

## ラット頭蓋骨を用いた骨細胞の分離培養法の確立

佐藤真理子

### Establishment and Characterization of Culture System for Enzymatically Released Osteocytes from Rat Calvaria

Mariko SATOH

Osteocytes account for 90% of bone cells and are embedded in mineralized bone matrix. It has been demonstrated that osteocytes can be mechnosensors of bone tissue and they control bone metabolism responding to mechanical stress, but the detailed mechanisms of osteocytes are unknown. Although culture systems must be established to analyze osteocyte functions, few studies regarding osteocyte culture systems have been reported. The purpose of this study was to establish a culture system of osteocyte isolated from new born rat calvaria, and to examine the phenotypes of the cells as osteocyte-like cells. The bone tissues were dipped in 70% ethanol, and then sequentially treated with collagenase and EDTA solutions to isolate osteocytes. The isolated cells demonstrated a dendritic process and were ALP-negative in enzyme-histochemical staining, while they were strongly stained with antibodies of sclerostin and DMP-1. Real-time PCR reactions revealed that a small amount of ALP and type I collagen mRNAs were expressed in the isolated cells as compared with osteoblast-like cells, but sclerostin and DMP-1 mRNA were more highly expressed in isolated cells than osteoblast-like cells. The levels of osteopontin and PTH/PTHrP receptor mRNAs expression in the isolated cells were essentially the same as in osteoblast-like cells. These results indicate that the isolated cells express osteocyte phenotypes and that this culture system can be applied for the analysis of osteocyte functions.

Key words : rat, calvaria, osteocytes, culture system

#### 緒 言

骨組織を形成している細胞の種類には骨を形成する骨芽細胞、骨組織を吸収する破骨細胞、そして骨基質に埋入されている骨細胞がある。骨細胞の数はこれら全体の細胞数の90-95%を占め、これに対して骨芽細胞が4-6%、破骨細胞が1-2%といわれている<sup>1)</sup>。この骨細胞は石灰化した骨基

質中にある25-300 $\mu$ の骨小腔の中に存在し、さらには細胞突起を互いに接合させ骨表面の骨芽細胞や基質内の骨細胞同士で結合し、骨組織の中で細胞同士のネットワークを形成している<sup>1,2)</sup>。この骨細胞の主な機能としてメカニカルストレスを感じ、このネットワークを利用して骨表面の骨芽細胞や骨髄の細胞にシグナルを送り、骨形成や骨吸収をコントロールしていると考えられてきた<sup>3)</sup>。

受付：平成24年9月29日，受理：平成24年10月31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 Restorative Dentistry, Ohu University  
Graduate School of Dentistry  
(Director : Prof. Satoshi YOKOSE)

近年, transgenic mouse を用いて骨細胞を選択的に壊死させると, 尾懸垂によって不動化した時にみられる骨吸収促進による骨粗鬆症が発症しないこと<sup>4)</sup>や, マウス頭蓋骨の骨細胞にアポトーシスを誘導させると, 骨の形成が亢進して厚みが増加することを報告している<sup>5)</sup>。これらの事実はメカノセンサーとして骨細胞が機能して, 骨形成と吸収をコントロールしていることを示すものである。さらに, 主に骨細胞が分泌する因子として, Sclerostin<sup>6)</sup>, dentin matrix proteyiein-1 (DMP-1)<sup>7)</sup>, fibroblast growth factor 23 (FGF23)<sup>8)</sup>, matrix extracellular phosphoglycoprotein (MEPE), Phex<sup>9)</sup>, Wnt<sup>10)</sup>, E11/gp38<sup>11)</sup>, CD44<sup>12)</sup>等が同定されており, 骨形成や骨吸収をコントロールしていることが確認されている。しかしながら骨細胞のキャラクターや機能についてはいまだ多く不明な点が多く残されており, 特にメカノセンサーとしての骨細胞の機能についてはほとんど解析されていないのが現状である。この原因として骨細胞の培養系の確立の困難さがあげられる。石灰化基質に囲まれた骨細胞の機能を研究するうえで *in vivo* の探索に加えて *in vitro* の探索が必要になる。特に細胞突起の結合状態や各種蛋白質の分泌などは *in vitro* の解析が必須である。しかし, 石灰化基質に取り囲まれた骨細胞を分離培養するのは困難であり, さらに骨細胞はすでに分化成熟した細胞であることも困難さに拍車をかける原因である。

