

メカニカルストレスに対する

歯槽骨骨細胞の応答と

sclerostin の経時的局在変化

ふじわらあつし

藤原 敦

本論文の一部は第33回日本骨形態計測学会（平成25年7月5日，浜松），第55回歯科基礎医学会（平成25年9月21日，岡山）において発表した．本論文の要旨は第149回朝日大学歯学研究科発表会（平成25年11月5日，岐阜）において発表した．

緒 言

骨は、血中のカルシウム濃度、リン酸濃度などの恒常性維持の役割だけでなく、生体の支持構造としての役割も担っている。骨はメカニカルストレスの変化に対して構造を常に変化させ、動的に適応していることが古くから知られている¹⁾。骨がどのようにメカニカルストレスの変化を感知し反応しているかについては、これまでも研究されてきた^{1, 2)}。

これらの研究の結果、現在では、骨基質中の骨細胞がメカニカルストレスを感知し応答していると考えられている。骨細胞は骨組織中に最も豊富に存在する細胞³⁾で、骨基質内に埋め込まれて存在している。骨細胞は骨基質内の骨細管内に細胞質突起を伸ばし、近隣の骨細胞あるいは骨芽細胞と突起同士の連結による細胞間ネットワークを形成している^{4, 5)}。この骨基質内部の細胞間ネットワークがメカニカルストレスによる骨の変形に対する感知システムとして適していると考えられている⁶⁾。また、ジフテリア毒素を用いて選択的に骨細胞を死滅させた骨組織ではメカニカルストレスによる骨改造現象が起こらなくなる⁷⁾ことから、メカニカルストレスに対して骨基質中の骨細胞がセンサーとして機能し、骨表面に存在する骨芽細胞や破骨細胞に作用を及ぼすという知見が得られつつある⁸⁻¹¹⁾。

骨細胞がメカニカルストレスを感知する機構に関しては、大きく二つの説が提唱されている。すなわち、骨にメカニカルストレスが加わると、骨小腔・骨細管内にある骨細胞の細胞体および細胞質突起が変形することによってメカニカルストレスを感知するという説^{10, 12)}と、骨にメカニカルストレスが加わると骨小腔・骨細管内の組織液の流れが変化し¹³⁻¹⁶⁾、その変化を骨細胞が感知するという説である^{7, 8, 17, 18)}。しかし、細胞の伸展による直接変形よりも細胞周囲の流れの変化による機械的刺激に細胞が敏感に応答するという報告¹⁹⁾から、現在では後者の説が主流となっている。

骨細胞が組織液の流れの変化を感知する機構については、骨細胞表面の一次線毛が機能していると考えられている²⁰⁻²³⁾。一次線毛を介して細胞周囲の液体の流れの変化を感知した骨細胞は、connexin43で構成されるヘミチャンネルを開き^{20, 24)}、数秒から数分以内に窒素酸化物、ATPおよびプロスタグランジン E2などを放出することが示されている^{21, 24-27)}。

また、メカニカルストレスを感知した骨細胞は骨芽細胞のWingless Type Protein (Wnt) / β カテニンシグナル経路を介して骨形成を制御すると考えられている²⁸⁻³⁰⁾。

骨芽細胞のWnt/ β カテニンシグナル経路はメカニカルストレスによって活性化することが示されてお

り^{31, 32)}, Wnt に対する共役受容体の LRP5 を欠損させたマウスを用いた研究から, 骨組織において LRP5 がメカニカルストレスを伝達するための経路の一部であることが示唆された²⁸⁾. また, 骨細胞は LRP5/6 に高い親和性を有し Wnt に対する拮抗物質である sclerostin を特異的に産生することが知られている^{28, 30)}.

sclerostin は, 頭蓋骨などに病的な骨化を生じる sclerosteosis (硬化性骨症) の原因遺伝子として発見された *SOST* 遺伝子にコードされる分泌型糖タンパク質である^{33, 34)}. この分泌型糖タンパク質は骨芽細胞表面の LRP5/6 に結合することで Wnt/ β -カテニンシグナル経路を阻害し, 骨形成に対して抑制的に作用する事が示されている³⁵⁻⁴⁰⁾.

近年, この骨細胞による sclerostin 産生がメカニカルストレスによって抑制されることが明らかとなった^{11, 41-46)}. マウスの尺骨に長軸方向のメカニカルストレスを加えた Robling らの報告¹¹⁾によると, メカニカルストレスが加わった尺骨骨膜側には骨形成が生じるが, その領域では骨細胞および骨細胞周囲の sclerostin が消失していることが示された. すなわち, メカニカルストレスを感知した骨細胞は, Wnt 共役受容体 LRP5/6 のアンタゴニストである sclerostin 産生を停止し, その結果, 骨芽細胞の Wnt/ β -カテニンシグナル経路が活性化されることで骨形成を引き起こ

すと考えられている。

しかしながら，メカニカルストレスによって誘導される骨改造現象と骨細胞による sclerostin 産生の動態に関する生体内での詳細な研究はほとんど報告されていない。そこで，骨改造現象の過程を経時的に観察でき，かつ歯科矯正学的処置によりメカニカルストレスの方向を変えることが可能なラットの上顎臼歯部を実験材料として用いることとした。ラットの上顎臼歯は咬合時のメカニカルストレスによって生理的に遠心方向に移動している⁴⁷⁾が，第一，第二臼歯間にエラスティックを挿入すると，第一臼歯に作用するメカニカルストレスは近心方向に反転し第一臼歯は近心方向に移動する⁴⁸⁻⁵¹⁾。

このモデルを用いて歯槽骨の sclerostin に対する免疫局在の変化を経時的に検索した先行研究⁵²⁾では，強いメカニカルストレスが加わった領域で骨細胞および骨細胞周囲の sclerostin が1日以内に消失することが示された。これは，骨細胞がメカニカルストレスを感知すると，短時間で sclerostin 産生が抑制され骨基質中から24時間以内に sclerostin が消失する可能性を示している。

しかし，この短時間での sclerostin の消失過程を明らかにするには，骨細胞における sclerostin 産生能の変化と骨細胞によって産生

された sclerostin の局在変化を調べる必要がある。そして、骨細胞の sclerostin 産生能、すなわち *SOST*mRNA の発現は *in situ* Hybridization 法を用いることで、sclerostin の局在は免疫組織化学染色を用いることで明示できる。

そこで本研究ではラット上顎臼歯部歯槽骨を用いて、矯正力によるメカニカルストレスを加えた後、24時間以内の骨細胞の *SOST*mRNA の発現状態を *in situ* Hybridization 法を用いて、骨細胞および骨細胞周囲の sclerostin の局在を免疫組織化学染色を用いて経時的に検索し、メカニカルストレスに対する骨細胞の sclerostin 産生能の変化と骨基質中の sclerostin の動態を明らかにすることとした。

材料と方法

1 実験動物

実験には8週齢の雄性 Wistar ラット 70 匹（中部科学資材，愛知）を用いた．ラットは朝日大学歯学部実験動物飼育施設において飼育した．室温（ $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ）と湿度（ $55 \pm 2\%$ ）は一定に保ち，明暗周期は6時より18時まで点灯，18時より6時まで消灯とした．ラットは固形飼料（オリエンタル酵母工業，MF，東京）と水道水を自由に摂取できる状態にした．なお，実験は朝日大学歯学部動物実験倫理委員会の承認（承認番号：11-027）を得て行った．

