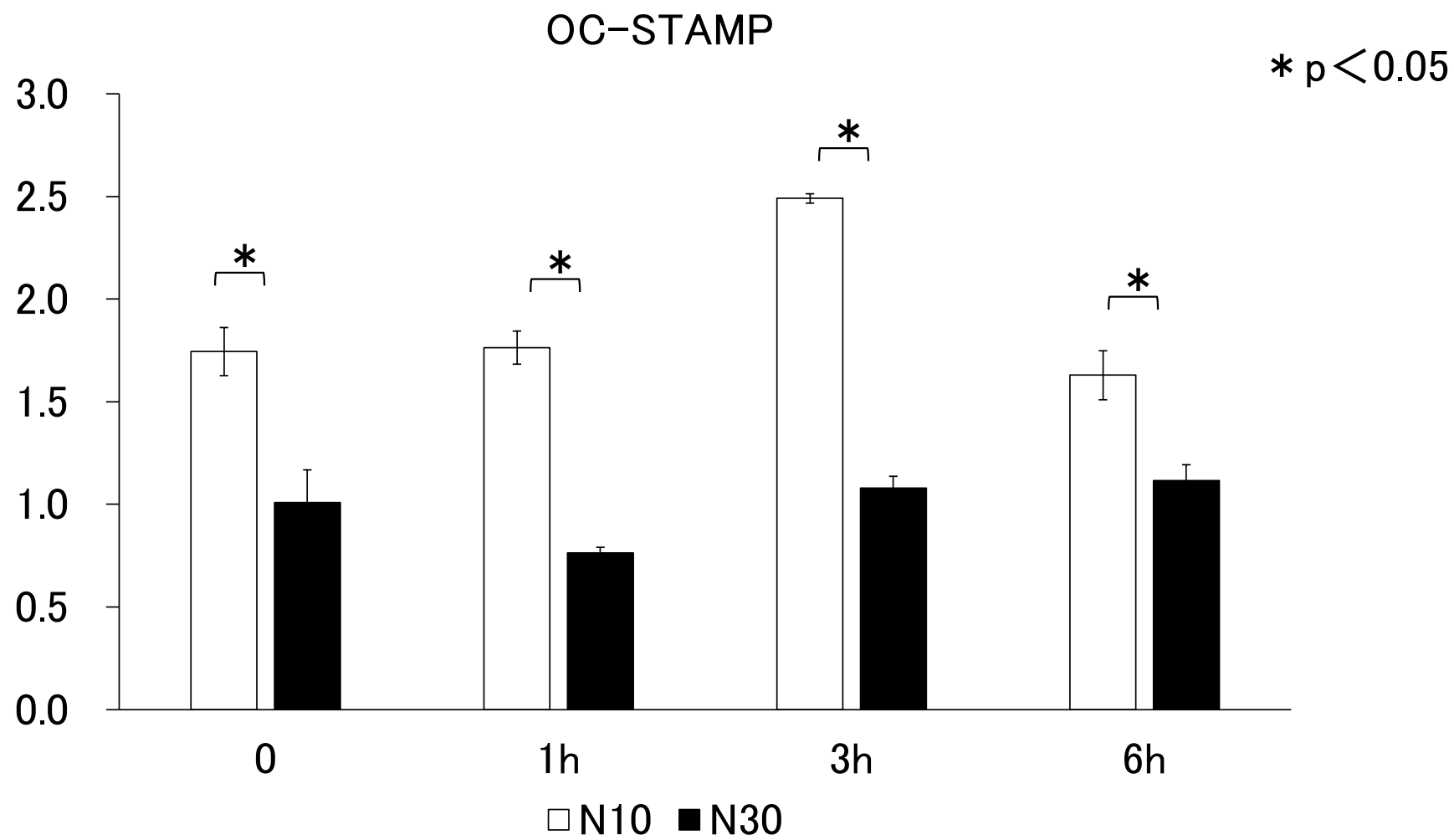


图 5G

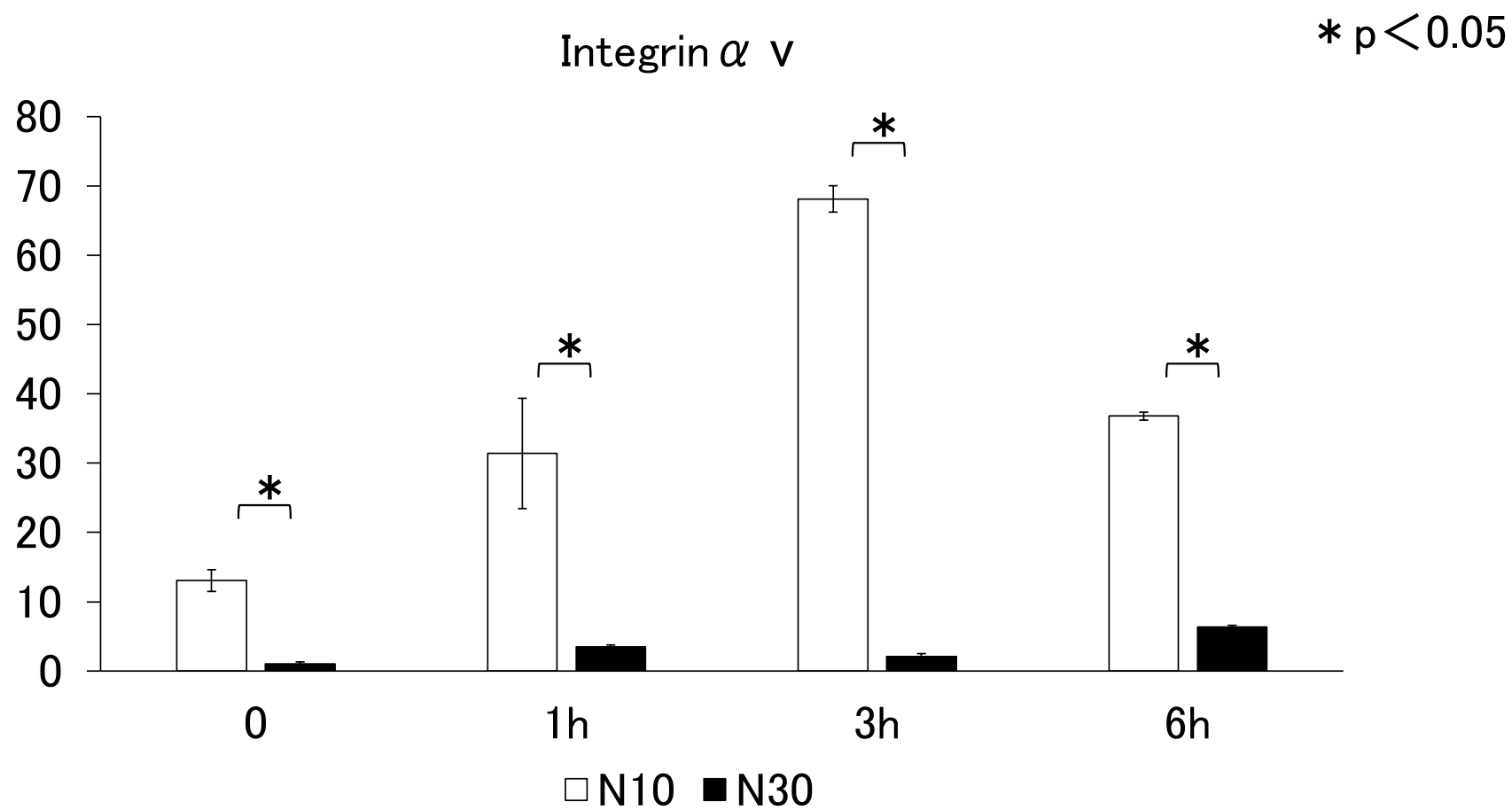


図 5H

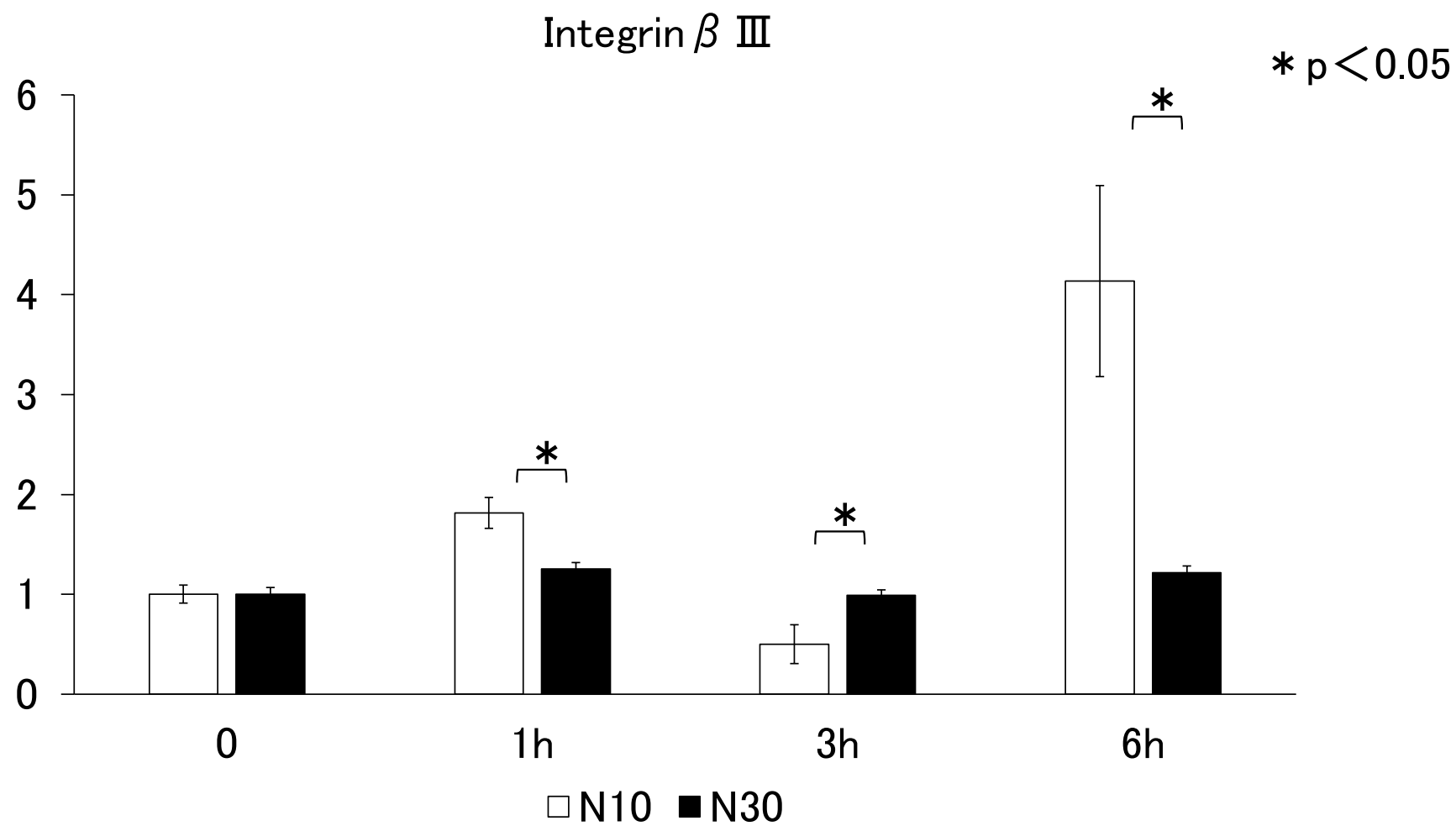


図5 破骨細胞関連遺伝子の発現量の変化

(A) TRAP、(B) RANK、(C) CD47、(D) NFATc1、(E) DC-STAMP、(F) OC-STAMP、(G) Integrin α V、(H) Integrin β III。

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。(A) N10 破骨細胞に対してN30 破骨細胞ではTRAPは有意に発現量が減少した。(C, E-G) 細胞融合因子であるCD47、DC-STAMP、OC-STAMP、Integrin α VにおいてもN10 破骨細胞に対してN30 破骨細胞では有意に減少していた。(B, D, H) RANK、NFATc1、Integrin β IIIではN10 破骨細胞とN30 破骨細胞との間に有意な差は認められなかった。

A-H: mean $\pm$ SD, n=3, p<0.05(*)

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 5 A)。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 5 B)。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 5 C)。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ィ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 5 D)。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 5 E , 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 5 G)。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。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

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 ExpMed* 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 RAW264.7cells. 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, Zakrajesk 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.