

ラット脛骨における炭酸ガスレーザー骨誘導 初期変化について

大河内瑠夏

Effects of Carbon Dioxide Laser on Induction of Bone Formation in Rat Tibiae

Ruka OHKOUCHI

The CO₂ laser has two opposing biological effects, inducing clear morphological changes in irradiated tissues: tissue vaporization and activation. High-level reactive laser therapy (HLLT) irradiation results in hyperthermia and tissue vaporization. Conversely, low-level reactive laser therapy (LLLT) irradiation stimulates cell proliferation and differentiation. Recent studies have reported that low-level CO₂ laser therapy induces new bone formation, suggesting that LLLT can be generally applied in GBR for the promotion of bone regeneration and in implant therapy for oral rehabilitation. However, the biological mechanism of CO₂ LLLT in bone tissue remains unclear. The purpose of this study was to examine the effects of CO₂ LLLT on bone cell function during bone induction. For this purpose, CO₂ laser-irradiated rat tibial bone tissue was analyzed histochemically and molecular biologically. On the third experimental day, bone marrow cells had accumulated just beneath the cortical bone of the laser-irradiated left tibia, and expressed osteopontin protein. On the fifth experimental day, woven bone composed of osteoid matrix was observed immediately beneath the laser-irradiated cortical bone, but bone marrow cells in the right tibia that had undergone dental bur-induced injury showed no changes. On the third experimental day, bone marrow cells in the laser-irradiated left tibia showed a higher level of osteopontin mRNA expression than that in the right tibia with dental bur-induced injury. Interestingly, osteocytes in the cortical bone were stained by anti-Lef-1 antibody at 3 h through 3 days after laser irradiation. However, the intensity of staining of osteocytes in the left tibia with anti-LEF-1 antibody decreased with the progression of bone formation until the fifth day after laser irradiation. On the other hand, osteocytes in the left tibia could not be stained with anti-SOST antibody until the third day after laser irradiation, but were stainable with the progression of bone formation from the fifth day after laser irradiation. These results suggest that CO₂ laser irradiation induces bone formation, and osteocytes have an important signaling function for the control of bone formation. This indicates that the Wnt canonical pathway in osteocytes is initially involved in the laser irradiation-induced mechanical signaling cascade in bone remodeling.

Key words : CO₂ laser osteocyte mechanical stress lef-1 sclerostin

受付：平成21年3月30日，受理：平成21年5月19日
奥羽大学大学院歯学研究科保存修復学専攻
(指導：横瀬敏志教授)

Department of Conservative Dentistry, Ohu
University, Graduate School of Dentistry
(Director : Prof. Satoshi YOKOSE)

緒言

現在歯科治療においてさまざまな種類のレーザーが広く応用されている。一般にレーザーは高出力レーザーと低出力レーザーに分類され、高出力レーザーではアルゴンレーザー、YAGレーザー、炭酸ガスレーザーが代表的である。近年では低出力レーザーの臨床応用の加速が見られ、半導体レーザーやヘリウムネオンレーザーなども注目されている。このように歯科における臨床において広く応用されているレーザーであるが、なかでも高出力レーザーに分類される炭酸ガスレーザーはその出力の違いを自由にコントロールすることが可能であり、臨床において有用性の高いレーザーである。つまり炭酸ガスレーザーは照射時に起こる表面組織の蒸散などの High Level reactive Laser Therapy (HLLT) 作用と照射部位周囲における細胞増殖、創傷治癒促進などの Low Level reactive Laser Therapy (LLLT) 作用を比較的容易にコントロールすることができる^{1,2)}。炭酸ガスレーザーの特徴としては、組織表面での水分の吸収性が高く、非接触的であり感染の危険性も比較的軽度で、操作性も高いことが知られている。したがって、炭酸ガスレーザーを使用した臨床報告および基礎的研究は多数報告されている³⁻⁹⁾。田島ら^{6,7)}は、ラット耳介筋細胞における炭酸ガスレーザー照射が mitogen-activated protein kinase (MAPK) である extracellular signal-regulated kinase 1/2(ERK1/2) がリン酸化することから、細胞増殖が促進していることを報告している。また、塩崎ら^{8,9)}はラット脛骨に皮膚表面より炭酸ガスレーザーを照射し、皮質骨表面の骨形成を促進することを報告している。これらのことは炭酸ガスレーザーの、組織の治癒促進や再生療法への応用の可能性を示唆するものである。また、炭酸ガスレーザーに限らず他の低出力レーザー、超音波、電気、機械的牽引などさまざまなメカニカルフォースによる骨形成促進や細胞活性化が報告されている¹⁰⁻¹⁴⁾。このようにレーザーをメカニカルフォースの一つとしてとらえた場合、再生療法に非常に有効であると考えられる。しかし、その作用力が強すぎたり与える期間が長すぎ

たりすると、逆に骨吸収を誘導してしまう危険性もあることから、早急なメカニズムの解明が必要とされている。ここ数年、骨芽細胞がメカニカルフォースを直接感知し、骨形成のシグナルを送っていると言われていた¹⁵⁻¹⁷⁾が、最近では最初にメカニカルフォースを認識しているのは骨細胞であり、骨形成のシグナルを骨芽細胞に伝達しているのではないかと考えられている^{18,19)}。さらにメカニカルフォースにより、カノニカル Wnt/ β -catenin シグナル経路が刺激されるという報告もある^{20,21)}。しかし詳細なメカニズムは明らかになっていないのが現状である。そこで、本研究では炭酸ガスレーザーをメカニカルフォースの一つとしてとらえ、このメカニカルフォースを骨の細胞がどのように認識し、またどのようなメカニズムで骨代謝に影響するのかを調べることを目的とした。そのため本研究では骨細胞におけるカノニカル Wnt/ β -catenin 経路に深く関与する Lef-1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1) と sclerostin に注目し²⁰⁾、炭酸ガスレーザー照射によってこれらのシグナル因子が骨細胞においてどのような変化が生じるのかを調べた。本研究はメカニカルフォースとしての炭酸ガスレーザーによる骨再生のメカニズムを解明し、歯科領域だけにとどまらず、多くの医療分野において炭酸ガスレーザーの有用性を高めることを期待したものである。