2 実験的歯牙移動方法

ラットの腹腔内にペントバルビタール（ソムノペンチル[®]，共立製薬株式会社，東京） 40.0 mg/kg を投与した後，上顎左側第一臼歯，第二臼歯間に矯正用エラストティック（ズーパックエラストティック，Ormco Corporation, California, USA）を挿入し（Waldo法⁵⁰⁾，第一臼歯の近心移動を行った（図1）．術後，ラットは固形飼料と水道水を自由に摂取できる状態にした．なお，無処置の動物10匹を対照群とした．

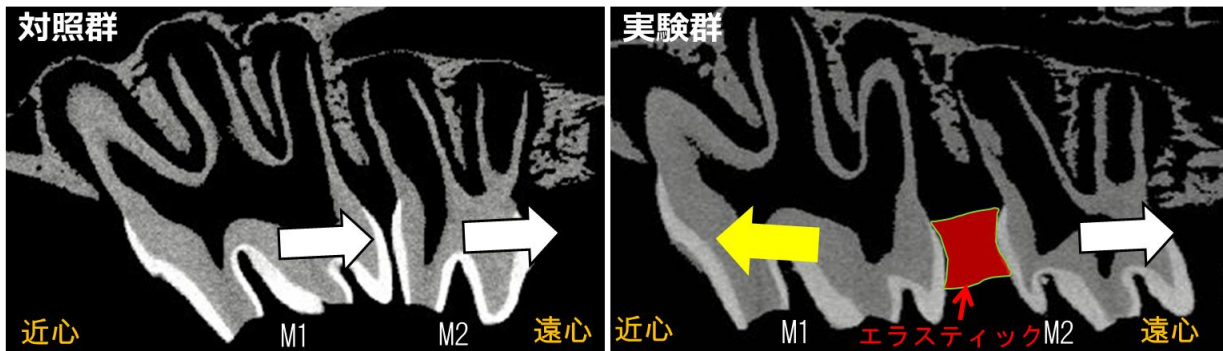


図 1 対照群と実験群の歯牙移動方向

対照群では上顎第一臼歯（M1），第二臼歯（M2）は遠心方向（白矢印）に移動している．実験群では M1 と M2 の間にエラスティック（赤色）を挿入し，M1 を近心方向（黄矢印）に移動させた．

3 実験タイムスケジュール

実験群は，6 群 10 匹ずつに分けエラスティック挿入直後（0 時間群），処置後 3 時間（3 時間群），処置後 6 時間（6 時間群），処置後 12 時間（12 時間群），処置後 18 時間（18 時間群），および処置後 24 時間（24 時間群）でペントバルビタール（ソムノペンチル[®]，共立製薬株式会社，東京）40.0 mg/kg を腹腔投与し，4℃の 4% パラホルムアルデヒド [0.1M リン酸緩衝液（PBS）] 固定液にて灌流固定を行った．その後，上顎骨を摘出し，24 時間 4% パラホルムアルデヒド（4℃）にて浸漬した後，0.1M PBS 中で保管した（4℃）．次いで試料を μ CT 装置 ScanXmate-RB090SS（コムスキャンテクノ株式会社，横浜）にて撮影した．なお，撮影条件は管電圧を 90kV，管電流を 89 μ A，倍率を 13 倍とした．三次元立体構築ソフトウェア（TriBON，ラト

ックシステムエンジニアリング，東京) を用いて μ CT スライス画像から立体構築像を作製した。

4 組織化学的検索

1) 試料作製方法

摘出した上顎骨は，Morse のギ酸 - クエン酸脱灰液^{53, 54)}を用い，室温で攪拌しながら2日間脱灰した。脱灰後の試料をパラフィン包埋し滑走式マイクロトーム (リトラトーム[®]，REM-700，大和光機工業株式会社，埼玉)を用いて，咬合平面と平行な水平断で厚さ6 μ m の連続切片を作製した。

2) *in situ* Hybridization

胎生16.5日のラットから抽出したtotal RNAより逆転写にてcDNAを得て，これを鋳型にantisense RNAを作製した (rat *SOST* accession Number: NM_030584.1 Sequence Position: 9-405)。その後，ジゴキシゲニン (DIG) 標識をDIGラベリングキット (Roche, Mannheim, Germany)にて行ったものをRNAProbeとして使用した (ジェノスタッフ，東京)。 *in situ* HybridizationはWilkinson and Nietoの方法⁵⁵⁾にて行った。室温で一連の下降エタノール系列 (100%，90%，80%，70%，50%) に5分間ずつ浸漬し0.01M PBSで洗浄後，5 μ g/ml Proteinase Kを加えて30分間処理し，0.01M PBSで10分間室温にて再度，洗浄した。0.1M triethanolamine

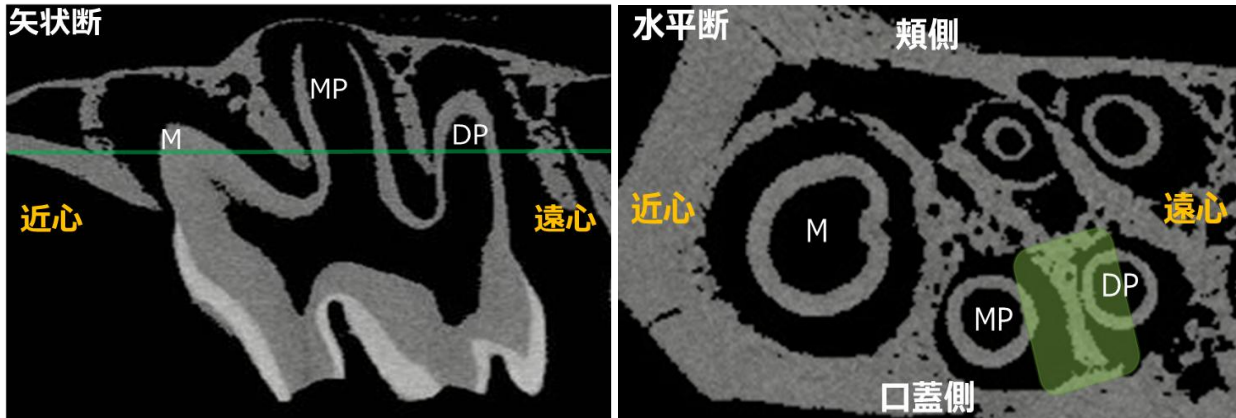
(pH=8.0) に浸漬して無水酢酸 1 ml をシリンジで 3 分間かけて滴下し, 15 分間攪拌した. 2 × SSC (600 mM NaCl, 60 mM Sodium citrate) にて 10 分間室温で洗浄後, Hybridization 溶液 (50% formamide, 5 × SSC, 5 × Denhardt 溶液, 500 μg/ml サケ精子, 250 μg/ml 酵母トランスファー RNA) を用いてプレハイブリダイゼーションを 55°C で 1 時間行った. さらに 120 ng/ml の DIG 標識特異的プローブを加えた新たな Hybridization 溶液にて, ハイブリダイゼーションを 55°C で 18 時間行った. その後, 2 × SSC で 5 分, 0.2 × SSC (30 mM NaCl, 3 mM Sodium citrate) で 30 分の洗浄を 55°C で 2 回行った. 続いてスライドガラスを TBS (50 mM Tris/HCl [pH=7.5], 150 mM NaCl) にて 5 分間室温で静置し, 0.5% blocking reagent (Roche, Mannheim, Germany) を含む Blocking 溶液/TBS に 30 分間, Alkaline Phosphatase 標識抗 DIG 抗体 (Roche, Mannheim, Germany) を含む Blocking 溶液で 60 分間室温にて静置した. TNT バッファー (50 mM Tris/HCl [pH=7.5], 150 mM NaCl, 0.05% Tween20) を用いて 5 分間ずつ, 3 回洗浄を行い, その後, 基質として 4-nitroblue tetrazolium chloride / 5-bromo-4-chloro-3-indplyl-phosphate (NBT/BCIP) (Roche, Mannheim, Germany) を用い, 室温で 9 時間反応させ, 発色を行った. また, ネガティブコントロールにはセンスプローブを加えたものを使用した.

