

周期的伸展力が RAW264.7 細胞の破骨細胞様細胞への分化に与える影響

チャールストンコード 祐

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

日本大学歯学部歯科矯正学講座

(指導: 本吉 満 教授, 馬谷原琴枝 准教授)

要旨:

目的: 歯科矯正治療では, メカニカルストレスが歯槽骨に伝わり, 骨形成と骨吸収のバランスが変化する。本研究では, 破骨細胞前駆細胞に 6% と 18% の異なる 2 つの伸展率によるメカニカルストレスを負荷し, 破骨細胞の分化に及ぼす影響を検討した。

方法: RAW264.7 細胞を Bioflex Culture Plate に播種し, 10% ウシ胎児血清と 50 ng/ml RANKL 存在下で 72 時間培養後, 伸展率 6% または 18% で 6 回 / 分の周期的伸展力によるメカニカルストレスを 48 時間, 負荷した。RANK, lysophosphatidic acid receptor-1, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP および cathepsin K の遺伝子発現を real-time PCR で, cathepsin K のタンパク発現を Western blotting 法で調べた。細胞を TRAP 染色し, 3 核以上の TRAP 陽性細胞の数と面積を計測した。

結果: RANK, lysophosphatidic acid receptor-1, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP および cathepsin K の発現, ならびに TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞の数とその面積は, 伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。

結論: メカニカルストレスは, RANK と lysophosphatidic acid receptor-1 の発現を低下させることで, 破骨細胞分化関連因子ならびに骨基質タンパク分解酵素の発現を抑制し, 破骨細胞の分化と骨吸収機能を抑制することが示唆された。

キーワード: 破骨細胞, 機械的刺激, 矯正力, lysophosphatidic acid receptor-1, nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1

The effect of cyclic tension force on osteoclast-like cell differentiation in RAW264.7 cells

Tasku Charleston-Coad

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral structural and Functional Biology

Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Mitsuru Motoyoshi and Associate Prof. Kotoe Mayahara)

Abstract: Purpose: The balance of osteoblastic-bone formation and osteoclastic bone resorption in alveolar bone is changed by mechanical stress during orthodontic treatment. In this study, osteoclast precursor cells were stimulated with cyclic tension force and the effects of mechanical stress on osteoclastogenesis and related factor expression were examined.

Methods: RAW264.7 cells on the Bioflex Culture Plate were cultured in the presence of RANKL and fetal bovine serum and stimulated with mechanical stress derived from 6% or 18% cyclic elongation. The expression of RANK, lysophosphatidic acid receptor-1, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP and cathepsin K was examined by real-time PCR or Western blotting. The formation of osteoclast-like cells was examined TRAP staining.

Results: The expression of RANK, lysophosphatidic acid receptor-1, NFATc1, DC-STAMP, OC-STAMP and cathepsin K was suppressed by mechanical stress derived from 6% or 18% cyclic elongation. These magnitudes of mechanical stress also decreased the number and planar area of TRAP-positive cells with three nuclei.

(受付: 令和 4 年 1 月 21 日)

責任著者連絡先: チャールストンコード 祐

日本大学歯学部歯科矯正学講座

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8105

FAX : 03-3219-8105

E-mail : tcc2034@gmail.com

Conclusion: Cyclic tension force suppresses RANK and lysophosphatidic acid receptor-1 expression and osteoclast differentiation factors and protease in the RAW264.7 cells on Bioflex Culture Plate, suggesting osteoclastic bone resorption was suppressed by mechanical stress.

Keywords: osteoclast, mechanical stress, orthodontic force, lysophosphatidic acid receptor-1, nuclear factor of activated T cells cytoplasmic 1

緒 言

歯科矯正治療では、矯正力により歯の移動や顎骨の形態変化を惹起することを治療手段とする。歯に加わる矯正力はメカニカルストレスとして歯根膜を介して歯槽骨に伝わり、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスが変化することで歯の移動が起こる¹⁻³⁾。このメカニカルストレス応答性の骨リモデリング変化のメカニズムを解明するために、これまでに様々な *in vitro* 研究が行われており、メカニカルストレスの強度によって骨芽細胞に及ぼす影響が異なる可能性が示唆されている。骨芽細胞に圧迫力を負荷した研究では、 1 g/cm^2 の圧迫力は bone morphogenetic protein (BMP)-2 の産生増加を介して骨基質タンパクである bone sialoprotein や osteopontin の発現を誘導して石灰化物形成を促進する一方で、 3 g/cm^2 の圧迫力はこれらを抑制することを報告している^{4,5)}。また、シリコンで構成された底面を持つプレートを用いた研究では、plate 底面の伸展率が 3~9% のメカニカルストレスで骨芽細胞の BMP-2 の発現と osteopontin の遺伝子発現が増加し⁶⁾、伸展率 18% のメカニカルストレスでは alkaline phosphatase 発現と石灰化物形成が減少することが明らかにされている^{7,8)}。これら先行研究の知見から、メカニカルストレスには骨芽細胞による骨形成を促進する至適な強度があり、これを超えると骨形成機能は低下すると考えられる。

骨吸収を担う破骨細胞の分化は、receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) ligand (RANKL) と osteoprotegerin によって調節されている。すなわち、単核の破骨細胞前駆細胞上に発現する RANK に RANKL が結合する (RANK/RANKL 結合) と、破骨細胞前駆細胞の融合に関与する dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP) と osteoclast stimulatory transmembrane protein (OC-STAMP) の発現が増加し、多核を有する成熟破骨細胞へと分化する⁹⁾。成熟した破骨細胞は、cathepsin K (CTSK) をはじめとするタンパク分解酵素や H^+ を分泌して骨有機質と無機質を溶解する。これら破骨細胞の分化と骨吸収機能に関連する因子の発現は、nuclear factor of activated T-cells cytoplasmic 1 (NFATc1) が核内に移行することで増加し^{10,11)}、一方で、osteoprotegerin が RANK/RANKL 結合を阻害して破骨細胞の分化を抑制する¹²⁾。また、生理活性物質である窒

素酸化物や lysophosphatidic acid (LPA) も破骨細胞の分化を促進することが知られている^{13,14)}。

メカニカルストレスが破骨細胞分化に及ぼす影響を調べた研究は骨芽細胞に比べて少ないものの、これまでに、BioFlex Culture Plate (BioFlex plate) 上の破骨細胞前駆細胞に伸展率 10~15% のメカニカルストレスを負荷すると、破骨細胞の融合が抑制されることが示されている¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし、メカニカルストレスの強度の違いが破骨細胞の分化に及ぼす影響は不明である。そこで、本研究では、BioFlex plate 上の破骨細胞前駆細胞に 6% と 18% の異なる 2 つの伸展率によるメカニカルストレスを負荷し、破骨細胞様細胞の形成ならびに破骨細胞分化関連因子の発現を検討した。

材料および方法

1. 細胞の培養

本研究では、破骨細胞前駆細胞としてマウス腹水由来の単球/マクロファージ RAW264.7 細胞 (RAW 細胞; 大日本住友製薬, 大阪) を用いた。RAW 細胞を 6-well BioFlex Culture Plate-Collagen Type I (BioFlex plate; Flexcell International, Burlington, NC, USA) に 9.0×10^4 cells/well の密度で播種し、10% ウシ胎児血清 (FBS; ニチレイバイオサイエンス, 東京), ペニシリン/ストレプトマイシン/アムホテリシン B 含有 1% 抗菌剤混合液 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および 50 ng/ml RANKL (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を含む α -minimal essential medium (α -MEM; 富士フィルム和光純薬, 大阪) で、 37°C 、5% CO_2 の気相下にて培養した。培養液は培養 2 日毎に交換した。

2. 周期的伸展力の負荷

RANKL 存在下で 72 時間培養した BioFlex plate を Flexercell Strain Unit (Model FX3000; Flexcell International, Burlington, NC, USA) に移し、 37°C 、5% CO_2 の気相下にて plate 底面を吸引し、伸展率 6% または 18% で 6 回/分の周期的伸展力を 48 時間負荷した。なお、伸展率 6% または 18% のメカニカルストレスの負荷の度に前述の細胞の播種と培養を行い、伸展力を負荷せずに同一の培養器に BioFlex plate を静置して培養した細胞をコントロールとした。

3. Real-time polymerase chain reaction (real-time PCR)

NucleoSpin RNA(タカラバイオ, 草津)を用いて RAW 細胞から total RNA を抽出した。Prime Script RT reagent kit(タカラバイオ)を用いて total RNA から cDNA を合成後, 2 μ l の cDNA 溶液, 20 μ M の sense および anti-sense primer を含む TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) 溶液 25 μ l を調整し, Smart Cycler II System(Cepheid, Sunnyvale, CA, USA)を使用して real-time PCR を行った。使用したプライマーの塩基配列を表1に示す。PCR 反応は 90 $^{\circ}$ C, 5 秒間の DNA 変性, 60 $^{\circ}$ C, 30 秒間のアニーリングと伸長を 1 サイクルとして, 40 サイクル行った。結果の解析には Smart Cycler software(ver. 2.0)を用いた。反応産物の特異性を融解曲線で確認した後, あらかじめ作成した検量線をもとに遺伝子の増幅量を求め, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)を内部標準に用いて補正した値を mRNA 発現量とした。

4. 酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ(TRAP)染色

RAW 細胞を 10% 中性緩衝ホルマリン液にて 5 分間固定した後, TRAP 染色キット(コスモバイオ, 東京)を用いて製造者指示に従い細胞を染色した。倒立顕微鏡(DIAPHOT; ニコン, 東京)に付属のデジタルカメラ(DS-Fi2; ニコン)を用いて細胞の染色像を撮影した。核を 3 個以上有する TRAP 陽性細胞を破骨細胞とし, 画像統合ソフトウェア NIS-Elements(ニコン)を用いて well 中の破骨細胞様細胞の数と面積を計測した。

5. Western blotting

RAW 細胞を, 0.05% Triton X-100, 10 mM β -mercaptoethanol, protease inhibitor(Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)および 25 mM Tri-HCl(pH7.4)を含む溶液に溶解して超音波処理した後, 12,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心して上清を回収した。細胞内タンパク 20 μ g を 10% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後, Trans-blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)を用いてゲル内のタンパクを polyvinylidene difluoride 膜(PVDF 膜; Bio-Rad)に転写した後, 0.5% Tween 20 含有 Tris buffered saline (TBS-T)に 2% bovine serum albumin を溶解した溶液に PVDF 膜を浸漬して非特異的な抗体反応をブロッキングした。Western blotting 法には, 一次抗体としてマウス免疫抗ヒト cathepsin K(CTSK)抗体(sc-48353; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, 希釈率 1:1,000; マウス CTSK と交差反応)とおよびウサギ免疫抗ヒト GAPDH 抗体(EPR16891; Abcam, 希釈率 1:10,000; マウス GAPDH と交差反応)を, 2 次抗体には, ビオチン標識されたヤギ免疫抗マウス IgG 抗体(ab6788; Abcam, 希釈率 1:10,000)またはヤギ免疫抗ウサギ IgG 抗体(A27035; Thermo Fisher Scientific, 希釈率 1:10,000)を用いた。PVDF 膜上のタンパクとこれらの抗体を反応させた後, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン溶液(LGC SERACARE, Milford, MA, USA)を加え, Clarity Western ECL(Bio-Rad)で化学発光反応を行い CCD 撮影装置(ChemiDoc XRS Plus; Bio-Rad)で撮影し

表1 real-time PCR に用いたプライマーの塩基配列

Target	Forward Primer Reverse Primer	Genbank acc. no.
RANK	5'-TGCAGCTCAACAAGGATACG-3' 5'-GAGCTGCAGACCACATCTGA-3'	NM_009399.3
LPAI*	5'-AAAGGCAAAGTAATGTGAGCTTGTC-3' 5'-CACTGAGGGTCTGGCACTGA-3'	NM_010336.2
NFATc1	5'-CCGTTGCTCCAGAAAATAACA-3' 5'-TGTGGGATGTGAACTCGGAA-3'	NM_016791.4
DC-STAMP	5'-CTAGCTGGCTGGACTTCATCC-3' 5'-TCATGCTGTCTAGGAGACCTC-3'	NM_029422.4
OC-STAMP	5'-AGCTGTAGCCTGGGCTCAGAAG-3' 5'-AGCCTGTGGTAGATGACAGTCGTG-3'	NM_029021.1
CTSK	5'-CAGCAGAACGGAGGCATTGA-3' 5'-CCTTTGCCGTGGCGTTATAC-3'	NM_007802.4
GAPDH	5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' 5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3'	NM_001289726.1

*: LPA 受容体 1

た。なお、GAPDH のバンドの検出後、PVDF 膜を Western blot stripping buffer (タカラバイオ) に浸漬して膜上の抗体を剥離、TBS-T で洗浄し、CTSK 抗体を用いてリブプローブを行った。

6. 統計処理

全ての実験は 3 回繰り返し、結果は平均値と標準偏差で示した。統計学的分析は IBM SPSS Statistics 23.0 software (International Business Machines, Armonk, NY, USA) で行ない、多群間の比較は、一元配置分散分析後、Bonferroni 法の多重比較検定法を用いて検定した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. RANK と LPA1 の遺伝子発現に及ぼすメカニカルストレスの影響

伸展率 0 (コントロール)、6% および 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷した RAW 細胞における RANK と LPA 受容体 1 (LPA1) の遺伝子発現を図 1 に示す。RANK の遺伝子発現は、コントロールに比較し伸展率 6% と 18% で有意に減少した。また、LPA1 の遺伝子発現は、コントロールと伸展率 6% に比較して伸展率 18% で有意に減少した。

2. NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP の遺伝子発現に及ぼすメカニカルストレスの影響

コントロール、6% および 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷した RAW 細胞における NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP の遺伝子発現を図 2 に示す。NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP の遺伝子発現は、コントロールに比較し伸展率 6% と 18% で有意に減少した。また、NFATc1 と OS-STAMP の遺伝子発現は、伸展率 6% に比較して 18% で有意に低かった。

3. 破骨細胞様細胞の形成に及ぼすメカニカルストレスの影響

コントロール、6% および 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷した RAW 細胞の TRAP 染色像を図 3 A に、3 核以上を持つ TRAP 陽性細胞の数と面積をそれぞれ図 3 B と図 3 C に示す。大型の TRAP 陽性細胞はコントロールで、小型の TRAP 陽性細胞は伸展率 6% と 18% で、それぞれ多く観察された。3 核以上を持つ TRAP 陽性細胞の数とその面積は、コントロールに比較し伸展率 6% と 18% で有意に減少し、伸展率 6% に比較して 18% で有意に低かった。

4. CTSK の遺伝子発現とタンパク発現に及ぼすメカニカルストレスの影響

BioFlex plate 上でコントロール、6% および 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷した RAW 細胞の CTSK の遺伝子発現を図 4 A に、タンパク発現を図 4 B に示す。CTSK の遺伝子発現は、コントロールに比較し

伸展率 6% と 18% で有意に減少した。また、コントロールに比較し伸展率 6% と伸展率 18% で、CTSK のタンパク発現を示す Western blotting のバンドの減弱が認められた。

考 察

本研究では、BioFlex plate を用いて RANKL の存在下で RAW 細胞を培養し、plate 底面を 6% または 18% 伸展させることで細胞に伸展力を加え、破骨細胞様細胞の分化に及ぼすメカニカルストレスの影響を検討した。まず、RANKL の受容体である RANK の発現を調べた結果、伸展率 6% および 18% のいずれのメカニカルストレスを受けた細胞も発現の低下が認められた。また、RANK が RANKL に結合した後に発現が増加する NFATc1, DC-STAMP および OC-STAMP^{10,11,18)} の遺伝子発現、ならびに多核を有する TRAP 陽性細胞の数とその面積もメカニカルストレスの負荷によって顕著に減少した。これらの結果から、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスは、RANK の発現を低下させることで、破骨細胞分化関連因子の発現を低下させ、破骨細胞の分化を抑制すると考えられた。

RAW 細胞や骨髄由来細胞を *in vitro* で破骨細胞へと分化誘導する際には、RANKL とともに FBS を培地に添加する必要があることが知られており^{19,20)}、本研究でもすべての培養過程で RANKL と FBS を添加した培地を用いた。他方、破骨細胞の分化は、FBS から脂質分画を取り除くと抑制され、LPA の添加で回復することが知られている²¹⁾。さらに、Hwang ら²²⁾ は、培地中の RANKL の添加量を減じると LPA が OC-STAMP 発現を誘導して破骨細胞の分化が維持されると報告している。本研究では、RANK の発現は伸展率 6% と 18% の両方で抑制されたが、LPA の受容体である LPA1 の発現抑制は伸展率 18% のみに認められた。これら先行研究の知見と本研究結果から、伸展率 18% のメカニカルストレスを受けた細胞では、RANK だけでなく LPA1 の発現が減少するため、培地中の LPA による OC-STAMP の発現誘導の効果が発揮されず、破骨細胞への分化がさらに抑制される可能性が考えられた。

Shibata ら²³⁾ は、本研究と同様に BioFlex plate を用いて、RAW 細胞に伸展率 10% のメカニカルストレスを 30 回 / 分で 48 時間負荷すると、RANK 発現が減少した一方で、NFATc1 の発現量には変化が認められなかったと報告している。一方、本研究では、これまでの骨芽細胞や歯根膜細胞に同様の手法でメカニカルストレスを負荷した先行研究^{7,24)} を参考に、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスを 6 回 / 分にて 48 時間負荷した。本研究では、6% と 18% のメカニカルストレス負荷は RANK

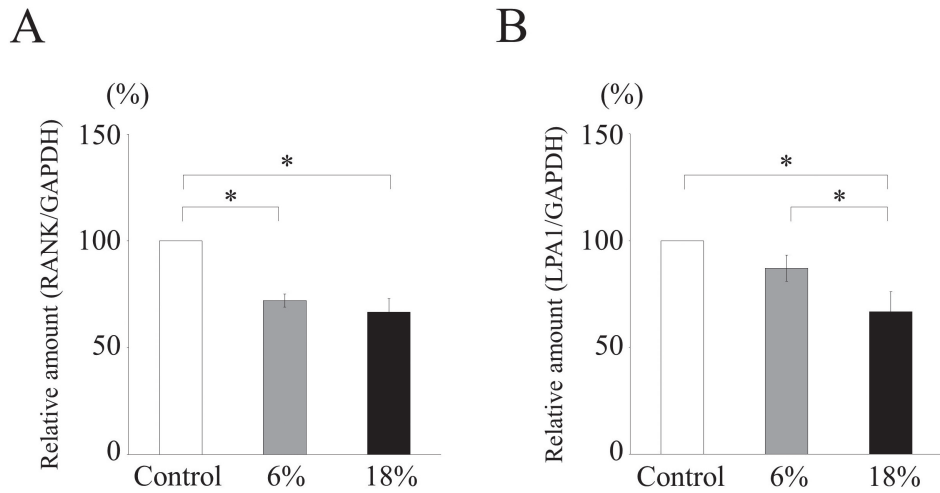


図1 RAW細胞におけるメカニカルストレス負荷がRANK(A)およびLPA1(B)の遺伝子発現に与える影響
伸展率6%または18%のメカニカルストレスを48時間負荷後の遺伝子発現量を示す。n=3, * $p < 0.05$

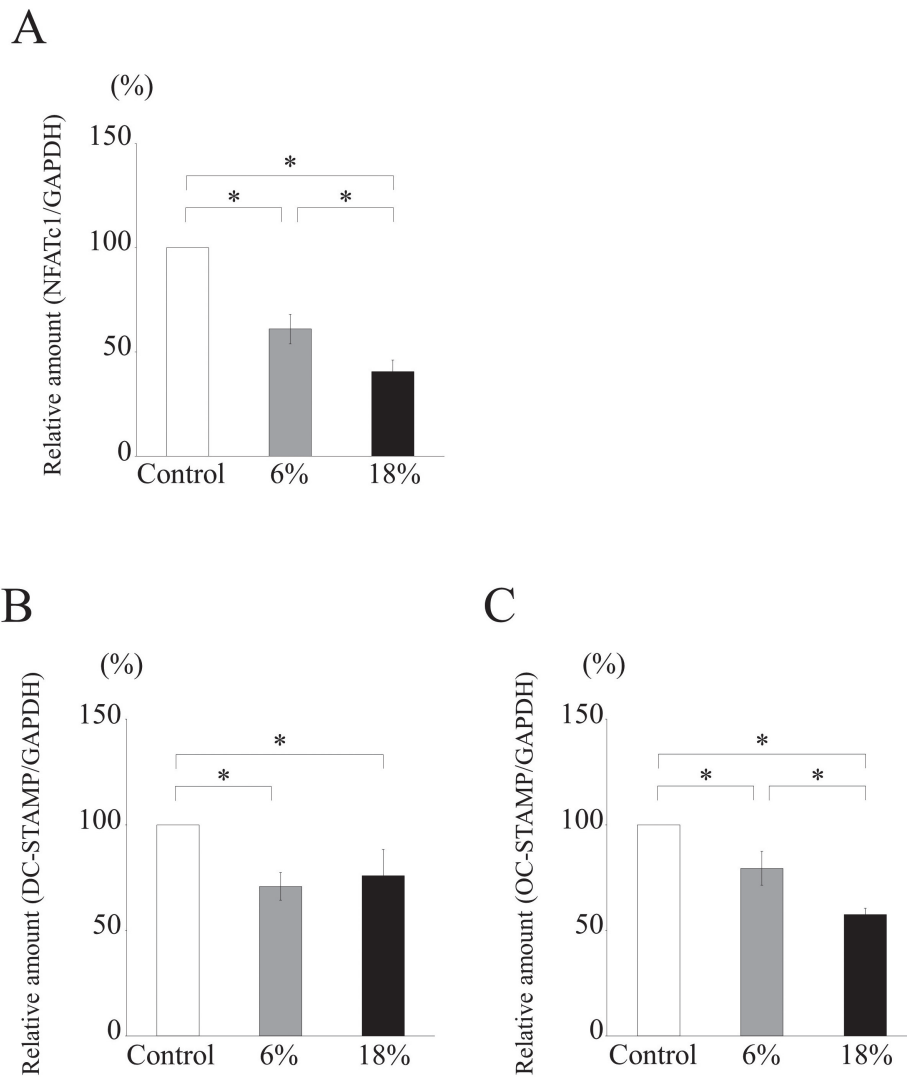


図2 RAW細胞におけるメカニカルストレス負荷がNFATc1(A), DC-STAMP(B)およびOC-STAMP(C)の遺伝子発現に与える影響
伸展率6%または18%のメカニカルストレスを48時間負荷後の遺伝子発現量を示す。n=3, * $p < 0.05$

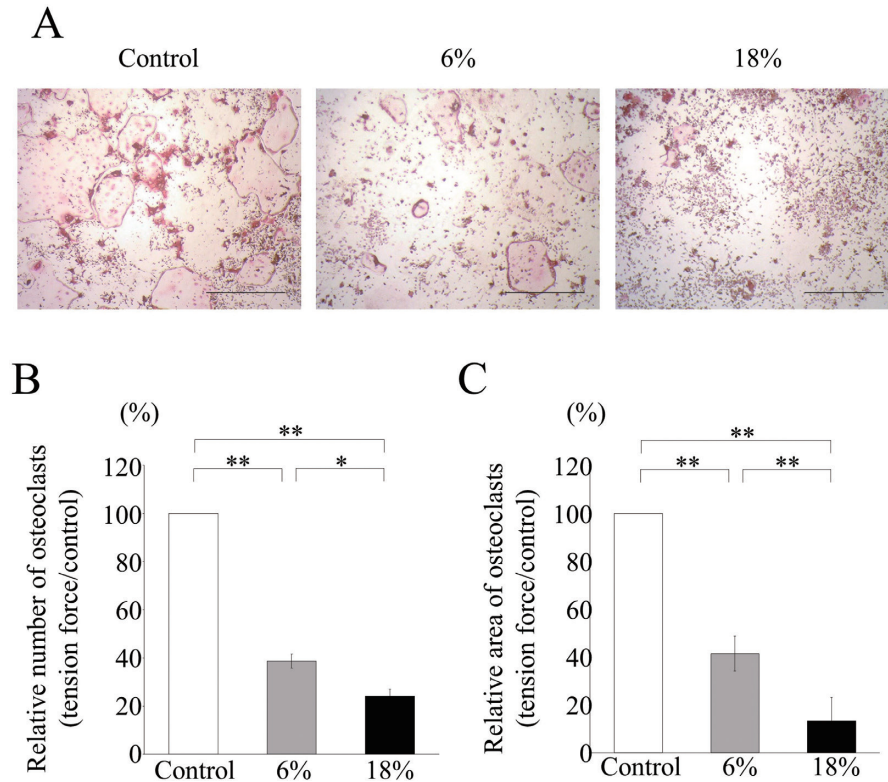


図3 RAW 細胞におけるメカニカルストレス負荷が破骨細胞形成に与える影響
伸展率 6% または 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷後の TRAP 染色像 (A),
破骨細胞数 (B) および破骨細胞面積 (C) を示す。(bar = 100 μ m)
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

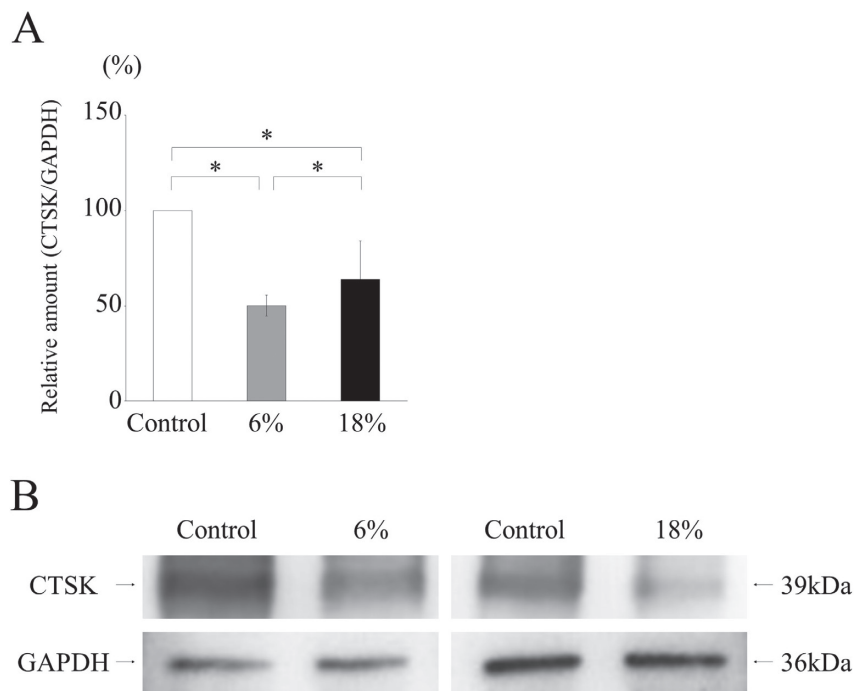


図4 RAW 細胞におけるメカニカルストレス負荷がCTSK の遺伝子 (A) およびタンパク (B) 発現に与える影響
伸展率 6% または 18% のメカニカルストレスを 48 時間負荷後の遺伝子およびタンパク発現量を示す。n=3, * $p < 0.05$

だけでなく NFATc1 の発現も抑制し、NFATc1 の発現抑制はより強いメカニカルストレス(伸展率 18%)で顕著であった。これら 2つの研究において、NFATc1 の発現に与える影響に違いがみられた理由には、BioFlex plate 底面の伸展率のみならず伸展サイクルの違いが関係していると考えられた。

破骨細胞が産生する骨基質分解酵素である CTSK は、RANKL が RANK に結合後、NFATc1 が核内に移行することで発現が増加することが知られている^{25,26)}。本研究では、CTSK の発現はコントロールと比較して、伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で発現低下が認められ、メカニカルストレスによって NFATc1 の発現が抑制された結果と矛盾するものでなかった。以上のように、本結果から、伸展力によるメカニカルストレスは、破骨細胞の分化のみならず骨吸収機能を低下させることが示唆された。

結 論

メカニカルストレスの強度の違いが破骨細胞分化に及ぼす影響を検討することを目的として、BioFlex plate 上の RAW 細胞にコントロール、6% または 18% のメカニカルストレスを周期的に負荷し、破骨細胞分化関連因子の発現と破骨細胞形成を調べた。その結果、以下の結論を得た。

1. RANKL の受容体 RANK の発現は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。一方、LPA1 の発現はコントロールと伸展率 6% のメカニカルストレスの負荷に比べて伸展率 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
2. 細胞融合を促進する NFTAcl, DC-STAMP および OC-STAMP の発現は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
3. TRAP 陽性の多核の破骨細胞様細胞の数とその面積は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。
4. 骨基質分解酵素 CTSK の発現は、コントロールに比べて伸展率 6% と 18% のメカニカルストレスの負荷で減少した。

稿を終えるにあたり、多大なるご指導を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座本吉満教授、馬谷原琴枝准教授に心より感謝申し上げます。また、本研究を通じ多大なるご指導とご協力をいただきました日本大学歯学部衛生学講座川戸貴行教授を始め、日本大学歯学部衛生学講座の皆様へ深く感謝申し上げます。

なお、本研究の一部は、日本大学歯学部総合歯科学研究費(B)によって行われた。

本論文に関して、開示すべき利益相反はありません。

文 献

- 1) Krishnan V, Davidovitch Z (2006) Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129, 469.e1-469.e32.
- 2) Wise GE, King GJ (2008) Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 87, 414-434.
- 3) Murshid S (2017) The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review. *Arch Oral Biol* 73, 25-33.
- 4) Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, Mayahara K, Yanagisawa M, Otsuka K, Shimizu N (2005) Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone sialoprotein and prostaglandin E₂ production appropriately. *Life Sci* 77, 3168-3182.
- 5) Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, Yanagisawa M, Koyama Y, Otsuka K, Shimizu N (2006) Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone morphogenetic proteins production and decreasing their antagonists production by Saos-2 cells. *Life Sci* 78, 2697-2706.
- 6) Bhatt KA, Chang EI, Warren SM, Lin SE, Bastidas N, Ghali S, Thibboneir A, Capla JM, McCarthy JG, Gurtner GC (2007) Uniaxial mechanical strain: an *in vitro* correlate to distraction osteogenesis. *J Surg Res* 143, 329-336.
- 7) Fushiki R, Mayahara K, Ogawa M, Takahashi Y, Karasawa Y, Tsurumachi N, Tamura T, Shimizu N (2015) High-magnitude mechanical strain inhibits the differentiation of bone-forming rat calvarial progenitor cells. *Connect Tissue Res* 56, 336-341.
- 8) Takahashi Y, Mayahara K, Fushiki R, Matsuike R, Shimizu N (2019) Effect of mechanical strain-induced PGE₂ production on bone nodule formation by rat calvarial progenitor cells. *J Oral Sci* 61, 25-29.
- 9) 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 (2012) 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.
- 10) Miyamoto T (2011) Regulators of osteoclast differentiation and cell-cell fusion. *Keio J Med* 60, 101-105.
- 11) Kodama J, Kaito T (2020) Osteoclast multinucleation: review of current literature. *Int J Mol Sci* 21, 5685.
- 12) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345-357.
- 13) Lee SK, Huang H, Lee SW, Kim KH, Kim KK, Kim HM, Lee ZH, Kim HH (2004) Involvement of iNOS-dependent NO production in the stimulation of osteoclast survival

- by TNF- α . *Exp Cell Res* 298, 359-368.
- 14) David M, Machuca-Gayet I, Kikuta J, Ottewell P, Mima F, Leblanc R, Bonnelye E, Ribeiro J, Holen I, Vales RL, Jurdic P, Chun J, Clézardin P, Ishii M, Peyruchaud O (2014) Lysophosphatidic acid receptor type 1 (LPA1) plays a functional role in osteoclast differentiation and bone resorption activity. *J Biol Chem* 289, 6551-6564.
 - 15) Suzuki N, Yoshimura Y, Deyama Y, Suzuki K, Kitagawa Y (2008) Mechanical stress directly suppresses osteoclast differentiation in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 21, 291-296.
 - 16) Kameyama S, Yoshimura Y, Kameyama T, Kikuri T, Matsuno M, Deyama Y, Suzuki K, Iida J (2012) Short-term mechanical stress inhibits osteoclastogenesis via suppression of DC-STAMP in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 31, 292-298.
 - 17) Uemura K, Yoshimura Y, Minamikawa H, Suzuki K, Iida J (2018) Continuous mechanical stress suppresses osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Hokkaido J Dent Sci* 38, 169-176.
 - 18) Kim JH, Kim N (2014) Regulation of NFATc1 in osteoclast differentiation. *J Bone Metab* 21, 233-241.
 - 19) Maridas DE, Rendina-Ruedy E, Le PT, Rosen CJ (2018) Isolation, culture, and differentiation of bone marrow stromal cells and osteoclast progenitors from mice. *J Vis Exp* 131, 56750.
 - 20) Xiong Q, Zhang L, Xin L, Gao Y, Peng Y, Tang P, Ge W (2015) Proteomic study of different culture medium serum volume fractions on RANKL-dependent RAW264.7 cells differentiating into osteoclasts. *Proteome Sci* 13, 16.
 - 21) David M, Wannecq E, Descotes F, Jansen S, Deux B, Ribeiro J, Serre CM, Grès S, Bendriss-Vermare N, Bollen M, Saez S, Aoki J, Saulnier-Blache JS, Clézardin P, Peyruchaud O (2010) Cancer cell expression of autotaxin controls bone metastasis formation in mouse through lysophosphatidic acid-dependent activation of osteoclasts. *PLoS One* 5, e9741.
 - 22) Hwang YS, Ma GT, Park KK, Chung WY (2014) Lysophosphatidic acid stimulates osteoclast fusion through OC-STAMP and P2X7 receptor signaling. *J Bone Miner Metab* 32, 110-122.
 - 23) Shibata K, Yoshimura Y, Kikuri T, Hasegawa T, Taniguchi Y, Deyama Y, Suzuki K, Iida J (2011) Effect of the release from mechanical stress on osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. *Int J Mol Med* 28, 73-79.
 - 24) Shimizu N, Ozawa Y, Yamaguchi M, Goseki T, Ohzeki K, Abiko Y (1998) Induction of COX-2 expression by mechanical tension force in human periodontal ligament cells. *J Periodontol* 69, 670-677.
 - 25) Nakashima T, Takayanagi H (2011) New regulation mechanisms of osteoclast differentiation. *Ann NY Acad Sci* 124, e13-e18.
 - 26) Xing L, Xiu Y, Boyce BF (2012) Osteoclast fusion and regulation by RANKL-dependent and independent factors. *World J Orthop* 3, 212-222.