材料および方法

1. 実験動物と切片作製

実験は奥羽大学動物実験規定に従って行った。8週齢の雌性SDラット(日本クレア)各群10匹を用い、エーテル麻酔下で無痛的に実験を行った。左右脛骨を観血的に露出させ、左側には炭酸ガスレーザー(オペレーター Lite:YOSHIDA, 東京)を照射した。照射条件は、出力3.0W、照射距離約5cm、Superpulse1 (SP1)、0.9sで4ショット(照射エネルギー約118.9J/cm²)行った。コントロール群として右側には歯科用ラウンドバーにて皮質骨を貫通させないように、直径1mm、深さ約0.5mmの骨欠損を作製した(図1)。その後、3、6時間後、3、5日後にエーテルにて屠殺後、脛骨

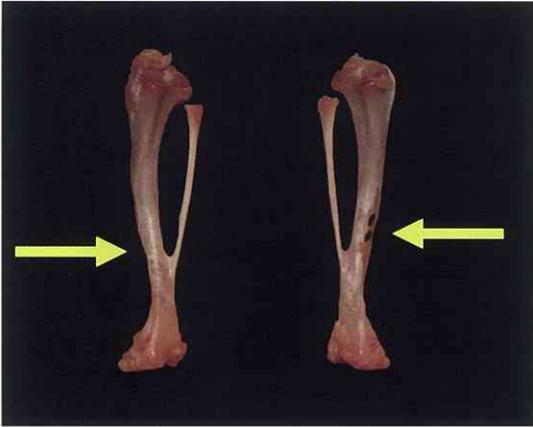


図1 ラット脛骨摘出直後の所見を示す。右側矢印部は炭酸ガスレーザー照射部位を示す。左側矢印部は歯科用ラウンドバーによる欠損部位を示す。

を摘出し、ただちに4℃、中性緩衝ホルマリンにて24時間固定後、10%EDTA (0.1mol Tris-HCl buffer, pH7.4) にて20日間の脱灰を行った。なお、脱灰液は2日ごとに交換した。エタノール脱水後パラフィンに包埋し、約4μmの連続切片を作製した。

2. 染色方法

一般染色としてヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色を適法に従って行った。免疫組織化学的染色は、キシレンにて脱パラフィンをしエタノール系列で親水後、3% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ活性阻害を行った。次いで10mmol/lリン酸緩衝食塩水(PBS, pH7.4)にて洗浄後10%正常ウサギ血清(Histofine kit, ニチレイ)にて切片を30分間前処理した後、一次抗体を反応させた。抗体はウサギ抗osteopontin (American Research Products, USA), ウサギ抗Lef-1 (Santa Cruz, USA), ウサギ抗sclerostin (abcam) 抗体を用いた。

3. リアルタイムPCR²²⁻²⁶⁾

レーザー照射とラウンドバーで骨欠損を形成した3日後の脛骨から、PBSによって骨髓細胞をflashoutして摘出し、タカラ社製のtotal RNA分離kit (RNA iso) を用いて指示に従ってtotal RNAを分離した。その後1μgのtotal RNAに対して、タカラ社製のRT-PCR kit を用いOligo

dTをプライマーとして逆転写してcDNAを作製した。作製したcDNA溶液から2μlを用いてSYBER Greenを用いたインターカレーター法によりリアルタイムPCRを行った。Smart Cycler IIを用いたPCRの反応は95℃ 5秒, 60℃ 20秒のシットル反応で行い、osteopontin mRNA発現量をβ-actin mRNAの発現量で補正した。なお用いたプライマーは以下の通りである。β-actin: Forward 5' tga cag gat gca gga gga ga 3', Reverse 5' tag agc cac caa tcc aca ca 3', osteopontin: Forward 5' ccc agg atg agg aca gtt cca 3', Reverse 5' aga acg gct tgt cct gct cag a 3'。

結 果

1. 炭酸ガスレーザー照射による新生骨形成

a. H-E染色

図2に示すように炭酸ガスレーザー照射後、3日目ではラウンドバーによるコントロール群(図2-a)と炭酸ガスレーザー照射群(図2-b)とでは大きな違いは見られないが、5日目にはレーザー照射部位の骨髓側に類骨様の新生骨の形成を認めた(図2-d 矢印部)。

b. 免疫組織化学的染色

5日目の組織では、ラウンドバーによるコントロール群(図3-a, b)の骨髓側にosteopontin陽性の細胞散在性が観察され、レーザー照射群(図3-c, d)では形成された新生骨の基質周囲に存在する細胞にosteopontinの発現が観察された。

c. リアルタイムPCR

図4に骨髓細胞でのosteopontin mRNAの発現量の結果を示す。ラウンドバーによるコントロール群と比較し、炭酸ガスレーザーを照射した群では、osteopontinのmRNA発現量が約1.8倍になっており、有意に促進していることがわかる(図4)。