3) 免疫組織化学染色

脱パラフィン処理した切片を, 0.3% H₂O₂ による内因性ペルオキシダーゼ除去とウシ血清によるブロッキング処理し, 400倍希釈したヤギ抗ラット sclerostin 抗体 (AF1589, R&D System, Minneapolis, USA) を 4 °C で一晩反応させた. その後, biotin 標識抗ヤギ IgG 抗体 (cell & tissue staining kit, R&D System, Minneapolis, USA) に 30 分間浸漬し, diaminobenzidine staining kit (cell & tissue staining kit, R&D System, Minneapolis, USA) により発色を行った. 対比染色には Mayer の Hematoxylin を用いた. ネガティブコントロールには正常ヤギ IgG または, PBS にて一次抗体反応を行ったものを使用した.

5 観察部位

観察部位は μ CT画像から決定した(図2)。光学顕微鏡(BX51, OLYMPAS, 東京)を用いて, 近心口蓋根(MP)と遠心口蓋根(DP)の間の根間中隔歯槽頂部直下の歯槽骨を咬合面に平行な水平断面で観察した。



A 矢状断面

B 水平断面

図2 実験群上顎第一臼歯の μ CT画像

- A DPが近心側根間中隔の頂部と接触している部位を通る矢状断面像。緑線は咬合平面と平行で歯根と接する根管中隔の頂部直下を通る線。
- B 図Aにおける緑線の高さの μ CT水平断面像。緑色の領域を光学顕微鏡観察部位とした。

M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根

1) 観察部位の区分設定

MP表面とDP表面に接する線を頬側と口蓋側に設定した(図3A)。それぞれの接線の根間中隔上にある線分に三等分点を設定した。頬舌側それぞれの三等分点のうち, 近心の二点を通る円弧と遠心の二点を通る円弧で観察部位を三分割した。近心側に位

置する円弧より近心の領域を近心部，遠心に位置する円弧より遠心の領域を遠心部，近心部と遠心部に挟まれる領域を中央部と定義した．観察部位で根間中隔の接線より頬側に位置する領域を頬側部，口蓋側に位置する領域を口蓋側部と定義した（図 3 B）．

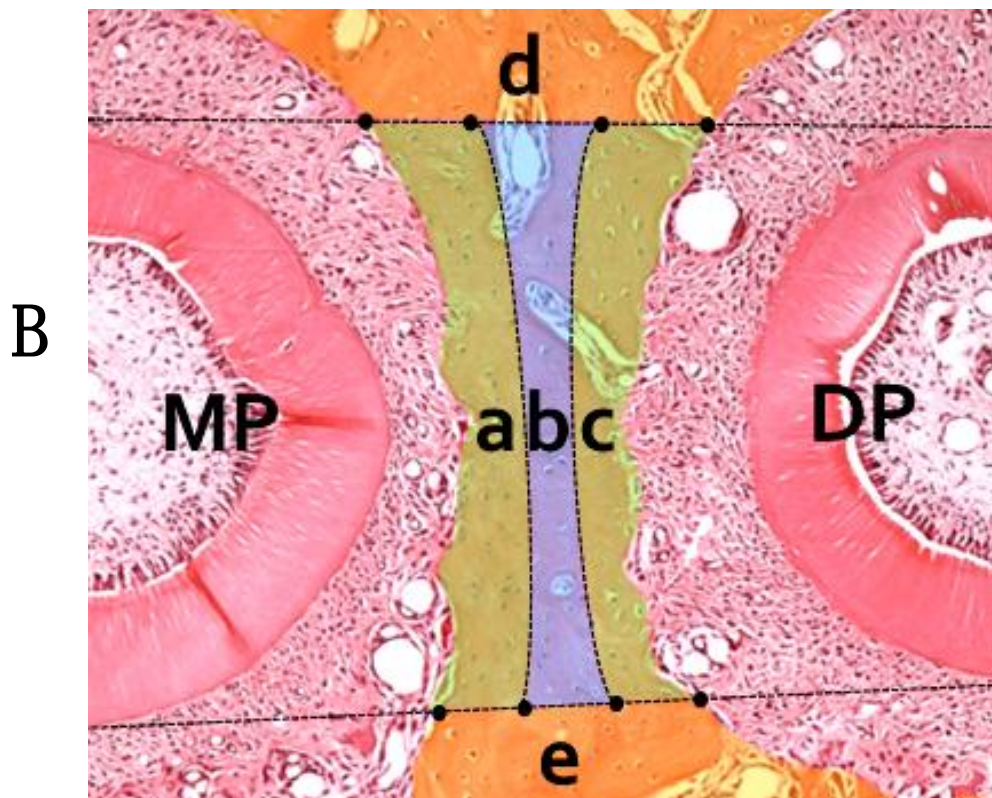
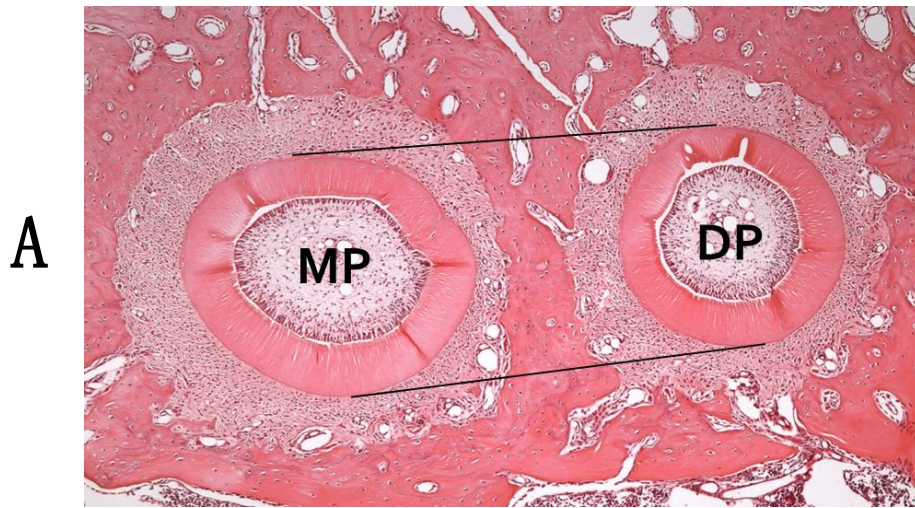


図 3 観察部位の区分

A 上顎第一臼歯の MP-DP 間根間中隔の歯槽骨を MP と DP の頬側表面および口蓋側表面を結ぶ線分にて区分した。

B a: 近心部, b: 中央部, c: 遠心部,
d: 頬側部, e: 口蓋側部

結果

1 μ CT 所見

対照群では第一臼歯の生理的遠心移動によって MP が根間中隔の近心面に近接していた。実験群では 0 時間群、3 時間群、6 時間群、12 時間群、18 時間群および 24 時間群で第一臼歯の近心移動が生じており、DP が根間中隔の遠心面に密接していた（図 4）。

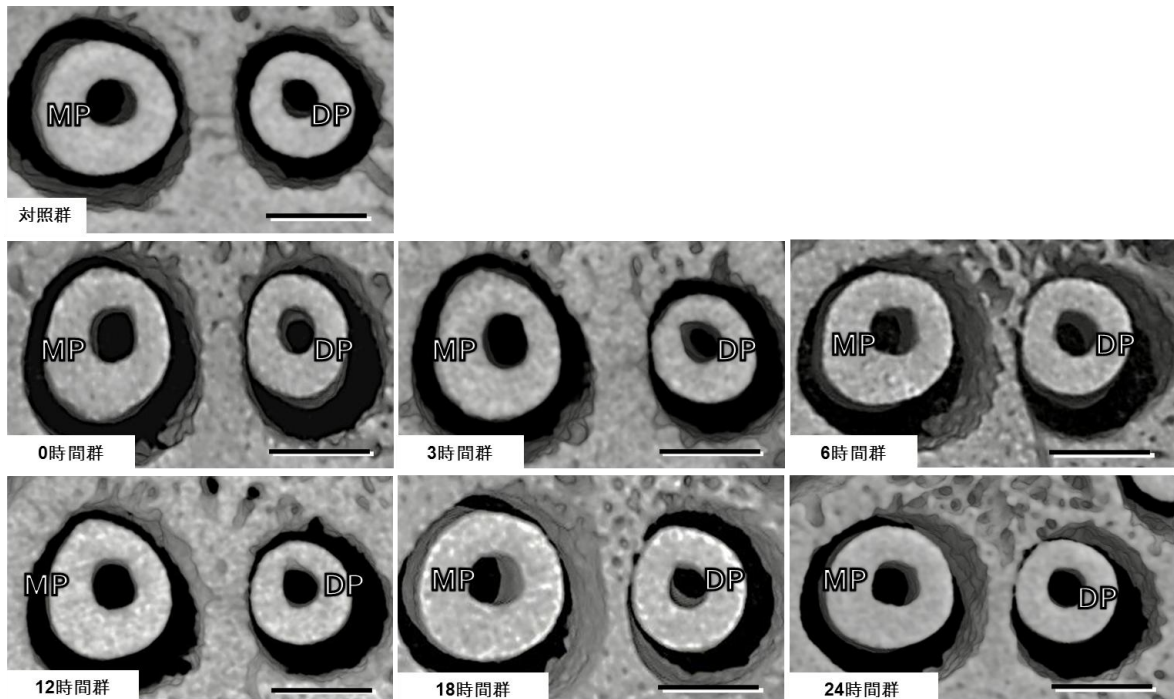


図 4 実験群と対照群の μ CT 立体構築像

各画像は左側が近心側，右側が遠心側，上方が頬側，下方が口蓋側。

MP：近心口蓋根 DP：遠心口蓋根 bar=100 μ m

2 *SOST*mRNA の発現分布

対照群では，歯槽骨中央部，遠心部，頬側部および口蓋側部の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が認められた．一方，近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には *SOST*mRNA の発現が認められなかった（図5）．

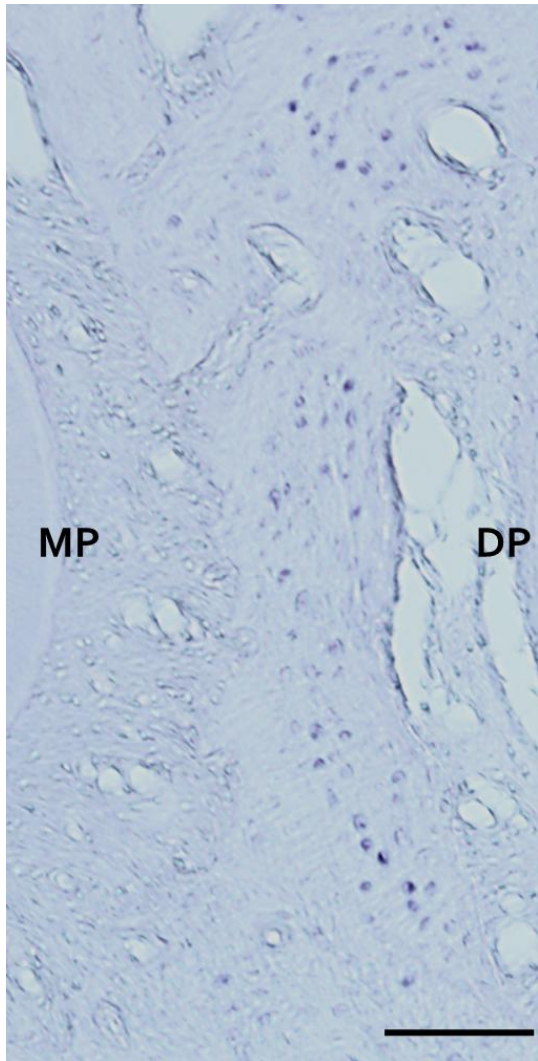


図 5

対照群の *SOST*mRNA 発現部位
*SOST*mRNA が発現している骨細胞は青紫色に発色している．

（図の左側が近心側，右側が遠心側，上方が頬側，下方が口蓋側．MP：近心口蓋根 DP：遠心口蓋根 bar=50 μ m）

0時間群，3時間群では，対照群と同様に歯槽骨中央部，遠心部，頬側部および口蓋側部の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が認められ，近心部の骨細胞と遠心部の骨表面から一層の骨細胞には *SOST*mRNA の発現が認

められなかった。6時間群では、頬側部・口蓋側部の骨細胞には *SOST*mRNA の発現が認められたが、近心部・中央部・遠心部の骨細胞では *SOST* mRNA の発現が認められなかった。12時間群では観察部位の全域の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が認められなかった。18時間群と24時間群も12時間群と同様、観察部位全域の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が認められなかった(図6)。

*SOST*mRNA の発現が認められた骨細胞の存在する部位を対照群と実験群で比較すると中央部・遠心部の骨細胞では処置後6時間で *SOST*mRNA の発現が消失し、頬側部・口蓋側部の骨細胞では処置後12時間で *SOST*mRNA の発現が消失することが判明した(表1)。

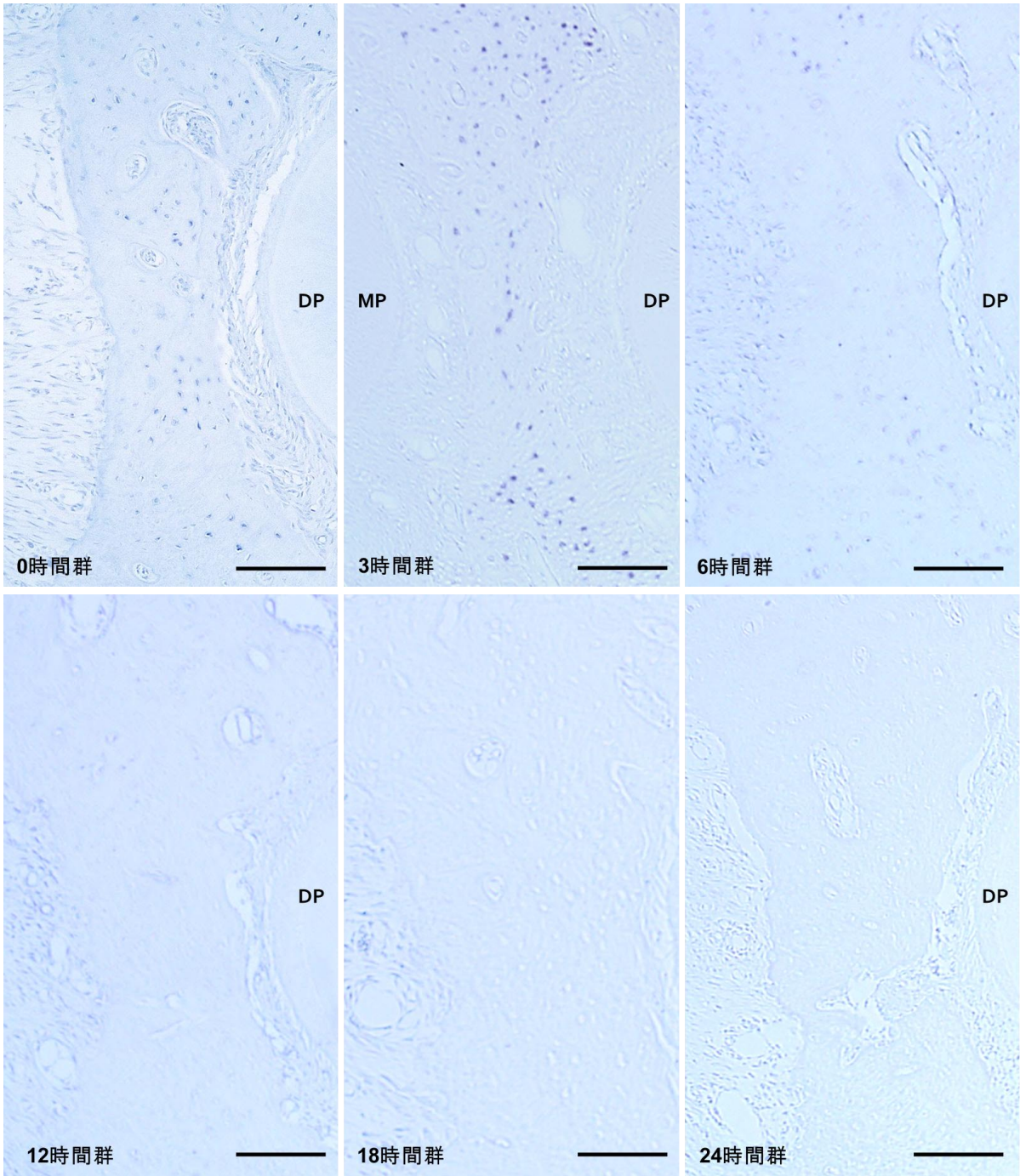


図 6 実験群の *SOST*mRNA 発現部位

*SOST*mRNA を発現している骨細胞は青紫色に発色している。(各画像とも左側が近心側，右側が遠心側，上方が頬側，下方が口蓋側。DP:遠心口蓋根 bar=50 μ m)

表 1 *SOST*mRNA の発現変動

	対照群	0時間群	3時間群	6時間群	12時間群	18時間群	24時間群
近心部	—	—	—	—	—	—	—
中央部	+	+	+	—	—	—	—
遠心部	+*	+*	+*	—	—	—	—
頰側部	+	+	+	+	—	—	—
口蓋側部	+	+	+	+	—	—	—

対照群と各実験群の *SOST*mRNA の発現を部位別に示す。

＋： *SOST*mRNA の発現が認められた部位。

—： *SOST*mRNA の発現が認められなかった部位。

+*：遠心表面一層の骨細胞以外では *SOST*mRNA の発現が認められた。

3 sclerostin 免疫陽性反応の局在分布

対照群では，歯槽骨中央部，遠心部，頬側部および口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲で sclerostin 免疫陽性反応が認められた．一方，近心部の骨細胞および骨細胞周囲と遠心部の骨表面から一層の骨細胞および骨細胞周囲には sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった（図 7）．

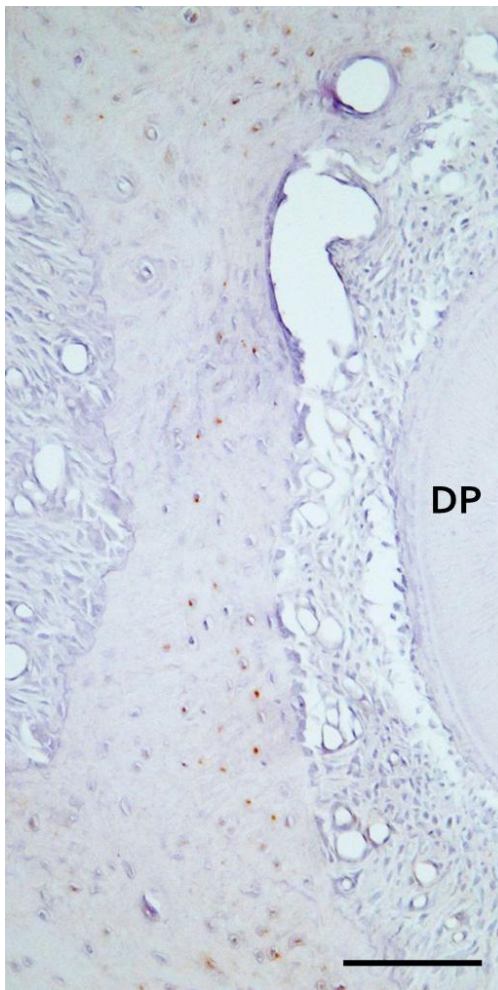


図 7

対照群の sclerostin 免疫染色像

sclerostin 免疫陽性反応は赤茶色に発色している．

（図の左側が近心側，右側が遠心側，上方が頬側，下方が口蓋側．

DP: 遠心口蓋根 bar=50 μ m)

0 時間群，3 時間群，6 時間群では，対照群と同様に，歯槽骨中央部，遠心部，頬側部および口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲で sclerostin 免疫陽性反応が認められた．一方，近心部の骨細胞および骨細胞周

囲と遠心部の骨表面から一層の骨細胞および骨細胞周囲には sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった。12 時間群では, sclerostin 免疫陽性反応が頬側部・口蓋側部の骨細胞および骨細胞周囲には認められたが, 近心部・中央部・遠心部の骨細胞および骨細胞周囲では sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった。18 時間群では観察部位の全域で sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった。24 時間群でも 18 時間群と同様に観察部位の全域で sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった (図 8)。

骨細胞および骨細胞周囲の骨基質中に sclerostin 免疫陽性反応が認められた部位を対照群と実験群で比較すると中央部・遠心部では処置後 12 時間で sclerostin 免疫陽性反応が認められなくなり, 頬側部・口蓋側部では処置後 18 時間で sclerostin 免疫陽性反応が認められなくなることが判明した (表 2)。

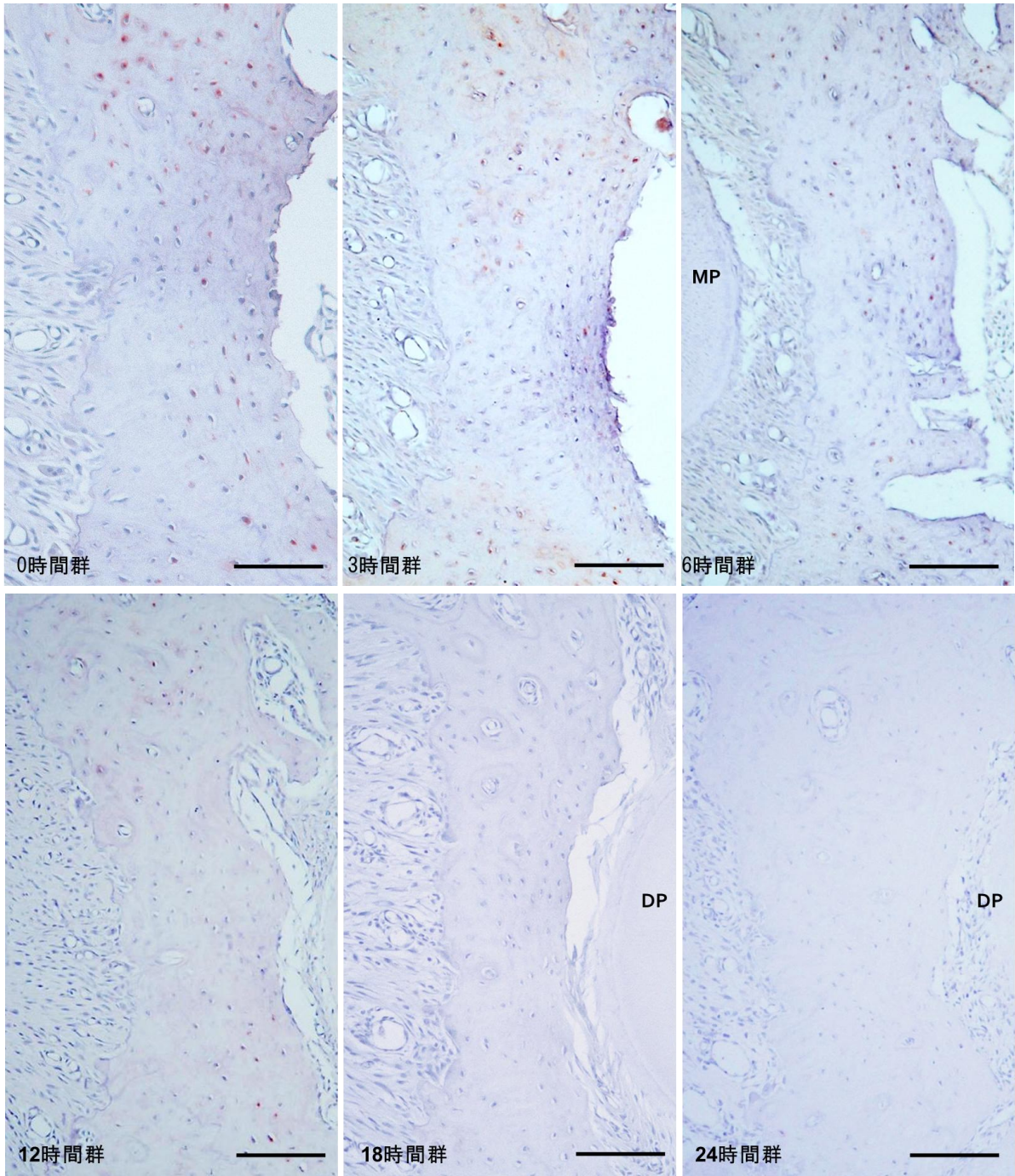


図 8 実験群の sclerostin 免疫染色像

sclerostin 免疫陽性反応は赤茶色に発色している。

(各画像ともに左側が近心側，右側が遠心側，
上方が頬側，下方が口蓋側。

MP:近心口蓋根 DP:遠心口蓋根 bar=50 μ m)

表 2 sclerostin 免疫陽性反応の経時的変化

	対照群	0時間群	3時間群	6時間群	12時間群	18時間群	24時間群
近心部	—	—	—	—	—	—	—
中央部	+	+	+	+	—	—	—
遠心部	+*	+*	+*	+*	—	—	—
頰側部	+	+	+	+	+	—	—
口蓋側部	+	+	+	+	+	—	—

対照群と各実験群の sclerostin 免疫反応を部位別に示す。

＋：sclerostin 免疫陽性反応が認められた部位。

—：sclerostin 免疫陽性反応が認められなかった部位。

＋^{*}：遠心表面一層の骨細胞および骨細胞周囲以外では sclerostin 免疫陽性反応が認められた。

考 察

ラットの顎臼歯は咬合時のメカニカルストレスによって生理的に遠心方向に移動していることが知られている⁴⁷⁾。すなわち歯根の遠心側に面する歯槽骨表面では破骨細胞による骨吸収が、歯根の近心側に面する歯槽骨表面では骨形成が生じることで、歯根が歯槽骨の改造現象を伴って遠心方向に移動することが組織学的研究から明らかにされている⁴⁷⁾。

本研究における対照群の μ CT所見でも、MPがMP-DP間の根間中隔の近心面に近接しており、MPが遠心方向へ移動していることが示された。MPの遠心移動によって圧迫力を受ける根間中隔近心部歯槽骨では*SOST*mRNAの発現もsclerostinの免疫反応も認められなかったことから、この歯根の圧迫によるメカニカルストレスが同部位の骨細胞のsclerostin産生能を抑制しているのかもしれない。

一方、対照群根間中隔の中央部、遠心部、頬側部、口蓋側部の骨細胞は*SOST*mRNAを発現しておりsclerostinの免疫反応も陽性であることから、これらの部位の骨細胞はsclerostinを産生していることが明らかとなった。しかし、根間中隔の遠心表面から一層の骨細胞では*SOST*mRNAの発現もsclerostinの免疫反応も認められなかった。これに関しては、根間中隔遠心部歯槽骨表面が、歯根の遠心移動に伴ってシャー

ピー線維による牽引力を受け活発な骨形成が生じる部位であるので，牽引力によるメカニカルストレスが表層の骨細胞の sclerostin 産生能を抑制している可能性と，活発な骨形成によって骨基質に埋め込まれたばかりの幼弱な骨細胞では sclerostin 産生能を発現するまで分化が進んでいない可能性とが考えられる．

第一臼歯と第二臼歯の間にエラスティックを挿入した実験群の μ CT 所見では，0 時間群から 24 時間群まですべての群で DP が MP-DP 間の根間中隔遠心面に密接しており，第一臼歯が近心方向に強く圧迫されていたことが示された．したがって，実験群では処置直後から処置後 24 時間まで，根間中隔歯槽骨には歯根を介した強いメカニカルストレスが生理的な状態とは逆に近心方向へ加わっていたと考えられる．

実験群の根間中隔において，近心方向への強いメカニカルストレスが加えられてから 3 時間後までは，*SOST*mRNA の発現に関して対照群と比べ変化がなかった．しかし，6 時間後にはそれまで *SOST*mRNA の発現が認められていた根間中隔中央部と遠心部の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が認められなくなった．このことより，骨細胞はメカニカルストレスが加わると 6 時間以内に sclerostin 産生を抑制する迅速な応答能を有していることが明らかになった．

また，根間中隔頬側部と口蓋側部の骨細胞では中央

部と遠心部の骨細胞とは異なり，処置後 12 時間で *SOST*mRNA の発現が消失した．骨細胞の応答時間が部位によって違う理由として，矯正力によって加えられるメカニカルストレスの強度あるいは骨細胞のメカニカルストレスに対する感度が，歯槽骨の部位によって異なっている可能性が考えられる．

メカニカルストレスによって骨細胞の *SOST*mRNA の発現が抑制されるメカニズムについては，骨細胞がメカニカルストレスを感知するとプロスタグランジン E2 を放出し，それがオートクライン・パラクラインとして骨細胞自身の EP4 レセプターを介して作用し，骨細胞内にシグナルが伝達されることで，*SOST*mRNA の発現が抑制される⁴³⁾と考えられている．

また本研究の結果から，メカニカルストレスによって骨細胞の *SOST*mRNA の発現が消失する時期と sclerostin が消失する時期に時間差があることが明らかとなった．実験群の根間中隔中央部と遠心部の骨細胞では矯正力によるメカニカルストレスが加えられてから 6 時間後に *SOST*mRNA の発現が消失したが，同部位の骨細胞と周囲の骨基質には sclerostin の局在がまだ認められており，sclerostin がその領域から消失するのは処置後 12 時間であった．また根間中隔頰側部と口蓋側部の骨細胞で *SOST*mRNA の発現が消失するのが処置後 12 時間で，その領域の sclerostin が認められなくなるのは処置後 18 時間であった．した

がって、いずれの部位でも骨細胞の *SOST*mRNA の発現が消失してから 6 時間後にその領域の sclerostin が消失することが明らかとなった。すなわち、骨細胞が sclerostin の産生を停止しても、その細胞体および周囲の骨基質にはまだ sclerostin が残存しており、それが 6 時間後にはその領域の骨基質から消失することが示された。骨基質に残存していた sclerostin が 6 時間で消失するメカニズムに関しては、骨小腔や骨細管の中を流れる組織液によって sclerostin が骨表面へと運ばれると考えられ、かなり速い速度で骨細胞周囲から骨表面の骨芽細胞へと sclerostin が運ばれている可能性が示された。しかしながら、sclerostin の消失が分解酵素によるものであるという可能性も否定できないので、sclerostin の消失現象に関しては今後の検討が必要と思われる。

生体内ではメカニカルストレスの制御が困難なため、メカニカルストレスと sclerostin の関係について生体を用いて行われた研究は非常に少ない^{10, 52)}。本研究は、矯正歯科治療の手法を用いてメカニカルストレスを制御することで、メカニカルストレスに対する骨細胞の sclerostin 産生能の変化と骨基質中の sclerostin の動態を生体内で経時的に明らかにした初めての研究である。

結 論

骨細胞は，メカニカルストレスが加わったのち6時間で sclerostin 産生を抑制する迅速な応答能を有している．sclerostin は，産生している骨細胞とその周囲の骨基質に存在し，産生が停止すると6時間以内に骨基質中から消失することが明らかとなった．

引用文献

- 1) Wolff J. Das gesetz der transformation der knochen. Verlag : Springer ; 1892.
- 2) Pead MJ, Skerry TM and Lanyon LE. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J Bone Miner Res.* 1988;3:647-656.
- 3) Parfitt AM. The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone. *Calcif Tissue Int.* 1984;36 Suppl 1:S37-45.
- 4) Doty SB. Morphological evidence of gap junctions between bone cells. *Calcif Tissue Int.* 1981;33:509-512.
- 5) Kamioka H, Honjo T and Takano-Yamamoto T. A three-dimensional distribution of osteocyte processes revealed by the combination of confocal laser scanning microscopy and differential interference contrast microscopy. *Bone.* 2001;28:145-149.
- 6) Mullender MG and Huiskes R. Osteocytes and bone lining cells: which are the best candidates for mechano-sensors in cancellous bone?. *Bone.*

- 1997;20:527-532.
- 7) Tatsumi S, Ishii K, Amizuka N, Li M, Kobayashi T, Kohno K, Ito M, Takeshita S and Ikeda K. Targeted ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* 2007;5:464-475.
- 8) Bonewald LF and Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008;42:606-615.
- 9) Burger EH, Klein-Nulend J, van der Plas A and Nijweide PJ. Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction. *J Nutr.* 1995;125:2020S-2023S.
- 10) Ehrlich PJ and Lanyon LE. Mechanical strain and bone cell function: a review. *Osteoporos Int.* 2002;13:688-700.
- 11) Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, Condon KW, Allen MR, Alam I, Mantila SM, Gluhak-Heinrich J, Bellido TM, Harris SE and Turner CH. Mechanical stimulation of bone in vivo reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J Biol Chem.* 2008;283:5866-5875.
- 12) Han Y, Cowin SC, Schaffler MB and Weinbaum S.

- Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:16689-16694.
- 13) Gururaja S, Kim HJ, Swan CC, Brand RA and Lakes RS. Modeling deformation-induced fluid flow in cortical bone's canalicular-lacunar system. *Ann Biomed Eng*. 2005;33:7-25.
- 14) Knothe Tate ML, Niederer P and Knothe U. In vivo tracer transport through the lacunocanalicular system of rat bone in an environment devoid of mechanical loading. *Bone*. 1998;22:107-117.
- 15) Knothe Tate ML, Steck R, Forwood MR and Niederer P. In vivo demonstration of load-induced fluid flow in the rat tibia and its potential implications for processes associated with functional adaptation. *J Exp Biol*. 2000;203:2737-2745.
- 16) Srinivasan S and Gross TS. Canalicular fluid flow induced by bending of a long bone. *Med Eng Phys*. 2000;22:127-133.
- 17) Cowin SC. Mechanosensation and fluid transport in living bone. *J Musculoskelet Neuronal Interact*. 2002;2:256-260.
- 18) Weinbaum S, Cowin SC and Zeng Y. A model for the excitation of osteocytes by mechanical

- loading-induced bone fluid shear stresses. *J Biomech.* 1994;27:339-360.
- 19) Owan I, Burr DB, Turner CH, Qiu J, Tu Y, Onyia JE and Duncan RL. Mechanotransduction in bone: osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. *Am J Physiol.* 1997;273:C810-815.
- 20) Burra S, Nicolella DP, Francis WL, Freitas CJ, Mueschke NJ, Poole K and Jiang JX. Dendritic processes of osteocytes are mechanotransducers that induce the opening of hemichannels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010;107:13648-13653.
- 21) Malone AM, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, Stearns T and Jacobs CR. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:13325-13330.
- 22) Temiyasathit S and Jacobs CR. Osteocyte primary cilium and its role in bone mechanotransduction. *Ann NY Acad Sci.* 2010;1192:422-428.
- 23) Xiao Z, Zhang S, Mahlios J, Zhou G, Magenheimer BS, Guo D, Dallas SL, Maser R, Calvet JP, Bonewald L and Quarles LD. Cilia-like structures and polycystin-1 in osteoblasts/osteocytes and associated

- abnormalities in skeletogenesis and Runx2 expression. *J Biol Chem.* 2006;281:30884-30895.
- 24) Cherian PP, Siller-Jackson AJ, Gu S, Wang X, Bonewald LF, Sprague E and Jiang JX. Mechanical strain opens connexin 43 hemichannels in osteocytes: a novel mechanism for the release of prostaglandin. *Mol Biol Cell.* 2005;16:3100-3106.
- 25) Ajubi NE, Klein-Nulend J, Alblas MJ, Burger EH and Nijweide PJ. Signal transduction pathways involved in fluid flow-induced PGE2 production by cultured osteocytes. *Am J Physiol.* 1999;276:E171-178.
- 26) Ajubi NE, Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Vrijheid-Lammers T, Alblas MJ and Burger EH. Pulsating fluid flow increases prostaglandin production by cultured chicken osteocytes--a cytoskeleton-dependent process. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;225:62-68.
- 27) McGarry JG, Klein-Nulend J and Prendergast PJ. The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;330:341-348.

- 28) Li X, Zhang Y, Kang H, Liu W, Liu P, Zhang J, Harris SE and Wu D. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem.* 2005;280:19883-19887.
- 29) Sawakami K, Robling AG, Ai M, Pitner ND, Liu D, Warden SJ, Li J, Maye P, Rowe DW, Duncan RL, Warman ML and Turner CH. The Wnt co-receptor LRP5 is essential for skeletal mechanotransduction but not for the anabolic bone response to parathyroid hormone treatment. *J Biol Chem.* 2006;281:23698-23711.
- 30) Winkler DG, Sutherland MK, Geoghegan JC, Yu C, Hayes T, Skonier JE, Shpektor D, Jonas M, Kovacevich BR, Staehling-Hampton K, Appleby M, Brunkow ME and Latham JA. Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* 2003;22:6267-6276.
- 31) Hens JR, Wilson KM, Dann P, Chen X, Horowitz MC and Wysolmerski JJ. TOPGAL mice show that the canonical Wnt signaling pathway is active during bone development and growth and is activated by mechanical loading in vitro. *J Bone Miner Res.* 2005;20:1103-1113.
- 32) Robinson JA, Chatterjee-Kishore M, Yaworsky PJ, Cullen DM, Zhao W, Li C, Kharode Y, Sauter L,

- Babij P, Brown EL, Hill AA, Akhter MP, Johnson ML, Recker RR, Komm BS and Bex FJ.
Wnt/beta-catenin signaling is a normal physiological response to mechanical loading in bone. *J Biol Chem*. 2006;281:31720-31728.
- 33) Balemans W, Ebeling M, Patel N, Van Hul E, Olson P, Dioszegi M, Lacza C, Wuyts W, Van Den Ende J, Willems P, Paes-Alves AF, Hill S, Bueno M, Ramos FJ, Tacconi P, Dikkers FG, Stratakis C, Lindpaintner K, Vickery B, Foerzler D and Van Hul W. Increased bone density in sclerosteosis is due to the deficiency of a novel secreted protein (SOST). *Hum Mol Genet*. 2001;10:537-543.
- 34) Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paepers BW, Kovacevich BR, Proll S, Skonier JE, Zhao L, Sabo PJ, Fu Y, Alisch RS, Gillett L, Colbert T, Tacconi P, Galas D, Hamersma H, Beighton P and Mulligan J. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet*. 2001;68:577-589.
- 35) Krishnan V, Bryant HU and Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest*. 2006;116:1202-1209.
- 36) Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B,

- D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, Gong J, Asuncion F, Barrero M, Warmington K, Dwyer D, Stolina M, Morony S, Sarosi I, Kostenuik PJ, Lacey DL, Simonet WS, Ke HZ and Paszty C. Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. *J Bone Miner Res.* 2008;23:860-869.
- 37) Semenov M, Tamai K and He X. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J Biol Chem.* 2005;280:26770-26775.
- 38) Semenov MV and He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem.* 2006;281:38276-38284.
- 39) van Bezooijen RL, Roelen BAJ, Visser A, Van der WeePals L, De Wilt E and Karperien M. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004;199:805-814.
- 40) Winkler DG, Sutherland MS, Ojala E, Turcott E, Geoghegan JC, Shpektor D, Skonier JE, Yu C and Latham JA. Sclerostin inhibition of Wnt-3a-induced C3H10T1/2 cell differentiation is indirect and mediated by bone morphogenetic

- proteins. *J Biol Chem.* 2005;280:2498-2502.
- 41) Bonnet N, Standley KN, Bianchi EN, Stadelmann V, Foti M, Conway SJ and Ferrari SL. The extracellular matrix protein periostin is required for bone formation and the anabolic response to mechanical loading and physical activity. *J Biol Chem.* 2009;284:35939-35950.
- 42) Callewaert F, Bakker A, Schrooten J, Van Meerbeek B, Verhoeven G, Boonen S and Vanderschueren D. Androgen receptor disruption increases the osteogenic response to mechanical loading in male mice. *J Bone Miner Res.* 2010;25:124-131.
- 43) Galea GL, Sunter A, Meakin LB, Zaman G, Sugiyama T, Lanyon LE and Price JS. Bone formation down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4. *FEBS Lett.* 2011;585:2450-2454.
- 44) Lin C, Jiang X, Dai Z, Guo X, Weng T, Wang J, Li Y, Feng G, Gao X and He L. Sclerostin mediates bone response to mechanical unloading through antagonizing Wnt/beta-catenin signaling. *J Bone Miner Res.* 2009;24:1651-1661.
- 45) Nguyen J, Tang SY, Nguyen D and Alliston T. Load regulates bone formation and Sclerostin

- expression through a TGFbeta-dependent mechanism. *PLoS One*. 2013;8:e53813.
- 46) Zaman G, Saxon LK, Sunters A, Hilton H, Underhill P, Williams D, Price JS and Lanyon LE. Loading-related regulation of gene expression in bone in the contexts of estrogen deficiency, lack of estrogen receptor alpha and disuse. *Bone*. 2010;46:628-642.
- 47) Sicher H and Weinmann J. Bone growth and physiologic tooth movement. *Am J Orthod Oral Surg*. 1944;30:109-132.
- 48) Azuma M. Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Dent Univ*. 1970;17:149-178.
- 49) Kabasawa M, Ejiri S, Hanada K and Ozawa H. Effect of age on physiologic and mechanically stressed rat alveolar bone: a cytologic and histochemical study. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg*. 1996;11:313-327.
- 50) Waldo CM and Rothblatt JM. Histologic response to tooth movement in the laboratory rat; procedure and preliminary observations. *J Dent Res*. 1954;33:481-486.
- 51) Macapanpan L, Weinmann J and Brodie A. Early

- tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 1954;24:79-95.
- 52) Watanabe R, Aoki K, Fujiwara A, Yano W, Satoh K, Kogaya Y, Kitai N and Ejiri S. Changes in sclerostin localization in alveolar bones during tooth displacement. *IBMS Bonekey.* 2013;10:50.
- 53) Shibata Y, Fujita S, Takahashi H, Yamaguchi A and Koji T. Assessment of decalcifying protocols for detection of specific RNA by non-radioactive in situ hybridization in calcified tissues. *Histochem Cell Biol.* 2000;113:153-159.
- 54) Morse A. Formic acid-sodium citrate decalcification and butyl alcohol dehydration of teeth and bones for sectioning in paraffin. *J Dent Res.* 1945;24:143-153.
- 55) Wilkinson DG and Nieto MA. Detection of messenger RNA by in situ hybridization to tissue sections and whole mounts. *Methods Enzymol.* 1993;225:361-373.