これまでに骨細胞の培養系の確立にはいくつかの方法が報告されており, その多くは chicken calvaria から酵素法にて分離する方法である<sup>13,14)</sup>。しかしラットやマウスを用いた骨細胞分離培養はほとんど見られないのが現状である。さらに細胞株としての骨細胞はわずかに Bonwald ら<sup>15)</sup>が報告しているのに過ぎない。実際骨細胞の機能を調べる上で, 実験動物としてラットやマウスが多く使用されている。そこで, 本研究の目的はラット骨組織を用いて, 骨細胞の機能分析に応用できる細胞培養系を確立することにある。そのためにラット頭蓋骨から酵素分離法を応用して骨細胞を分離し, 骨芽細胞と比較検討して培養系骨細胞としての性状を調べ, 今後の骨代謝研究に骨細胞用

Table 1 Procedure for the isolation of primary osteocytes from rat calvaria

Step Procedure
1. 5日齢のラットの頭蓋骨を摘出し, PBS に浸漬しながら軟組織と骨膜を除去する。
2. 骨表面の細胞を死滅させるために70%エタノールに15秒間浸漬する。
3. PBS に浸漬し骨表面の死滅層を除去する。
4. 頭蓋骨の骨縫合部を除去し, 骨片を PBS でよく洗う (3回)。
5. 骨片を細切して collagenase 溶液に浸漬し, 37°C で20分間振盪する。これを4回繰り返す。(fraction1-4)
6. 各回の上澄を回収し, rpm で5分間遠沈する。ペレットを細胞培養用の培養液に解く。
7. 骨片を0.1%のBSAと5mMのEDTAを含むPBS溶液に浸漬し37°Cで20分間振盪する。Step6を繰り返す。(fraction5)
8. 骨片を collagenase 溶液に浸漬し37°Cで20分間振盪する。Step6を繰り返す。(fraction6)
9. 骨片を0.1%のBSAと5mMのEDTAを含むPBS溶液に浸漬し37°Cで20分間振盪する。Step6を繰り返す。(fraction7)
10. 骨片を collagenase 溶液に浸漬し37°Cで20分間振盪する。Step6を繰り返す。(fraction8)

細胞として応用可能であるかを検討した。

## 材料と方法

### 1. 細胞分離法

実験は奥羽大学動物実験規定に従って行った。生後5日目の Sprague-Dawley ラット 8匹を使用した。エーテル麻酔後, 70%エチルアルコールにて消毒後, リン酸緩衝生理食塩水 (pH 7.2 PBS) にて洗浄後, 頭蓋骨を無菌的に摘出した。これらの頭蓋骨を Table 1に示す手順で酵素処理を行い, 骨細胞を分離した。使用した酵素液は 0.1% collagenase (type A, 和光純薬, 大阪) を 70mM NaCl, 10mM NaHCO<sub>3</sub>, 60mM sorbitol, 30mM KCl, 3mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mg/ml bovine serum albumin (BSA), 5mg/ml glucose を含む 25 mM HEPES 緩衝液 (pH7.4) にて溶解した。脱灰溶液として 0.1% BSA を含む 5 mM の EDTA (和光純薬) 溶液を PBS に溶解して使用した。

### 2. 細胞培養

使用した細胞は骨細胞が多く含まれると考えら

れる fraction5-8を使用した。回収した細胞を6穴プレート (Becton, Dickinson and Company, USA) に $1.5 \times 10^5$ 個の細胞濃度で播種し, 10% calf serum, 100  $\mu$ g/ml ペニシリン G, 100IU/ml ストレプトマイシンを含む  $\alpha$  MEM を用いて 5%CO<sub>2</sub>, 37°C で細胞培養した。培地の交換は48時間ごとに行い6日間の培養を行って実験に使用した。

なお, 比較検討するために, 骨芽細胞が比較的多く含まれる fraction1-2の細胞を使用した。

### 3. Alkaline phosphatase 染色

10% 中性緩衝ホルマリン液で培養細胞を10分間室温にて固定し, その後0.1M Tris 緩衝液で細胞を洗浄し, naphthol AS-MX phosphate (Sigma, USA), fast blue BB salt (Sigma, USA) を用いて室温にて20分間反応させた。その後, 蒸留水で細胞を洗浄し検鏡した。