2. 炭酸ガスレーザー照射による骨細胞の反応

レーザー照射が骨組織に与える影響を調べるために、骨組織に注目し、免疫組織化学染色によってLef-1とsclerostinの発現を調べた。

レーザー照射後3時間の骨組織のLef-1の染色結果を図5-a, b, c, dに示す。図5-a, bは照射部位に相当する骨細胞の結果で、骨細胞にLef-1の発

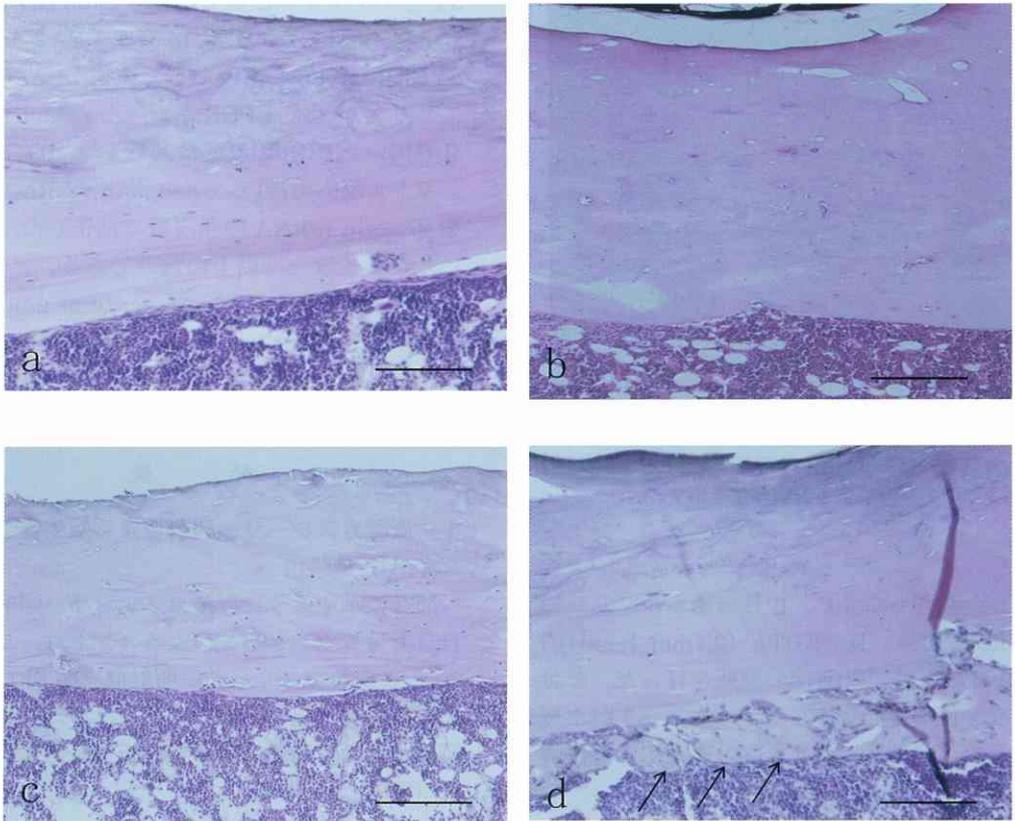


図2 ラット脛骨のH-E染色所見を示す。歯科用ラウンドバーによる骨欠損を与えたコントロール群の脛骨をaとcに示す。炭酸ガスレーザーを照射したレーザー照射群の脛骨をbとdに示す。実験開始後3日目(a, b)と5日目(c, d)を示し、5日目の脛骨ではコントロール群に比較してレーザー照射群では骨髄側に類骨様の骨形成が認められる(d矢印)。スケールバー:100 μ m。

現が認められる。しかし図5-c, dに示すように、同じ骨組織でもレーザー照射部位から離れて存在する骨細胞にはLef-1の発現は認められなかった。さらにレーザー照射後6時間の骨組織の骨細胞の染色結果を図5-e, fに示す。照射後3時間と同様に照射部位に存在する骨細胞にはLef-1の発現が認められ(矢印)、その発現は照射後3時間のものと比較して強くなっていることがわかる。しかし、興味あることに骨髄側に骨形成が見られる照射後5日目の骨細胞では照射部位であるにもかかわらずLef-1の発現が見られなくなった(図5-g, h)。これらに対してWntシグナルの抑制因子であるsclerostinの発現は、Lef-1の発現が強く見られた照射後6時間の骨細胞においてその発現が

全く認められず(図6-a, b)、Lef-1の発現が消失した照射後5日目の骨細胞ではsclerostinの発現が認められるようになった(図6c, d矢印)。

全ての免疫組織化学的染色について、陰性対照群は陽性反応が全く認められなかった(data not shown)。

考 察

骨の形状および構造は骨に加わる機械的応力によって支持され、それに適応するように形作られている(Wolffの法則)¹⁰⁾。この現象は組織・細胞レベルで加えられた応力刺激が骨の細胞、すなわち破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞およびそれらの前駆細胞などに作用し、吸収と形成のバランスを制

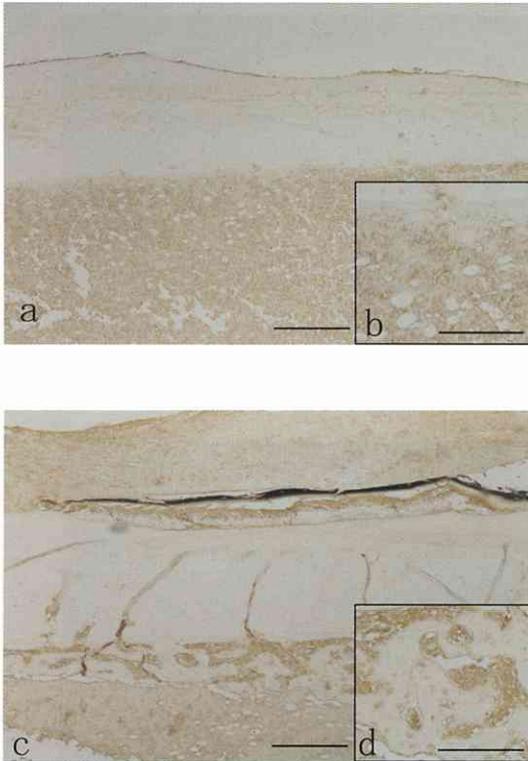


図3 抗osteopontin抗体を用いた免疫組織化学的染色結果を示す。上段のaとbは実験開始後5日目の歯科用ラウンドバーによるコントロール群を示す。骨髄側の拡大図(b)には抗osteopontin抗体陽性の骨髄細胞が散在していることがわかる。一方、下段のcとdにはレーザー照射後5日目の脛骨を示す。骨髄側には新生骨が認められ、その質質の周囲に存在する細胞に抗osteopontin抗体の局在が認められる(d)。スケールバー(a, c) : 200 μm , スケールバー(b, d) : 100 μm 。

御し、リモデリングを促し、最終的には骨の形状と構造を変化させると考えられている²⁷⁻²⁹⁾。最近、メカニカルフォースを骨に与えることにより骨形成を促進させるという報告が多く取り上げられている。田島⁷⁾は炭酸ガスレーザーを直接ラット脛骨に照射することにより、骨形成が促進することを示した。しかし、なぜメカニカルフォースとしてレーザーを照射することにより骨形成が促進されるのか、どのようなメカニズムで骨形成が促進されるのかは明らかになっていない。したがって、そのメカニズムの解明は歯科領域だけでなく、多

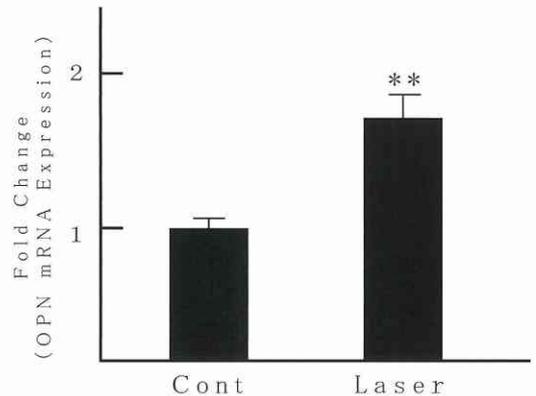


図4 リアルタイムPCRによって測定した骨髄細胞でのosteopontin mRNA発現量を示す。歯科用ラウンドバーで骨欠損を与えた後、3日目のコントロール群(Cont)の脛骨骨髄から分離したtotal RNAと、レーザー照射後3日目のレーザー照射群(Laser)の脛骨骨髄細胞から分離したtotal RNAにおけるosteopontin mRNAの発現量を比較した。結果は β -actinで補正した。Data are means \pm SD(n=6). Statistical significance was estimated by Student's *t*-test. $P^{**}<0.01$.

くの医療分野においても残された重要な課題である。

今回注目した炭酸ガスレーザーは、超音波、電気、機械的牽引と同様にメカニカルフォースを骨に与えるだけでなく、炭酸ガスレーザーに特徴的なLLLT作用での細胞活性も期待できる^{1-3, 6-9)}。これまでの炭酸ガスレーザーによる骨形成促進の報告では、骨形成の所見が見られたのはいずれも脛骨の骨髄側であった。そこで本研究では骨と骨髄との間になんらかのシグナル伝達があるのではないかと考えた。

実験では図2-c, dに示すように、レーザー照射後5日目でラウンドバーによるコントロール群には見られなかった骨形成が骨髄側に認められた。また、免疫組織化学的染色ではその新生骨の周囲に存在する骨髄細胞にosteopontinの発現が観察された(図3-c, d)。さらに、リアルタイムPCRによるosteopontin mRNAの発現はラウンドバーによるコントロール群と比較し、有意に高い発現を示した(図4)。Osteopontinはこれまでに骨組織に力を加えると早期に発現されるタンパ

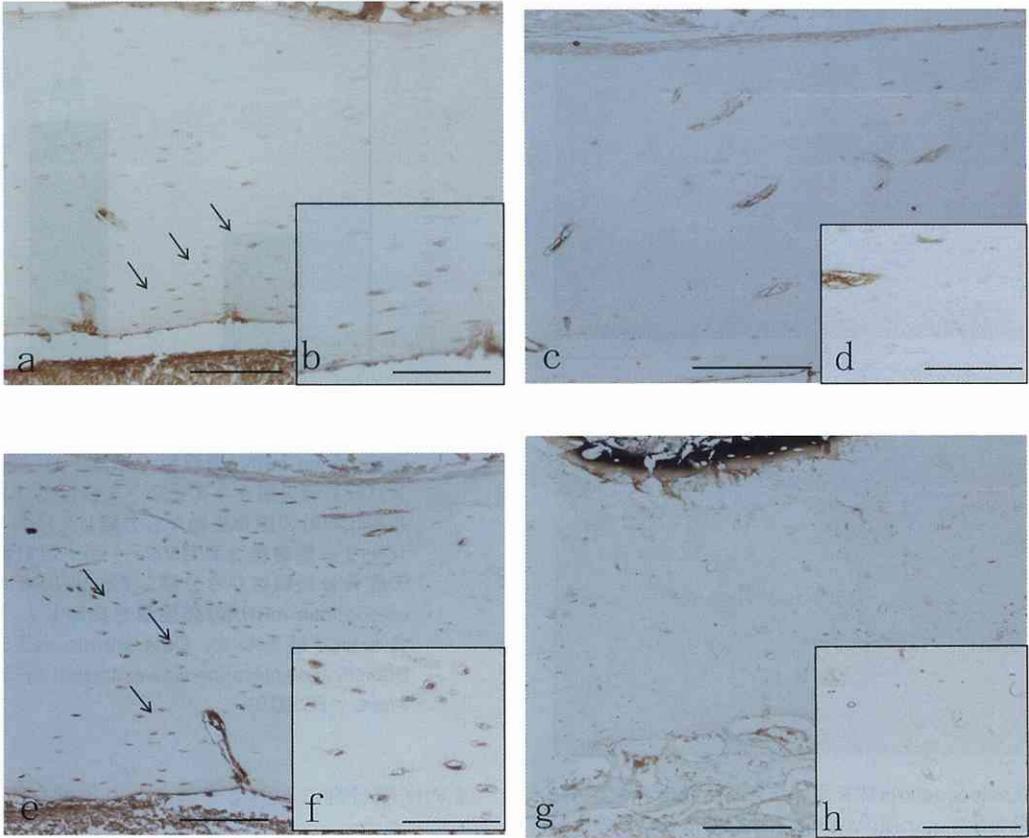


図5 レーザー照射後3時間の照射部位(a, b), 及び未照射部位(c, d), 6時間後のレーザー照射群(e, f), 5日目のレーザー照射群(g, h)の抗Lef-1抗体による免疫組織化学的染色所見を示す。炭酸ガスレーザー照射部位の骨細胞にはLef-1が発現しているのに対し(a矢印, b), 炭酸ガスレーザー未照射部位の骨細胞ではLef-1の発現がほとんど見られなかった(c, d)。さらに6時間後の所見では, レーザー照射部位の骨細胞でのLef-1の発現は3時間後と比較してさらに強くなっていた (e矢印, f)。一方, 5日目になるとレーザー照射部位で認められていたLef-1の発現は観察できない(g, h)。スケールバー (a, c, e, g) : 100 μ m, スケールバー (b, d, f, h) : 50 μ m。

ク質として知られており, メカニカルフォース反応タンパク質としてその作用が注目されている¹⁵⁻¹⁷⁾。

本実験の結果は田島の報告と一致しており, 炭酸ガスレーザー照射がメカニカルフォースとして骨髄側の骨髄細胞に何らかの影響を与え, 骨形成を誘導していると考えられる。しかし, それが直接作用しているのか, または他からシグナルを受け取っているだけなのかはまだ不明である。数年前までは, 骨芽細胞はメカニカルフォースに対する感受性が高く, 骨形成のシグナルを送っている, という報告があげられていた¹⁵⁻¹⁷⁾。しかし, 最近

では実際に骨の形態を変化させるのは骨芽細胞および破骨細胞であるが, メカニカルフォースを感知し, これらの役割を調節しているのは骨細胞であることが明らかになってきている^{18,30,31)}。

骨細胞は骨芽細胞あるいは骨細胞みずからが産生した骨基質中に埋め込まれた細胞であり, 骨基質中の骨小腔に存在している。Bonewald^{19,20)}は骨細胞の樹状突起が骨細管内部で体液が動くことにより生じる流体剪断応力を感知することにより, メカノセンサーとしての役割を担っていることを示唆している。横瀬らは^{1,2)} ラット骨組織に炭酸

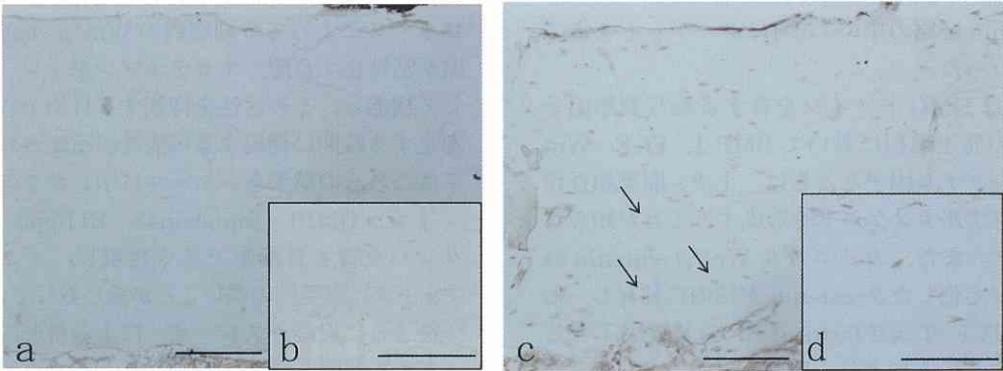


図6 レーザー照射後6時間(a, b)と5日目(c,d)の抗sclerostin抗体による脛骨の免疫組織化学的染色所見を示す。6時間後の所見ではsclerostinの発現は見られないが、5日目の所見ではsclerostinの発現が観察できる(c矢印)。スケールバー (a, c) : 100 μ m, スケールバー (b, d) : 50 μ m。

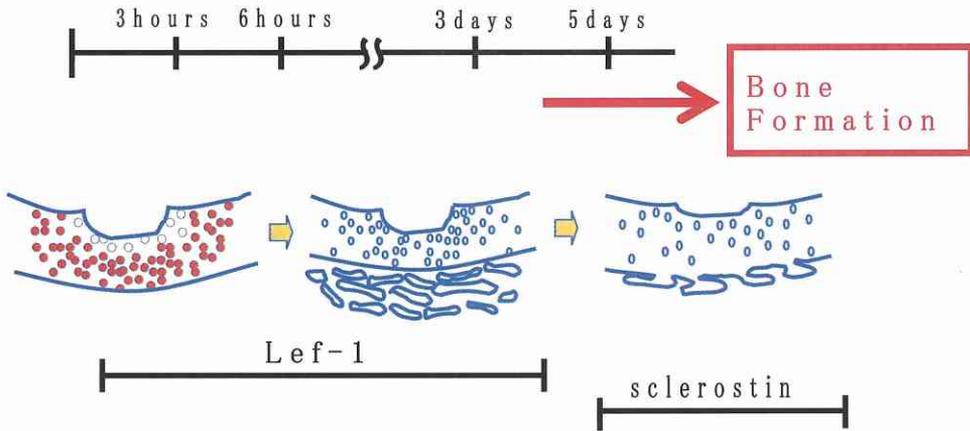


図7 レーザー照射直後から5日目まで、骨細胞におけるLef-1の発現の変化をシェーマに表す。レーザー照射部位直下の骨細胞は空腔変性が見られ、それより少し離れた部位の骨細胞にLef-1の発現が観察された。やがて5日目で新生骨の形成が安定するとその発現は見られなくなり、6時間後まで発現が見られなかった sclerostinの発現が観察される。

ガスレーザーを照射し骨組織を計測した結果、HLLT作用部位の骨細胞が空腔変性している部位の骨髄側には骨形成がなく、LLLT作用部位のvitalな骨細胞が存在する骨髄側には新生骨が多く誘導されていることを示した。これは骨髄側の新生骨形成は骨細胞の状態に密接に関係し、vitalな骨細胞が骨髄側の骨芽細胞にシグナルを送っている可能性が考えられる。

どのようなメカニズムで骨細胞が応力を感じずるのかは、流体剪断応力^{17,27,31)}以外にも数々の仮

説が提唱されている。接着斑を構成するインテグリンを介したメカニズムや^{19,31)}、さらに Jacobs³²⁻³⁴⁾からは骨細胞に存在する繊毛は非常にメカニカルフォースの感受性が強く、光、動きのセンサーとして流体応力を知覚し、それを細胞内に伝達していると述べている。最近の有力な説では、骨細胞がメカニカルフォースのシグナルを骨表面の細胞へ伝達するメカニズムとして、骨量や骨の細胞の機能の重要なレギュレーターである Wnt/ β -catenin シグナル経路が関係しているのではな

いかといわれている^{20,21)}。そこで本研究では Wnt/ β -catenin 経路の中の Lef-1 にターゲットをあて、実験を行った。

Lef-1 は HMG ドメインを有する転写調節因子で、歯の発生過程において BMP-1, FGF, Wnt などのシグナル因子とともに、上皮-間葉相互作用のシグナルカスケードを形成することが知られている³⁵⁾。また、カノニカル Wnt/ β -catenin 経路では安定化した β -catenin が核内に移行し、転写因子 TCF (T-cell factor)/LEF の共役因子として機能することにより、転写が活性化する³⁶⁾。今回の実験では、レーザー照射後 3 時間で照射部から少し離れた骨細胞に Lef-1 の発現が見られ (図 5-a, b)、6 時間後ではその発現は持続していた (図 5-e, f)。なお、レーザー未照射部位では Lef-1 の発現は見られなかった (図 5-c, d)。一方、新生骨形成が安定してくる 5 日目には Lef-1 の発現は消失していた (図 5-g, h)。このことから、新生骨形成の期間において、骨細胞に Lef-1 が発現したことから Wnt/ β -catenin 経路の活性化が示唆される。

さらに最近では、骨の細胞がメカニカルフォースによって刺激を受けると、sclerostin が多量に発現すると報告されており、メカニカルフォースと何らかの関係があるのではないかと、注目されている³⁷⁾。Sclerostin は SOST の遺伝子産物であり、sclerostin の欠乏は骨量増加が特徴的な硬化性骨症 sclerosteosis の原因となることが知られている。Sclerostin は初期の頭蓋の骨芽細胞分化で、Wnt7a の発現に続き、骨形成マーカーの osteocalcin と同時に骨芽細胞の遅いステージで発現すると証明されている³⁸⁾が、最近では sclerostin は骨芽細胞よりも骨細胞に大量に発現しており、LRP5 と結合することによって Wnt シグナルを抑制するという報告も多くあげられている^{39,40)}。さらに Robling ら^{41,42)} は Wnt/ β -catenin はメカニカルフォースによる新生骨形成のインシエーターであり、sclerostin はインヒビターであると提唱している。今回の実験でも図 6-a, b に示すように、6 時間後では sclerostin の発現は観察されなかったが、5 日目のレーザー照射部位の骨細胞に sclerostin の発現が見られた。これらのこ

とから考察すると、sclerostin はメカニカルフォースによって骨細胞内の Wnt/ β -catenin 経路が活性化する際、ネガティブレギュレーターとして機能し、その活性を抑制する目的で骨形成が安定する時期に発現する可能性が示唆される。図 7 はこれらの結果をシェーマに示したものである。

また、DMP1, connexin43, E11/gp38 などのタンパク質も骨細胞で多く発現し、メカニカルフォースに感受性の高いことが論じられている⁴³⁻⁴⁷⁾。今後さらに炭酸ガスレーザーによる骨形成のメカニズムを解明していく上で、これらのタンパク質も発現を調べる必要性がある。

結 論

今回の実験で、炭酸ガスレーザー照射によりラット脛骨骨髄側に骨形成が確認され、さらに照射部位での空胞変性していない vital な骨細胞に、骨形成が完了するまでの間 Lef-1 が発現していた。またその後 Lef-1 の発現が消えると、骨形成の比較的遅いステージで sclerostin の発現が見られた。このことから、炭酸ガスレーザーによるメカニカルフォースによって、骨基質中の骨細胞が活性化され、その他のメカニカルフォースと同様、骨細胞がそれを認識し、Wnt/ β -catenin 経路を刺激することにより、骨形成に関与することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたって、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部歯科保存学講座横瀬敏志教授に心からの謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力をいただいた教室員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は第 46 回奥羽大学歯学会 (平成 20 年 11 月 8 日 郡山市) において発表した。

文 献

- 1) 横瀬敏志, 中 貴弘, 大野 敬, 堀江 武: 歯科治療において炭酸ガスレーザーを安全で効率よく使用するために (1). 日本歯科評論 770; 133-138 2006.
- 2) 横瀬敏志, 中 貴弘, 大野 敬, 堀江 武: 歯科治療において炭酸ガスレーザーを安全で効率

- よく使用するために(2・完). 日本歯科評論 771; 151-158 2007.
- 3) 横瀬敏志, 門倉弘志, 柿坪秀具, 田島直人, 片山直, 堀江武: 炭酸ガスレーザーの細胞生物学的作用と細胞情報伝達の関係について. デンタルダイヤモンド 27; 149-155 2002.
 - 4) McKee, M. D.: Effects of CO₂ laser irradiation *in vivo* on rat alveolar bone and incisor enamel, dentin, and pulp. J. Dent. Res. 72; 1406-1417 1993.
 - 5) 五味一博, 八島章博, 白川哲, 金指幹元, 関根章子, 小林一行, 長野孝俊, 松井康太郎, 山口博康, 新井高: 高出力レーザーの低出力照射がラット骨髄細胞三次元培養の石灰化に及ぼす影響. 日レ歯誌 16; 10-15 2005.
 - 6) 田島直人, 横瀬敏志, 門倉弘志, 安達広太郎, 柿坪秀具, 松岡哲朗, 藤枝和夫, 長谷川彰彦, 片山直: ラット骨格筋細胞における MAPK の発現に及ぼす CO₂レーザーの影響について. 日歯保存誌 45; 583-590 2002.
 - 7) 田島直人: ラット脛骨組織の骨形成能に対する炭酸ガスレーザー照射の影響について. 日レ歯誌 14; 32-43 2003.
 - 8) 塩崎洋堂, 横瀬敏志, 斎藤正樹, 鈴木洋, 廣瀬直子, 清水秀之, 益田賢治, 長谷川彰彦, 片山直, 奥村泰彦: 炭酸ガスレーザー照射によるラット脛骨の骨形成促進に関する研究. 日レ歯誌 16; 23-30 2005.
 - 9) 塩崎洋堂: ラット骨組織における炭酸ガスレーザー照射の骨誘導作用についての形態学的研究. 日歯保存誌 49; 375-386 2006.
 - 10) 遠藤直人, 高橋栄明: 骨と電気刺激. The Bone 7; 49-53 1993.
 - 11) Ozawa, Y., Shimizu, N., Kariya, G. and Abiko, Y.: Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells. Bone 22; 347-354 1998.
 - 12) 伊藤博元: 骨・軟部組織に対するメカニカルフォース. J. Nippon Med. Sch. 69; 146-148 2002.
 - 13) Iwai, T., Harada, Y., Imura, K., Iwabuchi, S., Murai, J., Hiramatsu, K., Myoui, A., Yoshikawa, H. and Tsumaki, N.: Low-intensity pulsed ultrasound increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite ceramic. J. Bone Miner. Metab. 25; 392-399 2007.
 - 14) Lirani-Galvão, A. P., Jorgetti, V. and da Silva, O. L.: Comparative study of how low-level laser therapy and low-intensity pulsed ultrasound affect bone repair in rats. Photomed. Laser Surg. 24; 735-740 2006.
 - 15) 川島博行: メカニカルフォースにより誘導される骨芽細胞の分化と骨形成. Niigata Dent. J. 30; 173-182 2000.
 - 16) Harter, L. V., Hruska, K.A. and Duncan, R. L.: Human osteoblast-like cells respond to mechanical strain with increased bone matrix protein production independent of hormonal regulation. Endocrinology 136; 528-535 1995.
 - 17) Owan, I., Burr, D. B., Turner, C. H., Qiu, J., Tu, Y., Onyia, J.E. and Duncan, R.L.: Mechano-transduction in bone: Osteoblasts are more responsive to fluid forces than mechanical strain. Am. J. Physiol. 273; C810-815 1997.
 - 18) 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. 5; 464-475 2007.
 - 19) Bonewald, L. F.: Mechanosensation and transduction in osteocytes. Bonekey Osteovision 3; 7-15 2006.
 - 20) Bonewald, L. F. and Johnson, M. L.: Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. Bone 42; 606-615 2008.
 - 21) Pitters, E., Boudin, E. and Van Hul, W.: Wnt signaling: A win for bone. Arch. Biochem. Biophys. 473; 112-116 2008.
 - 22) Yokose, S., Kadokura, H., Tajima, N., Hasegawa, A., Sakagami, H., Fujieda, K. and Katayama, T.: Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells. Cell Tissue Res. 315; 375-384 2004.
 - 23) Ikeda, T., Nagai, Y., Yamaguchi, A., Yokose, S., and Yoshiki, S.: Age-related reduction in bone matrix protein mRNA expression in rat bone tissues: Application of histomorphometry to *in situ* hybridization. Bone 16; 17-23 1995.
 - 24) Ishizuya, T., Yokose, S., Hori, M., Noda, T., Suda, T., Yoshiki, S. and Yamaguchi, A.: Parathyroid hormone exerts disparate effects on osteoblast differentiation depending on exposure time in rat osteoblastic cells. J. Clin. Invest. 99; 2961-2970 1997.
 - 25) Yokose, S., Zhang, C., Gao, C., Murakami, M., Ohmura, Y., Matsuoka, T., Katayama, T. and Katayama, I.: Application of a rapid decalcification system to *in situ* hybridization for detecting osteocalcin mRNA in rat bone tissue. J. Meikai Univ. Sch. Dent. 25; 213-216 1996.
 - 26) Yokose, S., Ishizuya, T., Ikeda, T., Nakamura, T., Tsurukami, H., Kawasaki, K., Suda, T., Yoshiki, S. and Yamaguchi, A.: An estrogen deficiency caused by ovariectomy increases

- plasma levels of systemic factors that stimulate proliferation and differentiation of osteoblasts in rats. *Endocrinology* **137** ; 469-478 1996.
- 27) Duncan, R. L. and Turner, C. H. : Mechano-transduction and the functional response of bone to mechanical strain. *Calcif. Tissue Int.* **57** ; 344-358 1995.
- 28) Sims, N. A. and Gooi, J. H. : Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin. Cell Dev. Biol.* **19** ; 444-451 2008.
- 29) Robling, A. G., Castillo, A. B. and Turner, C. H. : Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **8** ; 455-498 2006.
- 30) You, L., Temiyasathit, S., Lee, P., Kim, C. H., Tummala, P., Yao, W., Kingery, W., Malone, A.M., Kwon, R.Y. and Jacobs, C.R. : Osteocytes as mechanosensors in the inhibition of bone resorption due to mechanical loading. *Bone* **42** ; 172-179 2008.
- 31) 上岡 寛, 山城 隆 : 骨細胞とメカニカルフォース, *Clinical Calcium* **18** ; 2008.
- 32) Malone, A. M., Anderson, C. T., Tummala, P., Kwon, R. Y., Johnston, T. R., Stearns, T. and Jacobs, C. R. : Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **104** ; 13325-13330 2007.
- 33) Malone, A. M., Anderson, C. T., Stearns, T. and Jacobs, C. R. : Primary cilia in bone. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **7** ; 301 2007.
- 34) Anderson, C. T., Castillo, A. B., Brugmann, S. A., Helms, J. A., Jacobs, C. R. and Stearns, T. : Primary cilia : Cellular sensors for the skeleton. *Anat. Rec. (Hoboken)* **291** ; 1074-1078 2008.
- 35) Sasaki, T., Ito, Y., Xu, X., Han, J., Bringas, P. Jr., Maeda, T., Slavkin, H. C., Grosschedl, R. and Chai, Y. : LEF1 is a critical epithelial survival factor during tooth morphogenesis. *Dev. Biol.* **278** ; 130-143 2005.
- 36) Asally, M. and Yoneda, Y. : β -catenin can act as a nuclear import receptor for its partner transcription factor, lymphocyte enhancer factor-1 (lef-1). *Exp. Cell Res.* **308** ; 357-363 2005.
- 37) Winkler, D. G., Sutherland, M. K., Geoghegan, J. C., Yu, C., Hayes, T., Skonier, J.E., Shpektor, D., Jonas, M., Kovacevich, B. R., Staehling-Hampton, K., Appleby, M., Brunkow, M. E. and Latham, J. A. : Osteocyte control of bone formation via sclerostin, a novel BMP antagonist. *EMBO J.* **22** ; 6267-6276 2003.
- 38) Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W. Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E. and Wu, D. : Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling; *J. Bio. Chem.* **280**, 19883-19887, 2005.
- 39) van Bezooijen, R. L., Roelen, B. A., Visser, A., van der Wee-Pals, L., de Wilt, E., Karperien, M., Hamersma, H., Papapoulos, S. E., ten Dijke, P. and Löwik, C. W. : Sclerostin is an osteocyte-expressed negative regulator of bone formation, but not a classical BMP antagonist. *J. Exp. Med.* **199** ; 805-814 2004.
- 40) ten Dijke, P., Krause, C., de Gorter, D. J., Löwik, C. W., and van Bezooijen, R. L. : Osteocyte-derived sclerostin inhibits bone formation : its role in bone morphogenetic protein and Wnt signaling. *J. Bone Joint Surg. Am.* **90** ; 31-35 2008.
- 41) Robling, A. G., Bellido, T. and Turner, C.H. : Mechanical stimulation *in vivo* reduces osteocyte expression of sclerostin. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **6** ; 354 2006.
- 42) Robling, A. G., Niziolek, P. J., Baldrige, L. A., Condon, K. W., Allen, M.R., Alam, I., Mantila, S. M., Gluhak-Heinrich, J., Bellido, T. M., Harris, S. E. and Turner, C. H. : Mechanical stimulation of bone *in vivo* reduces osteocyte expression of Sost/sclerostin. *J. Biol. Chem.* **283** ; 5866-5875 2008.
- 43) Yang, W., Lu, Y., Kalajzic, I., Guo, D. Harris, M. A., Gluhak-Heinrich, J., Kotha, S., Bonewald, L. F., Feng, J. Q., Rowe, D. W., Turner, C. H., Robling, A. G. and Harris, S. E. : Dentin matrix protein 1 gene cis-regulation : Use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading *in vitro* and *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **280** ; 20680-20690 2005.
- 44) Rios, H. F., Ye, L., Dusevich, V., Eick, D., Bonewald, L. F. and Feng, J. Q. : DMP1 is essential for osteocyte formation and function. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **5** ; 325-327 2005.
- 45) Harris, S.E., Gluhak-Heinrich, J., Harris, M.A., Yang, W., Bonewald, L. F., Riha, D., Rowe, P. S., Robling, A. G., Turner, C. H., Feng, J. Q., McKee, M. D. and Nicollela, D. : DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading *in vivo* : Theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* **7** ; 313-315 2007.
- 46) Siller-Jackson, A. J., Burra, S., Gu, S., Xia, X., Bonewald, L. F., Sprague, E. and Jiang, J. X. :

Adaptation of connexin 43-hemichannel prostaglandin release to mechanical loading. *J. Biol. Chem.* **283** ; 26374-26382 2008.

- 47) Zhang, K., Barragan-Adjemian, C., Ye, L., Kotha, S. Dallas, M., Lu, Y., Zhao, S., Harris, M., Harris, S. E., Feng, J. Q. and Bonewald, L. F. : E11/gp38 selective expression in osteocytes: regulation by mechanical strain and role in dendrite elongation. *Mol. Cell Biol.* **26** ;

4539-4552 2006.

著者への連絡先：大河内瑠夏, (〒963-8611) 郡山市富田町
字三角堂31-1 奥羽大学歯学部歯科保存学講座(保存修復学)
Reprint requests : Ruka Ohkouchi, Division of Operative
Dentistry, Department Conservative Dentistry, Ohu
University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan