

原 著

メカニカルストレスの変動に伴う歯槽骨骨細胞の  
sclerostin 産生能の変化

駒 形 香葉子<sup>1)</sup> 藤 原 敦<sup>1)</sup> 渡 邊 竜 太<sup>2)</sup>  
江 尻 貞 一<sup>2)</sup> 北 井 則 行<sup>1)</sup>

Changes in the sclerostin productivity of alveolar bone osteocytes  
due to mechanical stress changes

KANAKO KOMAGATA<sup>1)</sup>, ATSUSHI FUJIWARA<sup>1)</sup>, RYUUTA WATANABE<sup>2)</sup>,  
SADAKAZU EJIRI<sup>2)</sup>, NORIYUKI KITAI<sup>1)</sup>

ラット上顎臼歯間に挿入したゴムを除去することで、メカニカルストレスを変動させ、それに伴う歯槽骨骨細胞の sclerostin 産生能の変化を検索し、メカニカルストレス変動に対する骨細胞の反応機序の解明を試みた。8 週齢雄性 Wistar (Slc) ラット32匹を用いた。実験群は3群8匹ずつに分け、未処置群は8匹とした。上顎第一、第二臼歯間にゴムを24時間挿入後、ただちにト殺した24時間装着群、ゴムを除去して6時間後の除去後6時間群、24時間後の除去後24時間群、および未処置群を作製し、 $\mu$ CT 撮影後、SOSTmRNA に対する *in situ* Hybridization と sclerostin に対する免疫染色を行った。観察部位は第一臼歯近心根と近心口蓋根間の根間隔歯槽骨 (M-MP) および近心口蓋根と遠心口蓋根間の根間隔歯槽骨 (MP-DP) とした。未処置群の M-MP、MP-DP では、SOSTmRNA と sclerostin が認められた。24時間装着群の M-MP、MP-DP では、SOSTmRNA も sclerostin も認められなかった。除去後6時間群では、M-MP で SOST mRNA と sclerostin が認められたが、MP-DP では SOST mRNA も sclerostin も認められなかった。除去後24時間群の M-MP、MP-DP では、SOSTmRNA と sclerostin が認められた。部位によって sclerostin 産生能回復時間が異なる原因として、メカニカルストレスの強度またはメカニカルストレスに対する骨細胞の感受性が部位により異なることが考えられる。メカニカルストレスを加えることにより消失した骨細胞の sclerostin 産生分泌能は、メカニカルストレス除去後6時間で回復し、SOSTmRNA の発現と同時期に骨基質中に sclerostin が分泌されることと部位によって骨細胞の sclerostin 産生能回復時間が異なることが示された。

キーワード：SOSTmRNA、メカニカルストレス、骨細胞、スクレロstin、ラット歯槽骨

*By removing the rubber inserted between the maxillary molars of rats, the mechanical stress was changed, and the accompanying change in the sclerostin production ability of alveolar bone osteocytes was assessed to clarify the mechanism underlying the osteocytes response to changes in mechanical stress. Thirtytwo 8-week-old male Wistar (Slc) rats were used. Experimental groups were divided into three treatment groups of eight animals each with the remaining eight animals in an untreated group. The groups were as follows: a group in which the rubber was inserted between the first and second molar teeth for 24 h, after which the animals were immediately sacrificed (24 h wearing group); two groups in which the rubber was inserted between the first and second molar teeth for 24 h, after which the rubber was removed, the animals were sacrificed 6 h after removal treatment (6 h after group), and sacrificed 24 h after removal treatment (24 h after group).*

<sup>1)</sup> 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座歯科矯正学分野

<sup>2)</sup> 朝日大学歯学部口腔構造機能発育学講座口腔解剖学分野  
〒501-0296 瑞穂市穂積1851

<sup>1)</sup> Department of Orthodontics, Division of Oral Structure, Function and Development

<sup>2)</sup> Department of Oral Anatomy, Division of Oral Structure, Function and Development, Asahi University School of Dentistry.  
1851 Hozumi, Mizuho, Gifu 501-0296, Japan.

(平成30年7月27日受理)

ment (24 h after group). After micro-computed tomography imaging, SOSTmRNA in situ hybridization and sclerostin immunostaining were performed. The observation site was the alveolar bone of intraradicular septum between the first molar tooth mesial root and the mesial palatal root (M-MP), and the bone of intraradicular septum between the mesial palatal root and the distal palatal root (MP-DP). In the untreated group, both SOSTmRNA expression and sclerostin staining were observed in the M-MP and MP-DP. In contrast, neither SOSTmRNA expression nor sclerostin staining was observed in the M-MP or MP-DP in the 24 hour wearing group. Furthermore, while both SOSTmRNA expression and sclerostin staining were observed in the M-MP in the 6 h after group, neither SOSTmRNA expression nor sclerostin staining was observed in the MP-DP. Both SOSTmRNA expression and sclerostin staining were observed in the M-MP and MP-DP in the 24 h after group. Because of the different force or susceptibility of osteocytes on each site, the time required to produce sclerostin by osteocytes may be different. The sclerostin production ability of osteocytes that had been eliminated by the application of mechanical stress recovered at 6 h after removal of mechanical stress, and sclerostin was once again secreted into the bone matrix at the almost same time as the expression of SOSTmRNA in osteocytes. The recovery time of sclerostin production was found to differ depending on the site.

Key words : SOSTmRNA, mechanical stress, osteocytes, Sclerostin, rat alveoli

## 緒 言

骨はメカニカルストレスの変化に適応していることが知られている<sup>1)</sup>。実際に骨にメカニカルストレスを加えて骨細胞の反応を調べた研究<sup>2)</sup>では、メカニカルストレスが加わった領域で骨形成が生じたが、その領域の骨細胞および骨細胞周囲の sclerostin が消失していることから、メカニカルストレスによって骨細胞の sclerostin 産生が抑制されることが明らかとなった。

sclerostin とは、SOST 遺伝子にコードされる糖タンパク質<sup>3)</sup>で、骨細胞によって産生分泌される<sup>4,5)</sup>。骨細胞が分泌した sclerostin は骨芽細胞表面にある Wnt 共役受容体の lipoprotein receptor-related protein 5/6 (LRP5/6) に結合することで、Wnt タンパク質が受容体に結合することを阻害し、その結果、骨芽細胞における Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル系が作動しなくなり、骨形成が抑制される<sup>6-8)</sup>。一方、メカニカルストレスを感知した骨細胞は sclerostin 産生を停止し、その結果、骨芽細胞の Wnt/ $\beta$ -カテニンシグナル系が作動するようになり、骨形成が促進すると考えられている<sup>6,9)</sup>。

骨細胞がメカニカルストレスによって sclerostin 産生を抑制する機構に関しては、メカニカルストレスを感知した骨細胞がプロスタグランジン E2などを放出し、それが骨細胞自身の EP4レセプターに結合し、骨細胞内にシグナル伝達された結果、SOSTmRNA の発現が抑制され sclerostin 産生を停止するという報告がある<sup>10)</sup>。

メカニカルストレスによって生じる骨改造現象と骨細胞の反応を生体内で観察するためには、継続的な骨改造現象が生じており、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顎骨臼歯部が適している。ラットの臼歯は咬合力によるメカニカルストレスによって生理的に遠心方向に移動<sup>11)</sup>しているが、第一、第二臼歯間にエラスティックを挿入することで、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ことが知られている<sup>12-14)</sup>。

このモデルを用いてメカニカルストレスの方向を反転させ、歯槽骨骨細胞の SOSTmRNA の発現と sclerostin の局在変化を経時的に検索した研究<sup>15)</sup>によると、強いメカニカルストレスが加わった領域の歯槽骨骨細胞では、メカニカルストレス負荷後6～12時間で SOSTmRNA の発現が消失し、さらにその6時間後に骨基質中の sclerostin が消失すると報告されている。また、メカニカルストレス負荷後24時間で上顎第一臼歯歯槽骨中のすべての骨細胞において SOSTmRNA の発現と sclerostin の局在が認められなくなったことが報告されている。

しかしながら、メカニカルストレスを感知して sclerostin 産生を停止した骨細胞が、再び sclerostin 産生を開始する機序について詳細な研究は報告されていない。

本研究では、ラット上顎臼歯部に挿入したエラスティックを除去することで、メカニカルストレスを変化させ、その変動に伴う骨細胞の SOSTmRNA の発現状態を *in situ* Hybridization 法を用いて、骨基質中の sclerostin の局在変化を免疫染色にて経時的に検索し、骨細胞のメカニカルストレス変動に対する反応機序の解明を試みた。

## 材料と方法

### 1 実験動物

実験には8週齢の雄性 Wistar (Slc) ラット32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: 16-004)を得て行った。

### 2 実験方法

エラスティックを挿入しない8匹を未処置群(図1A)として灌流固定した。実験群は3群8匹ずつに分け、ラットの腹腔内に塩酸メデトミジン(ドルベネ

注<sup>®</sup>, 共立製薬, 東京) 0.15mg/kg, ミダゾラム(ドルミカム注射液<sup>®</sup>, アステラス製薬, 東京) 2.0mg/kg, 酒石酸ブトルファノール(ベトルファール<sup>®</sup>, Meiji seika ファルマ, 東京) 2.5mg/kg を投与した後、生理的に遠心移動している上顎左側第一臼歯(M1), 第二臼歯(M2)間に矯正用エラスティック(ズーパックエラスティック, Ormco Corporation, CA, USA)を挿入し、24時間M1の近心移動を行った。その後直ちに4℃の4%パラホルムアルデヒド固定液にて灌流固定を行った8匹を24時間装着群とした(図1B)。エラスティックを24時間装着後、エラスティックを除去し、6時間後に灌流固定を行った8匹を除去後6時間群とした(図1C)。エラスティック除去後24時間後に灌流固定を行った8匹を除去後24時間群とした。エラスティック装着中および除去後のラットは、固形飼料と水道水を自由に摂取できる状態にした。

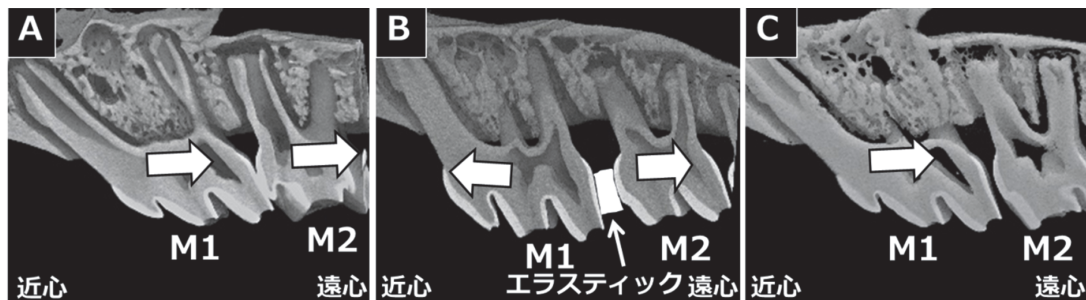


図1 未処置群、エラスティック24時間装着群およびエラスティック除去後6時間群の $\mu$ CT画像  
白矢印は歯牙の移動方向を示す。  
(A) 未処置群 (B) エラスティック24時間装着群 (C) エラスティック除去後6時間群  
M1: 第一臼歯 M2: 第二臼歯

灌流固定後、上顎骨を摘出し、24時間4%パラホルムアルデヒドにて浸漬した後、0.1Mリン酸緩衝液(PBS)中で保存した。次いで試料を $\mu$ CT装置(ScanXmate-RB090SS, コムスキャンテクノ, 横浜)にて撮影した(管電圧: 90kV, 管電流:  $89\mu\text{A}$ , 倍率: 13倍)。 $\mu$ CTスライス画像から三次元立体構築ソフトウェア(TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京)を用いて立体構築像を作製した。 $\mu$ CT撮影後、上顎骨はMorseのギ酸-クエン酸脱灰液<sup>16)</sup>を用い、室温で攪拌しながら5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<sup>®</sup>, REM-700, 大和光機工業, 埼玉)を用いて、咬合平面と平行な水平断で厚さ $5\mu\text{m}$ の連続切片を作製した。

### 1) *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(NM\_030584.1)を作製した。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RNA Probeとして使用した。*in situ* HybridizationはWilkinson and Nietoの方法<sup>17)</sup>にて行った。また、ネガティブコントロールにはセンスプローブを使用した。

### 2) 免疫染色

脱パラフィン処理した切片を、0.3% $\text{H}_2\text{O}_2$ 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倍希釈した抗マウスSOST/sclerostin抗体(AF1589)(R&D System, MN, USA)を4℃で

一晚反応させた。その後、biotin 標識抗ヤギ IgG 抗体 (cell & tissue staining kit, R&D System, MN, USA) に60分間浸漬し、diamino benzidine staining kit (cell & tissue staining kit, R&D System, MN, 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一次抗体として正常ヤギ IgG または PBS を用いて反応を行った。

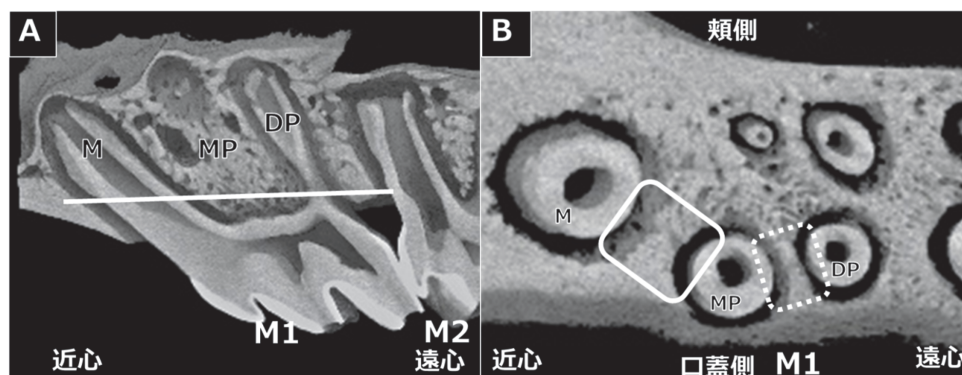


図2 観察部位を示す $\mu$ CT画像

(A) 矢状断面像。白線は咬合平面と平行で根間中隔歯槽頂部直下を通る水平断面の位置を示す。

(B) 図Aにおける白線の位置での水平断面像。

近心根 (M) と近心口蓋根 (MP) との間の白線で囲まれた根間中隔歯槽骨を観察部位 M-MP とした。

近心口蓋根 (MP) と遠心口蓋根 (DP) との間白の破線で囲まれた根間中隔歯槽骨を観察部 MP-DP とした。

M1: 第一臼歯 M2: 第二臼歯

## 結 果

### 1 $\mu$ CT 所見

未処置群ではM1とM2は接していた(図3A)。また、MPとM-MP、DPとMP-DP間に歯根膜腔に相当する間隙が認められた(図3B)。

24時間装着群では、挿入したエラストックによりM1とM2間は離開しており、MPはM-MPに、DPはMP-DPに近接していた(図3C、D)。

除去後6時間群では、24時間装着群と比較して、M1とM2間の空隙は狭まり、MPはM-MPから、DPはMP-DPから離れていることが示された(図3E、F)。

除去後24時間群ではM1とM2間の空隙は認められなくなった(図3G)。MPとM-MP、DPとMP-DP間の間隙は除去後6時間群よりも拡大していた(図3H)。

### 2 *SOST*mRNA *in situ* Hybridization の所見

未処置群のM-MP、MP-DPに存在する骨細胞には*SOST*mRNAの発現が認められた(図4A、B)。

24時間装着群では、M-MP、MP-DPともに骨細胞で*SOST*mRNAの発現が認められなかった(図5A、B)。

### 3 観察部位

上顎第一臼歯(M1)の根間中隔歯槽頂部直下を通る咬合平面に平行な水平断面上の近心根(M)と近心口蓋根(MP)との間の根間中隔歯槽骨をM-MP、近心口蓋根(MP)と遠心口蓋根(DP)の間の根間中隔歯槽骨をMP-DPとし、観察部位とした(図2)。

除去後6時間群では、M-MPの骨細胞においてのみ*SOST*mRNAの発現が認められたが、MP-DPの骨細胞では*SOST*mRNAの発現が認められなかった(図5C、D)。

除去後24時間群では、M-MP、MP-DPともに骨細胞には*SOST*mRNAの発現が認められた(図5E、F)。

### 3 sclerostin 免疫染色の結果

未処置群では、M-MP、MP-DPともに骨細胞と骨細胞周囲に抗sclerostin抗体陽性反応が認められた(図6A、B)。

24時間装着群では、M-MP、MP-DPともに骨基質中の抗sclerostin抗体陽性反応が認められなかった(図7A、B)。

除去後6時間群では、M-MPの骨細胞と骨細胞周囲において抗sclerostin抗体陽性反応が認められたが、MP-DPの骨細胞と骨細胞周囲では抗sclerostin抗体陽性反応が認められなかった(図7C、D)。

除去後24時間群では、M-MP、MP-DPともに骨細胞と骨細胞周囲に抗sclerostin抗体陽性反応が認められた(図7E、F)。

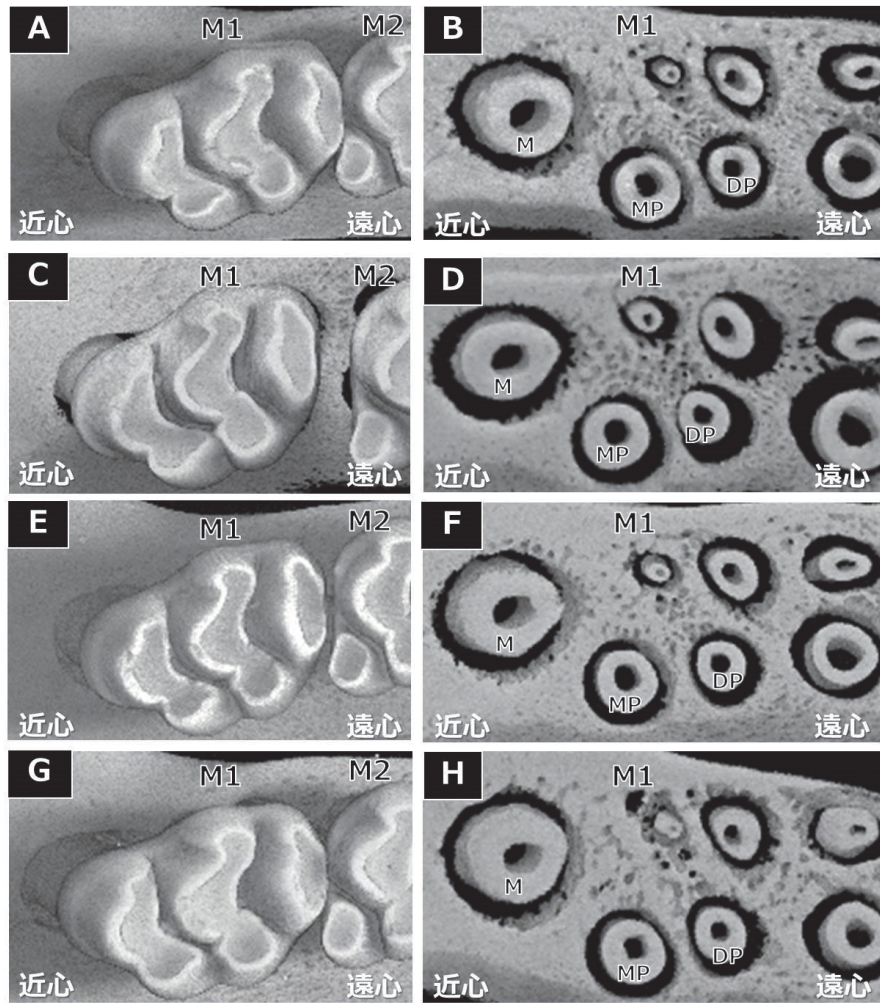


図3  $\mu$ CT 立体構築像

(A) 未処置群の M1 と M2 の咬合面観 (B) 未処置群の M1 の根間中隔歯槽骨の水平断面像  
 (C) 24 時間装着群の M1 と M2 の咬合面観 (D) 24 時間装着群の M1 の根間中隔歯槽骨の水平断面像  
 (E) 除去後 6 時間群の M1 と M2 の咬合面観 (F) 除去後 6 時間群の M1 の根間中隔歯槽骨の水平断面像  
 (G) 除去後 24 時間群の M1 と M2 の咬合面観 (H) 除去後 24 時間群の M1 の根間中隔歯槽骨の水平断面像  
 M1: 第一臼歯 M2: 第二臼歯 M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根

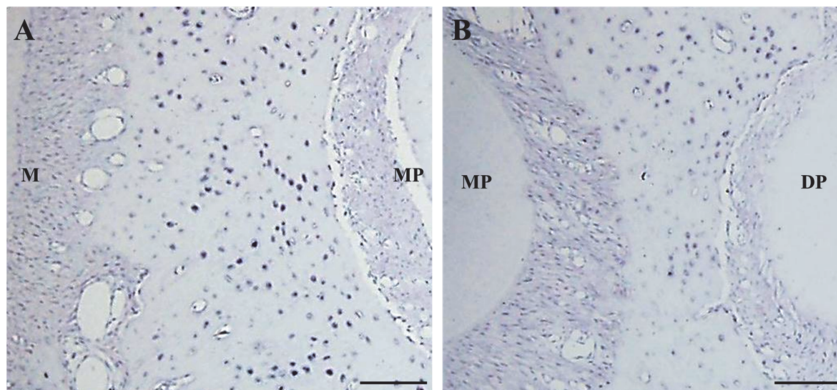


図4 未処置群の *SOST* mRNA *in situ* Hybridization 所見

(A) M-MP, (B) MP-DP  
 骨細胞には *SOST* mRNA の発現を示す青紫色の反応が認められる.  
 M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根 bar=50 $\mu$ m

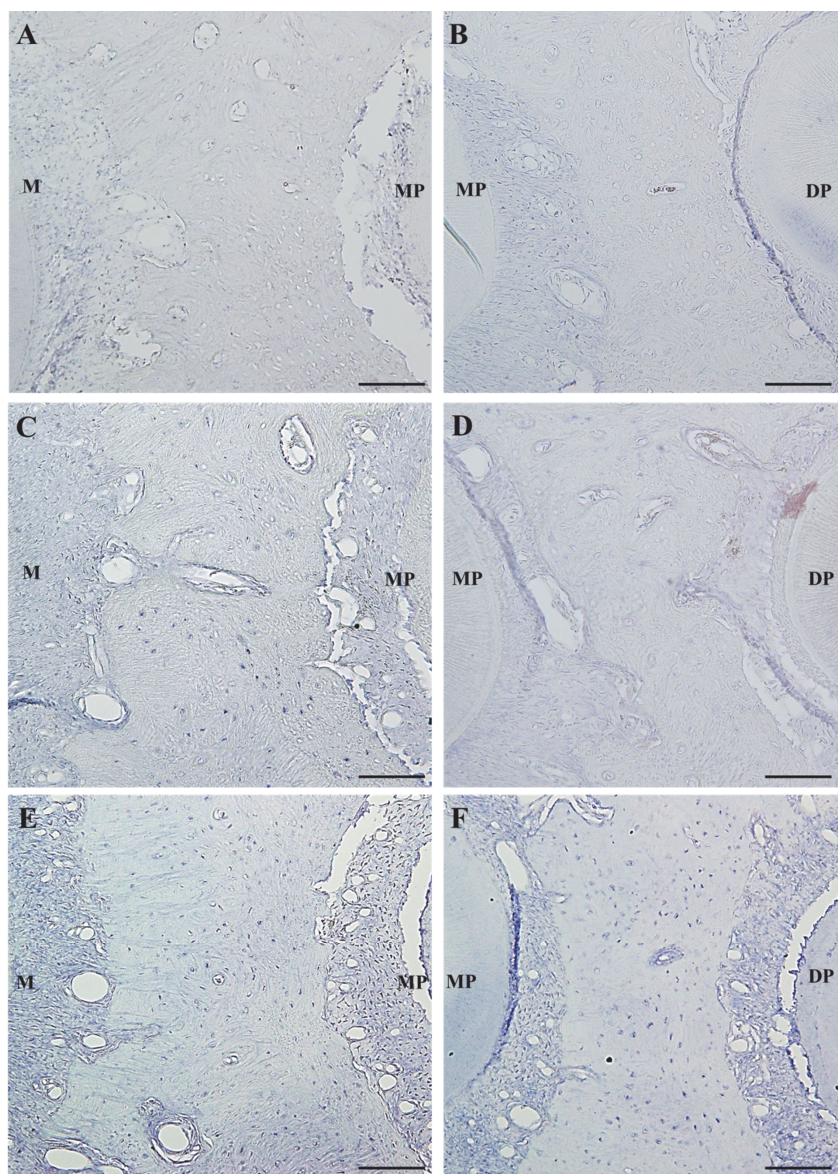


図5 実験群の SOSTmRNA *in situ* Hybridization 所見

(A) 24時間装着群の M-MP, (B) 24時間装着群の MP-DP, (C) 除去後6時間群の M-MP, (D) 除去後6時間群の MP-DP, (E) 除去後24時間群の M-MP, (F) 除去後24時間群の MP-DP, 除去後6時間群では M-MP の骨細胞にのみ SOSTmRNA の発現を示す青紫色の反応が認められる. 除去後24時間群では M-MP, MP-DP ともに骨細胞には SOSTmRNA の発現を示す青紫色の反応が認められる.  
M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根 bar=50 $\mu$ m

## 考 察

ラットの臼歯は生理的に遠心方向に移動していることが知られている<sup>11)</sup>.  $\mu$ CT 所見では, 未処置群の M1 と M2 は接していたが, エラスティック装着24時間群の M1 と M2 の間には空隙が認められ, MP は M-MP に, DP は MP-DP に近接していた. したがって, エラスティックを挿入してから24時間矯正力が負荷されたことで M1 は近心移動し, 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

逆方向に加わっていたと考えられる. エラスティック除去後6時間群では, 24時間装着群と比較して, M1 と M2 間の空隙は狭まり, MP は M-MP から, DP は MP-DP から離れていたことから, 近心移動していた M1 がエラスティックを除去することで遠心に移動し, メカニカルストレスの方向が変化したことが示唆された. エラスティック除去後24時間群では M1 と M2 の空隙は閉鎖しており, 生理的な咬合状態とほぼ同じ状態へ戻ることが示された.

未処置群の M-MP, MP-DP では, 骨細胞に

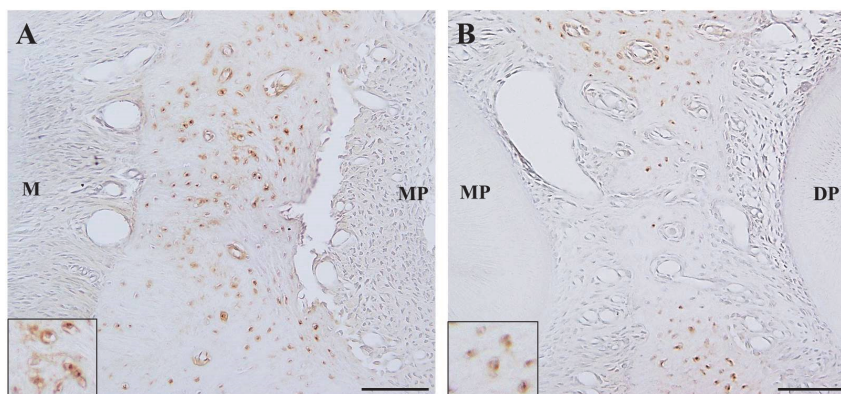


図6 未処置群の sclerostin 免疫染色像

(A) M-MP, (B) MP-DP  
骨細胞と骨細胞周囲に茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められる。枠内に一部拡大像を示す。  
M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根 bar=50 $\mu$ m

SOSTmRNA の発現が認められ、骨細胞と骨細胞周囲に抗 sclerostin 免疫陽性反応が認められたことから、生理的な咬合状態では M-MP, MP-DP に存在する骨細胞は sclerostin を産生し分泌していたことが示された。しかし、24時間装着群の M-MP, MP-DP では、骨細胞の SOSTmRNA の発現も、骨細胞および骨細胞周囲の抗 sclerostin 免疫陽性反応も認められなかったことから、24時間矯正力が負荷されたことで M-MP, MP-DP とともに骨細胞は sclerostin の産生を停止し、さらに骨基質中の sclerostin も消失することが明らかとなった。この結果は、メカニカルストレス負荷後24時間で上顎第一臼歯歯槽骨中のすべての骨細胞において SOSTmRNA の発現も sclerostin の局在も認められないとした報告<sup>15)</sup>と同様である。

一方、エラスティックを除去すると M-MP, MP-DP とともに SOSTmRNA の発現と sclerostin の局在が認められたことから、メカニカルストレスを加えることにより消失した骨細胞の sclerostin 産生分泌は、メカニカルストレス除去後に回復することが明らかになった。

エラスティック除去6時間後に、M-MP で SOSTmRNA の発現が回復した本研究の結果と、メカニカルストレス負荷後6時間で sclerostin 産生能が消失することという報告<sup>15)</sup>を合わせて考えると、骨細胞がメカニカルストレスに反応し、sclerostin 産生能を変化させるまでに必要な時間は6時間であると推測される。

本研究では、骨細胞の SOSTmRNA の発現が認められると同時に骨細胞と骨細胞周囲に sclerostin の局在が認められた。したがって、骨細胞が SOSTmRNA を発現すると、ただちに骨基質中に sclerostin が分泌されることが示唆される。一方、骨細胞の SOSTmRNA が消失した後、6時間経過すると骨基

質中の sclerostin の局在が認められなくなると報告されている<sup>15)</sup>。この現象は骨細胞周囲に存在していた sclerostin が、骨小腔や骨細管の中を流れる組織液によってすべて骨表面へと運ばれるまでの経過時間であると解釈されている。

エラスティック除去6時間後、M-MP では骨細胞における SOSTmRNA の発現と抗 sclerostin 免疫陽性反応が認められた。しかし MP-DP では SOSTmRNA の発現も抗 sclerostin 免疫陽性反応も認められなかったことから、部位によってメカニカルストレスの変動に対する骨細胞の反応時間が異なることが示された。この理由として、歯槽骨の部位によって骨細胞のメカニカルストレスに対する感受性が異なる可能性が考えられる。また、24時間装着群の  $\mu$ CT 所見で示されているように、エラスティック挿入による矯正力によって MP-DP には DP が圧接しており、M-MP より強いメカニカルストレスが加わっている可能性が示唆される。この部位によるメカニカルストレスの差が、sclerostin 産生停止作用を引き起こすプロスタグランジン E2の量や、骨細胞の EP4レセプターにプロスタグランジン E2が結合した後のセカンドメッセンジャーに量的な差が生じた結果、再び sclerostin が産生されるまでの時間が異なる可能性も考えられる。

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変動させることで、メカニカルストレスによって停止した骨細胞の sclerostin 産生能と骨基質中の sclerostin の局在の回復について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

メカニカルストレスを加えることにより消失した骨細胞の sclerostin 産生分泌は、メカニカルストレス除

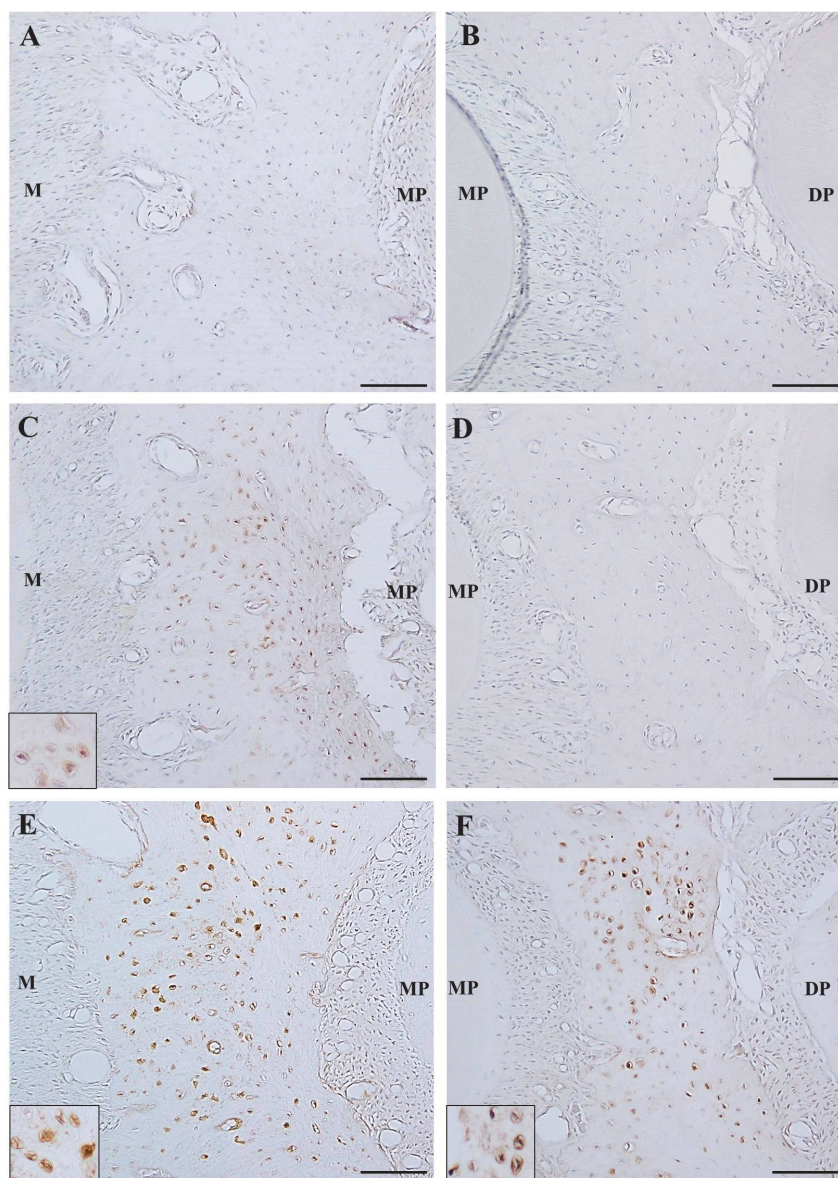


図7 実験群の sclerostin 免疫染色像

(A) 24時間装着群の M-MP, (B) 24時間装着群の MP-DP, (C) 除去後6時間群の M-MP, (D) 除去後6時間群の MP-DP, (E) 除去後24時間群の M-MP, (F) 除去後24時間群の MP-DP, 除去後6時間群では M-MP の骨細胞と骨細胞周囲にのみ茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められる。枠内に一部拡大像を示す。除去後24時間群では M-MP, MP-DP とともに骨細胞と骨細胞周囲には茶色の抗 sclerostin 抗体陽性反応が認められる。枠内に一部拡大像を示す。  
M: 近心根 MP: 近心口蓋根 DP: 遠心口蓋根 bar=50 $\mu$ m

去後6時間で回復することが明らかとなり、骨細胞が *SOST*mRNA を発現すると、ただちに骨基質中に sclerostin が分泌されることが示唆された。また、部位によってメカニカルストレスの変動に対する骨細胞の反応時間は異なることが示された。

#### 引用文献

- 1) Wolff J. The Law of Bone Remodeling. Berlin, Germany: Springer; 1986.
- 2) Robling AG, Niziolek PJ, Baldridge 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.
- 3) Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper 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.
- 4) 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.
  - 5) van Bezooijen RL, Roelen BA, Visser A, van der Wee-Pals L, de Wilt E, Karperien M, Hamersma H, Papapoulos SE, ten Dijke P and Lowik CW. Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J Exp Med.* 2004; 199: 805-814.
  - 6) 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.
  - 7) Krishnan V, Bryant HU and Macdougald OA. Regulation of bone mass by Wnt signaling. *J Clin Invest.* 2006; 116: 1202-1209.
  - 8) 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.
  - 9) Bonewald LF and Johnson ML. Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* 2008; 42: 606-615.
  - 10) Galea GL, Sunter A, Meakin LB, Zaman G, Sugiyama T, Lanyon LE and Price JS. *SOST* down-regulation by mechanical strain in human osteoblastic cells involves PGE2 signaling via EP4. *FEBS Lett.* 2011; 585: 2450-2454.
  - 11) Shicher H and Weinmann JP. Bone growth and physiologic tooth movement. *Am J orthod Oral Surg.* 1944; 30: 109-132.
  - 12) Azuma M. Study on histologic changes of periodontal membrane incident to experimental tooth movement. *Bull Tokyo Med Dent Univ.* 1970; 17: 149-178.
  - 13) Macapanpan LC, Weinmann JP and Brodie AG. Early tissue changes following tooth movement in rats. *Angle Orthod.* 1954; 24: 79-95.
  - 14) 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.
  - 15) 藤原 敦, 渡邊竜太, 青木啓太, 矢野 航, 佐藤和彦, 小萱康德, 北井則行, 江尻貞一. メカニカルストレスに対する歯槽骨 *SOST* mRNA の経時的発現変動. *Journal of Oral Biosciences Supplement.* 2013; 09: 203.
  - 16) 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.
  - 17) 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.