### 4. 免疫組織化学染色

培養6日目の細胞を10% 中性緩衝ホルマリンにて10分間室温にて固定し, その後70%のエタノール処理を30分間室温にて行った。PBSにて3回洗浄して, 10%の正常ウサギ血清 (Histofine kit, ニチレイ) にてブロッキングを室温で30分間行った。その後一次抗体 (ヤギ抗 Sclerostin 抗体, ヤギ抗 DMP-1抗体, Santa Cruz, USA) を室温にて30分間反応させた。次いでPBSで3回洗浄し, ビオチン標識二次抗体 (抗ヤギ IgG 抗体, Histofine kit) を室温にて10分間反応させた。再度, PBSにて3回洗浄してから, ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Histofine kit) を10分間室温にて反応させた。発色は DAB (0.005% diaminobenzidine tetrahydrochloride, Histofine kit) を用いて行った。陰性コントロールとして一次抗体を省略して染色を行った。

また, 陽性コントロールとして抗 sclerostin 抗体を用いた免疫染色を脱灰したラット脛骨 (SD ラット, 雌, 10週齢) のパラフィン切片上で行った。

### 5. Real-time quantitative PCR

各 Well の細胞から total RNA を, EasyPrep RNA kit (タカラバイオ, 大阪) により抽出し, RNase free DNase I (タカラバイオ) にて30分間 37°C で処理した。その後 RT-PCR kit (タカラバ

イオ) を用いて逆転写酵素とランダムプライマーにて1  $\mu$ g の total RNA から cDNA を作成した。20ng total RNA に相当する cDNA を real time PCR に用いた。SYBER Green Premix (タカラバイオ) 溶液 25.0  $\mu$ l に2.5pmol のプライマーを用いて反応させた。SYBER Green PCR の蛍光検出は, Smart Cycler System (タカラバイオ) にて行った。PCR 反応は95°C 5秒間, 60°C 25秒間の two-step method にて40サイクル行った。使用した各プライマーは Table 2 に示した。各プライマーに対する cDNA の定量を行い,  $\beta$ -actin に対する cDNA 量で補正した。また, PCR 産物は融解曲線の分析によって, 単一産物であることを確認した。

### 6. 統計処理

グラフの結果は平均値±標準偏差 (SD) で示した。2群間の値の有意差検定は Mann-Whitney U-test により行った。P < 0.05 にて有意差を検定した。

## 結 果

### 1. Alkaline phosphatase 染色

培養6日目の培養細胞を Fig. 1 に示す。細胞の中には細胞突起を伸ばした骨細胞様の細胞が確認できる (→)。さらにこれらの細胞に対して ALP 染色を行うと, 染色性を全く示さない細胞と, 青く染色される細胞 (⇒) が混在していたが, 細胞数は明らかに染色性を示さない細胞数が多かった。

### 2. 抗 Sclerostin, DMP-1 抗体の局在

Fig. 2 にはラット脛骨 (a, b) と培養6日目の培養細胞 (c) に対する抗 Sclerostin 抗体の局在を示す。ラット脛骨の脱灰切片では, 骨基質の中に存在する骨細胞が Sclerostin を発現していることが分かる (b, →)。骨細胞以外の細胞には Sclerostin の発現は認められない。一方, 培養細胞 (c) での抗 Sclerostin 抗体の局在は, 細胞突起をもつ細胞にその局在が認められ (→), 細胞内に顆粒状に反応が認められる。

Fig. 3 には培養細胞の DMP-1 の発現を示す。細胞突起を有する細胞の細胞質の中に顆粒状の抗 DMP-1 抗体の陽性反応が確認できる (→)。なお, 一次抗体を省略した陰性コントロール染色では非

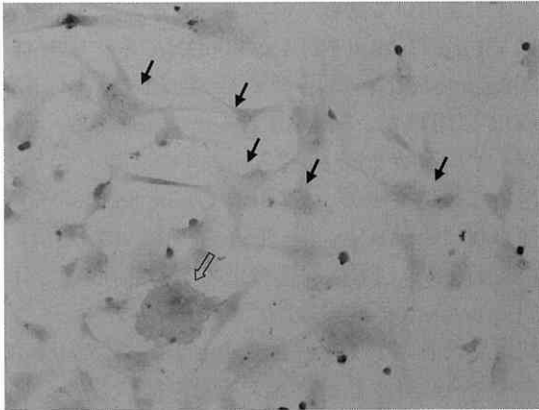


Fig. 1 培養6日目の細胞を示す。多くの細胞は細胞突起を有し(⇒), ALP染色陰性である。ALP染色陽性の細胞(⇨)もみられる。x40

特異的な反応はみられなかった(写真無)。

### 3. ALP, Type I collagen mRNA 発現

Fig.4には骨芽細胞と培養6日目の培養細胞でのALP, Type I collagen mRNA のReal Time PCRの結果を示す。一般に骨芽細胞の特異的な発現マーカーとされているALPとType I collagenの発現は、骨芽細胞に比較して培養細胞では極端に低い値を示した。

### 4. Sclerostin, DMP-1のmRNA発現

Fig. 5にSclerostin, DMP-1のmRNA発現のReal Time PCRの結果を示す。これらの発現は骨芽細胞に比較して培養6日目の培養細胞に多く発現していることが確認できる。

### 5. Osteopontin, PTH/PTHrP receptorのmRNA発現

Fig. 6にOsteocalcin, Osteopontin, PTH/PTHrP receptorのmRNA発現のReal Time PCRの結果を示す。これらの発現はこれまでのものと異なり骨芽細胞と培養細胞の発現様式には差がみられなかった。

## 考 察

骨細胞は石灰化骨基質に囲まれた特殊な環境に存在する細胞である。これまでに骨細胞の栄養補給はハバース管やフォルクマン管に存在する血管から溶出する組織液から供給されるといわれており、これらの組織液の動きを誘導するのが運動で

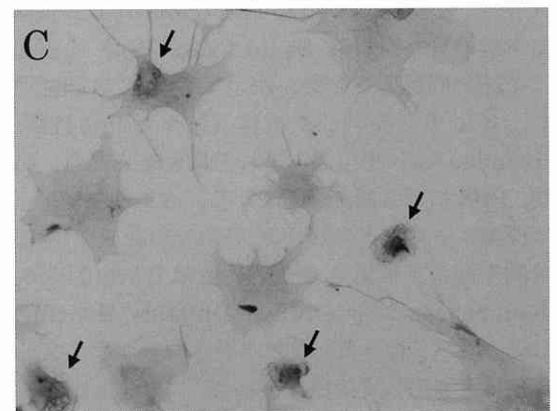
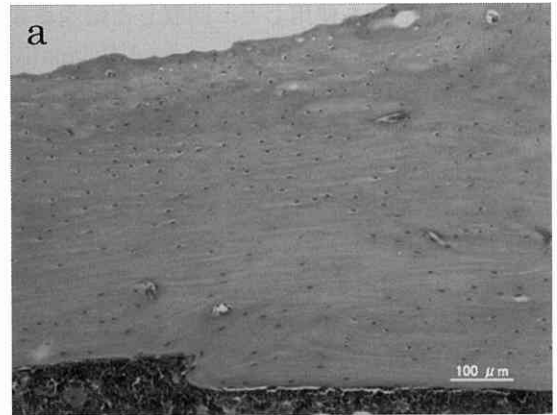


Fig. 2 ラットの脛骨の連続脱灰切片をa, bに示す。H-E染色(a)と抗sclerostin抗体の局在(b)を示す。骨細胞に抗体の局在(⇒)がみられる。cに培養6日目の細胞における抗sclerostin抗体の局在を示す。細胞突起を有する細胞の細胞内に顆粒状の抗体の局在がみられる(⇒)。x20 (a, b), x40 (c)

ある<sup>16)</sup>。したがって骨細胞は骨組織に加わるmechanical stressを感知し、骨代謝をコントロールすることが骨細胞の重要な機能の一つであるこ

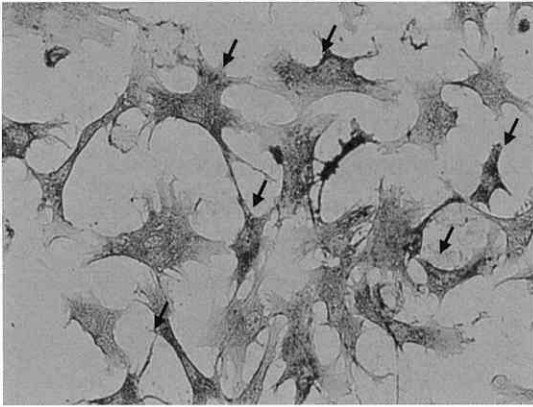


Fig. 3 培養6日目の細胞における抗DMP-1抗体の局在を示す。突起を有する細胞の細胞内に顆粒状の抗DMP-1抗体の局在がみられる(➡)。x40

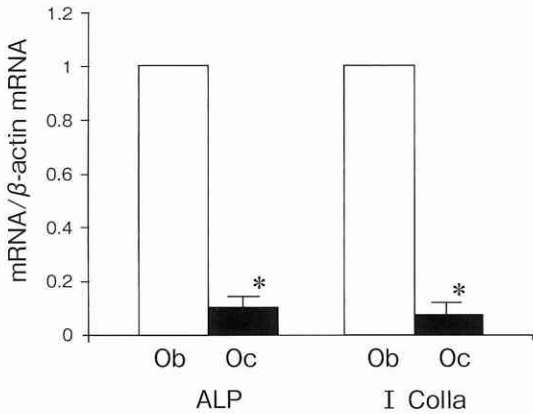


Fig. 4 骨芽細胞(Ob)と培養6日目の細胞(Oc)におけるALPとtype I collagen mRNAの発現量をβ actinで補正した値の比較を示す。Bur: means ±SD (Six cultures). \*P<0.05 ObとOcの比較。

とが指摘されている<sup>17,18)</sup>。これらの骨細胞の機能解析には *in vitro* の実験が有用であるが、骨細胞そのものが分化した細胞であることや石灰化基質に囲まれた環境であることから、成熟した骨組織からの骨細胞の分離は現在のところ報告されていない。細胞株の樹立も多くはなされていないことから、骨細胞の培養系は初代培養系を使用することが必須になる。本実験でも、ラットの頭蓋骨から骨細胞を酵素法と脱灰法の併用により分離する方法を採用し、骨細胞の性格が確認できる生後5日目のラットを用いることにより、効率よく分化した骨細胞を分離できると考えた。そしてこの培養系が骨細胞として十分な性格を有するかを検討

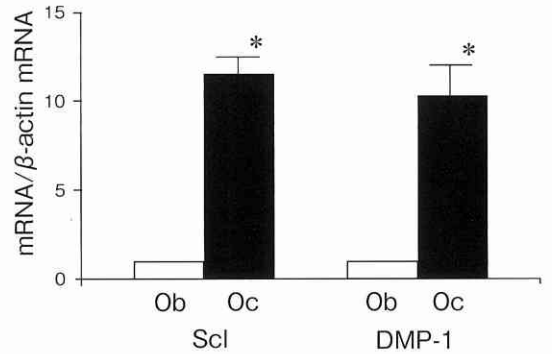


Fig. 5 骨芽細胞(Ob)と培養6日目の細胞(Oc)における sclerostin(Scl)とDMP-1 mRNAの発現量をβ actinで補正した値の比較を示す。Bur: means ±SD (Six cultures). \*P<0.05 ObとOcの比較。

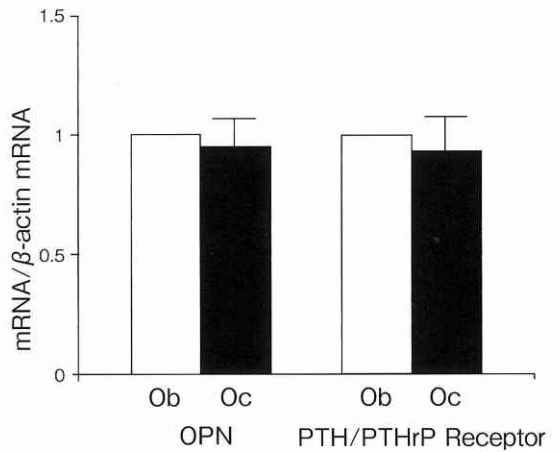


Fig. 6 骨芽細胞(Ob)と培養6日目の細胞(Oc)における osteopontin(OPN)とPTH/PTHrP receptor mRNAの発現量をβ actinで補正した値の比較を示す。Bur: means ±SD (Six cultures).

することに重点を置いた。

今回の方法では、摘出した頭蓋骨から注意深く膜性の結合組織を除去し、さらに周囲に存在する細胞を除去するために70%のエタノールに15秒間浸漬した。この方法はGuら<sup>19)</sup>の推奨する方法であり、彼らはラットの大腿骨を使用しているが、頭蓋骨にも十分応用可能であると考えた。さらに酵素液と脱灰液を交互に繰り返す方法により、骨細胞を分離してゆくが fraction1-4までは全体の細胞の60%以上が骨芽細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞や骨髄細胞であり、骨細胞が比較的少ない fraction であることから今回の実験からは除

Table 2 Primers for Real Time PCR

Primer	Forward sequence (5' to 3')	Reverse sequence (5' to 3')
Alkaline phosphatase	ATGTCAACCGAAACGCCTCAG	ATGGCGGAGTCGAAACATGGCA
Type 1 collagen	GTGGTAACGATGGTGCTGTC	CTTACCCTTAGCACCAGC
Sclerostin	GAGAAACAACCAGACCATGAAC	GCTCGCGGCAGCTGTACT
DMP-1	CGGCTGGTGGTCTCTCTAAG	CTGGACTGTGTGGTGTCTGC
Osteopontin	AGACCATGCAGAGAGCGAG	ACGTCTGCTTGTGTGCTGG
PTH/PTHrP receptor	GGGCACAAGAAGTGGATCAT	GGCCTAGAAGACGGTGTAGT
$\beta$ -actin	CTTTCTACAATGAGCTGCGTG	ATGGCTGGGGTGTGAAGG

外し、実験には骨細胞が70%以上含まれると考えられる fractio5-8を使用した<sup>19)</sup>。しかしながらこの fraction を使用したとしても骨芽細胞や骨髄系の細胞、線維芽細胞等の他の細胞の population も含まれていることは初代培養系としての特徴と考える。

本培養系を骨細胞の実験に使用するためには、構成する細胞の中心的な population が細胞であることを確認するために、骨芽細胞と比較検討した。培養細胞の形態は突起を有する細胞や円形の細胞が混在するが、ALP 染色の結果から突起を伸ばしている細胞の多くは染色性が陰性であった。骨細胞の起源は骨芽細胞であるが、骨基質に埋入されて骨細胞としての機能を有すると ALP の発現は次第に減弱して行くことが報告されている<sup>20)</sup>。培養骨芽細胞と本培養細胞の ALP mRNA 発現を比較すると明らかに本培養細胞での ALP mRNA 発現が低いことから、多くの細胞が ALP の発現を示さないことが確認できた。これと同様に骨芽細胞が合成分泌する代表的な蛋白質である Type I collagen は骨細胞に分化するにしたがって徐々に発現はみられなくなる<sup>21)</sup>。本培養細胞においても骨芽細胞の Type I collagen mRNA の発現に比較して低い値を示している。

一方、骨細胞が特異的に合成分泌する蛋白質としてあげられる代表的なものに Sclerostin と DMP-1がある<sup>6,7,22,23)</sup>。Sost 遺伝子の一つである Sclerostin は Wnt シグナルのアンタゴニストとして見出され、Lrp5/6の活性化を阻害することによって骨芽細胞での骨形成能を抑制する因子であることが報告されている<sup>6,24)</sup>。この Sclerostin が

骨細胞に特異的に発現することが明確になってから、骨細胞が骨芽細胞の骨形成能をコントロールしている機能が明確となった<sup>1,6)</sup>。一方、DMP-1は骨細胞以外にも象牙芽細胞<sup>25)</sup>や成熟後半の骨芽細胞にも発現することが知られている<sup>26)</sup>。しかし、その発現量は骨細胞に最も多く発現しており、特に骨芽細胞から骨細胞に分化した若い細胞に多く発現され、C-末端の蛋白質が骨細胞の機能維持に重要な役割を果たしていることが最近明らかとなった<sup>27)</sup>。このように本培養系の細胞の多くは骨細胞に特徴的な蛋白質を遺伝子レベルで多く発現し、また、骨芽細胞に特徴的な蛋白質の発現が極端に少ないという特徴が確認された。これらの事実は本培養系に存在する細胞の population には骨細胞の特徴を有する細胞が多く含まれていることを示唆するものである。

さらに、骨細胞と骨芽細胞に共通して発現することが知られている osteopontin と PTH/PTHrP receptor の発現について調べた。Osteopontin は RDG 配列を持つ骨基質蛋白質として石灰化に関与することが知られているが、骨組織において骨芽細胞と骨組織の両方にその発現がみられ<sup>28)</sup>、特に骨細胞においてはメカニカルストレスによってその発現が亢進し、さらには単核の破骨細胞前駆細胞に作用し、破骨細胞形成を促進し<sup>29)</sup>、骨代謝をコントロールしている。一方、PTH/PTHrP receptor は骨芽細胞<sup>30)</sup>と骨細胞<sup>8)</sup>の両方に存在が確認されている。PTH の作用として骨芽細胞を通して、骨形成の促進と吸収促進の相反作用を有することが知られているが、特に骨細胞においてはリガンドである PTH/PTHrP の投与によって

FGF23の発現が亢進することが *in vitro*, *in vivo* において見出された<sup>8)</sup>。これにより骨細胞は骨芽細胞と別機構で腎臓でのリン代謝を調節していることが明確となった。本培養細胞においても osteopontin, PTH/PTTrP receptor の発現は、骨芽細胞と同様に発現していることを確認した。しかし、本培養細胞が骨細胞としてメカニカルストレスや PTH の作用により osteopontin や FGF23 の発現が亢進されるかは今回確認していないため、今後その確認は必要と考える。

### 結 論

以上、本培養系の細胞と骨芽細胞の表現型について比較検討してきたが、培養細胞の特徴として骨細胞にきわめて類似しており、骨細胞様細胞として捉え、今後骨細胞の生理的な機能解析において本培養系が有用であることが示された。

### 文 献

- 1) Bonewald, L. F. : The amazing osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **26** ; 229-238 2011.
- 2) Menton, D. N. : From bone lining cell to osteocyte—an SEM study. *Anat. Rec.* **209** ; 29-39 1984.
- 3) Bonewald, L. F. : Mechanosensation and transduction in osteocytes. *Bonekey Osteovision.* **3** ; 7-15 2006.
- 4) Tatsumi, S., Ishii, K., Amizuka, N., Li, M., Kobayashi, T., Kohno, K., Ito, M., Takeshita, S. and Ikeda, K. : Target ablation of osteocytes induces osteoporosis with defective mechanotransduction. *Cell Metab.* **5** ; 464-475 2007.
- 5) Zhao, W., Byrne, M. H., Wang, Y. and Krans, S. M. : Osteocyte and osteoblast apoptosis and excessive bone deposition accompany failure of collagenase cleavage of collagen. *J. Clin. Invest.* **106** ; 941-949 2000.
- 6) Robling, A. G., Niziolek, P. J., Baldrige, L. A., Condon, K. W., Allen, M. R., Alam, I., Mantila, S.M., Gluhank-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.
- 7) Toyosawa, S., Shintani, S., Fujiwara, T., Sato, A., Ijuhin, N. and Komori, T. : Dentin matrix protein 1 is predominantly expressed in chicken and rat osteocytes but not in osteoblasts. *J. Bone Miner. Res.* **16** ; 2017-2026 2001.
- 8) Rhee, Y., Bivi, N., Farrow, E., Lezcano, V., Plotkin, L. I., White, K. E. and Bellido, T. : Parathyroid hormone receptor signaling in osteocytes increases the expression of fibroblast growth factor-23 *in vitro* and *in vivo*. *Bone.* **49** ; 636-643 2011 .
- 9) Kulkarni, R. N., Bakker, A. D., Everts, V. and Klein-Nulend, J. : Inhibition of osteoclastogenesis by mechanically loaded osteocyte : involvement of MEPE. *Calcif. Tissue Int.* **87** ; 461-468 2010.
- 10) Bonewald, L. F. and Johnson, M. L. : Osteocytes, mechanosensing and Wnt signaling. *Bone.* **42** ; 606-615 2008.
- 11) 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.
- 12) Hughes, D. E., Salter, D. M. and Simpson, R. : CD44 expression in human bone : A novel maker of osteocyte differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **9** ; 39-44 1994.
- 13) Van der Plas, A. and Nijweide, P. J. : Isolation and purification of osteocyte. *J. Bone Miner. Res.* **7** ; 389-396 1992.
- 14) Tanaka, K., Matsuo, T., Ohta, M., Sato, T., Tezuka, K., Nijweide, P. J., Katoh, Y., Haketa, Y. and Kumegawa, M. : Time-lapse microcinematography of osteoblast. *Miner. Electrololyte Metab.* **21** ; 189-192 1995.
- 15) Bonewald, L. F. : Establishment and characterization of an osteocyte-like cell line, MLO-Y4. *J. Bone Miner. Res.* **17** ; 61-65 1999.
- 16) Cowin, S. C., Moss-Salentijn, L. and Moss, M. L. : Candidates for the mechanosensory system in bone. *J. Biomech. Eng.* **113** ; 191-197 1991.
- 17) Hille, E., Schulitz, K. P., Gipperich, J. and Dettmann, B. : Experimental stress-induced changes in growing long bone. *Int. Ortho.* **12** ; 309-315 1988.
- 18) Skerry, T. M., Bitensky, L., Chayen, J. and Lanyon, L. E. : Early strain-related changes in enzyme activity in osteocytes following bone loading *in vivo*. *J. Bone Miner. Res.* **4** ; 783-788 1989.
- 19) Gu, G., Nars, M., Hentunen, T. A., Metsikkö, K. and Väänänen, H. K. : Isolation primary osteocytes express functional gap junctions *in vivo*. *Cell Tissue Res.* **323** ; 263-273 2006.

- 20) Van der Plas, A., Aarden, E., M. Feijen, J. H., de Boer, A. H., Wiltink, A., Alblas, M. J., de Leij, L. and Nijweide, P. J. : Characteristics and properties of osteocytes in culture. *J. Bone Miner. Res.* **9** ; 1697-1704 1994.
- 21) Scheven B. A., Hamilton, N. J., Farquharson, C., Rucklidge, G. J. and Robins, S. P. : Immunohistochemical localization of native and denatured collagen types I and II in fetal and adult rat long bone. *Bone.* **9** ; 407-414 1988.
- 22) Van Bezooijen, R. L., Roelen, B. V., 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.
- 23) Weidauer, S. E., Schmieder, P., Beerbaum, M., Schmitz, W., Oschkinat, H. and Mueller, T. D. : NMR structure of the Wnt modulator proteon sclerostin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380** ; 160-165 2009.
- 24) 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. Biol. Chem.* **280** ; 19883-19887 2005.
- 25) Yokose, S., Kadokura, H., Tajima, Y., Fujieda, K., Katayama, I., Matsuoka, T. and Katayama, T. : Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif. Tissue Int.* **66** ; 139-144 2000.
- 26) Kalajzic, I., Braut, A., Guo, D., Jiang, X., Kronenberg, M. S., Mina, M., Harris, M. A., Harris, S. E. and Rowe, D. W. : Dentin matrix protein 1 expression during osteoblastic differentiation, generation of an osteocyte GFP-transgene. *Bone* **35** ; 74-82 2004.
- 27) Lu, Y., Yuan, B., Qin, C., Cao, Z., Xie, Y., Dallas, S. L., Makee, M. D., Drezner, M. K., Bonewald, L. F. and Feng, J. Q. : The biological function of DMP-1 in osteocyte maturation is mediated by its 57-kDa C-terminal fragment. *J. Bone Miner. Res.* **26** ; 331-340 2011.
- 28) Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S. R. , Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., Denhardt, D. T. and Noda M. : Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture *in vivo*. *J. Bone Miner. Res.* **18** ; 1706-1715 2003.
- 29) Terai, K., Takano-Yamamoto, T., Ohba, Y., Higura, K., Sugimoto, M., Sato, M., Kawahata, H., Inaguma, N., Kitamura, Y. and Nomura, S. : Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *J. Bone Miner. Res.* **14** ; 839-849 1999.
- 30) 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.

著者への連絡先：佐藤真理子，(〒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  
 Reprint requests : Mariko SATOH, Department of Conservative Dentistry, Ohu University School of Dentistry  
 31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan