

培養環境pHがおよぼす骨芽細胞の サイトカイン産生についての研究

黒田 栄子¹ 廣瀬 公治² 佐藤 直生¹ 福井 和徳¹

Effects of Culture Environment pH on Osteoblast Cytokine Production

Eiko KURODA¹, Kimiharu HIROSE², Naoki SATOH¹ and Kazunori FUKUI¹

The aim of the present study was to investigate the effects of the stress factor cell culture pH on osteoblast cytokine production using human osteoblast-like osteosarcoma cells (SaOS2).

After initial culture at pH 7.0 of a monolayer of SaOS2 in Dulbecco's Modified Essential Medium buffered with 50mM-HEPES, pH was adjusted to 7.8 and culture was continued. After a fixed period, total RNA was collected from the SaOS2 and reverse transcription was performed. Messenger RNA expression of the osteotropic cytokines, transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and interleukin-11 (IL-11), was analyzed using real-time polymerase chain reaction with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as an internal control. TGF- β 1 yield in SaOS2 cell culture supernatant was determined using ELISA.

SaOS2 production of TGF- β 1 transiently increased as cell culture pH increased and production of IL-11, a bone resorption promoter, was simultaneously induced. Promotion of IL-11 production was inhibited by anti-TGF- β 1 antibodies.

These findings indicate that pH stress on osteoblasts may affect bone remodeling and that a mildly alkaline environment promotes osteoblast production of TGF- β 1, which plays an important role in bone metabolism. Auto-feedback is also indicated, comprising promotion of IL-11 production through the autocrine system.

Key words : SaOS2, TGF- β 1, IL-11

緒 言

矯正歯科治療では装置装着により口腔内の環境が大きく変化し、歯肉炎などの歯周疾患の発症が認められる。Bickel¹⁾によると歯周疾患局所においては、その環境 pH がアルカリ性に推移すること

が示されている。細胞における環境 pH の変化は環境ストレス要因のひとつであることが知られている²⁾。一方、歯周組織を構成する主要な細胞である骨芽細胞に対する環境ストレスへの応答、とりわけメカニカルストレスに対する骨芽細胞の応答に関する検討が幅広くなされている。そのひとつに、メ

受付：平成24年10月6日，受理：平成24年10月31日
奥羽大学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野¹
奥羽大学歯学部口腔衛生学講座²
(指導：福井和徳教授)

Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics,
Department of Oral Growth and Development, Ohu
University School of Dentistry¹
Department of Preventive Dentistry, Ohu University
School of Dentistry²
(Director : Prof. Kazunori FUKUI)

カニカルストレスによる骨芽細胞からのサイトカインの産生誘導がある。特に, Neidlinger-Wilke³⁾は培養骨芽細胞に対しメカニカルストレスを与えることで同細胞からの TGF- β の産生が誘導されることを示している。しかしながら, 炎症反応において変化する歯周局所の環境 pH がおよぼす骨芽細胞への影響についての検討は未だ少ない。

骨芽細胞は多くのサイトカインを産生し, オートクリンあるいはパラクリンの系を介し骨代謝に重要な役割を果たしている⁴⁾。そのうち TGF- β 1 は骨形成に促進的に作用することが示されている⁵⁾。一方, IL-11 は骨吸収を促進するサイトカインとして知られている^{6,7)}。さらに, TGF- β 1 は有力な IL-11 産生促進因子であることが報告されている⁸⁾。しかしながら環境ストレス要因のひとつである pH が及ぼす骨芽細胞からのサイトカイン, とりわけ TGF- β の産生に与える影響についての検討は未だなされていない。そこで, 本研究ではヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞を用いストレスの要因のひとつである培養環境 pH の影響について検討した。

材料と方法

1. 試 薬

Fetal Bovine Serum(FBS, SIGMA, St. Louis, MO, USA), Tris-EDTA buffer (TE, 和光純薬, 大阪, 日本), Dulbecco's modified Eagle's medium (D-MEM, SIGMA), PBS-Tween buffer(PBS-T, 日水製薬, 東京, 日本), Anti-TGF- β 1 Antibody (R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA), Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC, SIGMA) を用いた。

2. 培養細胞

細胞はヒト骨芽細胞様骨肉腫細胞 SaOS2 を用いた。SaOS2 は直径 60mm のプラスチックシャーレ (IWAKI, 東京, 日本) を用い, 10% FBS 添加 D-MEM にて通法に従い培養した。単層を形成した SaOS2 は, pH7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8 に調整した 1% FBS 添加 50mM-HEPES 緩衝 D-MEM に培地を置換し, 所定の時間培養後, SaOS2 細胞から total RNA を回収した。

3. アルカリフォスファターゼ活性 (ALP 活性)

ALP 活性の測定は, 各培養環境 pH にて 24 時

間培養を行った SaOS2 細胞を生理食塩水で 2 回洗浄後, 0.2% Nonidet P-40 を用い細胞を回収した。回収した細胞は, 超音波破砕した後 ALP 活性測定の資料とした。ALP 活性は p-Nitrophenylphosphate を基質とした Lowry⁹⁾ の方法に従い測定した。すなわち, 1mM の MgCl₂ を含む 0.7M 2-Amino-2-methyl-1-propanol (pH10.2) を基質緩衝液とし, 各細胞から回収した試料と 4 分間 37°C にて反応を行った。ALP 活性は p-Nitrophenylphosphate 1nmol を 1 分間に分解する酵素活性を 1 ユニットとした。また, ALP 活性測定試料中のタンパク量は Bradford¹⁰⁾ の方法に従った。

4. SaOS2 における DNA 合成能

各培養環境 pH における SaOS2 の DNA 合成能は [³H]thymidine の取り込み能により求めた。SaOS2 を, 24 穴カルチャープレートに移植し単層を形成するまで培養を行った。単層を形成した SaOS2 は, 各種 pH に調整した培地に置換し 24 時間培養を継続した。培養終了 3 時間前に 1 穴あたり 18.5KBq の [³H]thymidine を添加した。標識された細胞は 0.2% SDS にて溶解することで回収し, その放射活性を液体シンチレーションカウンター (LSC500, Aloka, 東京, 日本) にて測定した。

5. RNA 回収と real time PCR

SaOS2 からの total RNA はフェノール法にて回収した。同 RNA を ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO, 大阪, 日本) を用い逆転写を行った。逆転写により得られた cDNA は TGF- β 1 と IL-11 をターゲットとした real time PCR を行った。同 PCR は SYBR[®] Green Real time PCR Master Mix-Plus- (TOYOBO, 大阪, 日本) を用い, 95°C 60 秒, 95°C 15 秒, 60°C 15 秒, 72°C 45 秒の増幅過程を Applied Biosystems 7500 system (Applied Biosystems by Life Technologies, 東京, 日本) にて 40 サイクル行った。尚, インターナルコントロールは G3PDH を用いた。各プライマーのシークエンスを表 1 に示す。real time PCR に用いたプライマーは ABI Primer Express によりゲノム DNA 由来の増幅が起こらないように設計を行った。PCR 産物は, 融解曲線の分析によって, 単一ターゲット産物であることにより

表1 real time PCR に用いた各種プライマーの塩基配列

	Primer sequence
Real-time PCR TGF-β1	Forward : TTAGCGCCCACTGCTCCTGTGACA
	Reverse : TGAGAAGCAGGAAAGGCCGGTTCA
IL-11	Forward : GGCATGGTGGCTCACGCCTGTAAT
	Reverse : CCGGTCTCGAACTCTGGACTTCAGTGAT
G3PDH	Forward : TGGCATTGCCCTCAACGACCACTT
	Reverse : CCACCCTGTTGCTGTAGCCAATTCG

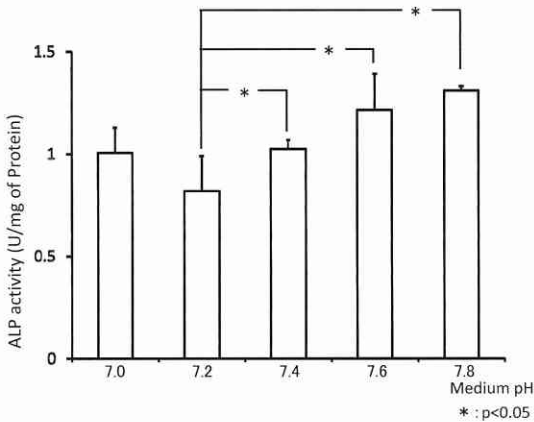


図1 培養環境pHにおけるSaOS2のALP活性
SaOS2は、培養環境pHをpH7.0からpH 7.8になるよう調整した培地で24時間培養した後、ALP活性を測定した。グラフは平均値±SDを表している。

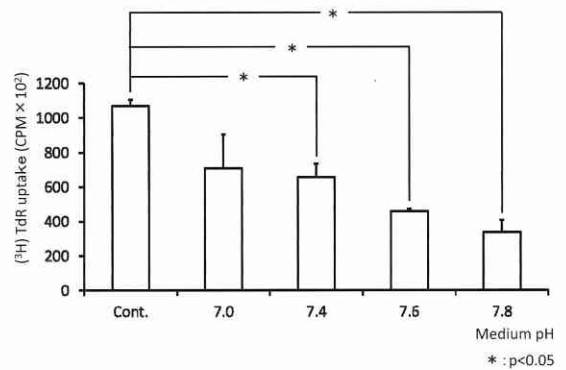


図2 培養環境pHのSaOS2のDNA合成能
SaOS2は、培養環境pHを7.0から7.8になるよう調整した培地で、24時間培養した後、DNA合成能を[3H]thymidineの取り込み能から検討した。グラフは平均値±SDを表している。

確認した。

6. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

SaOS2の培養上清中における TGF-β1産生量は ELISA (Quantikine® Human TGF-β1 : R&D Systems, Inc, Minneapolis, MN, USA) により定量した。すなわち、200 μL の培養上清に1N HCLを40 μL 加え酸処理を行いその後、1.2N NaOH/0.5M HEPES を40 μL 添加し中和したものを測定試料とした。同試料は96穴のELISA プレートに添加し抗体を反応させた後、発色させることで試料中の TGF-β1濃度を計測した。

7. 統計処理

有意差検定には、Mann-Whitney U-test を行い、有意水準5%で統計学的有意差があると判定した。

結 果

1. 培養環境 pH が及ぼす SaOS2 の ALP 活性と DNA 合成能

まずはじめに、SaOS2細胞の培養環境 pH を上昇させた時のアルカリフォスファターゼ活性について検討した。その結果、培養環境 pH の上昇とともに、アルカリフォスファターゼ活性が上昇した (図1)。次に、同一条件における DNA 合成能を [3H]thymidine の取り込み能から検討した。その結果、培養環境 pH が上昇するにつれて、DNA 合成能が低下した (図2)。

2. 培養環境 pH の変化による TGF-β1 の産生

培養環境 pH の変化による SaOS2からの TGF-β1産生の経時的变化を real time PCR と ELISA で検討を行った。その結果、各培養時間のコントロールを1とした時の pH7.6と pH7.8に

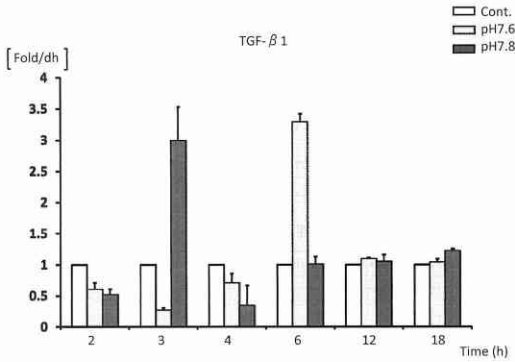


図3 TGF-β1-mRNAの産生

SaOS2は、pH7.6, pH7.8の培地で2~18時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しTGF-β1をターゲットとしたreal time PCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

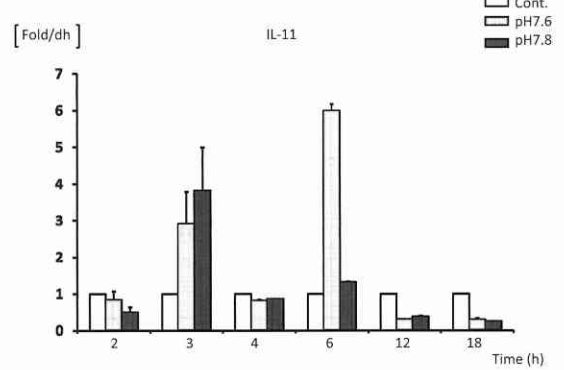


図5 IL-11-mRNAの産生

SaOS2は、pH7.6, pH7.8の培地で2~18時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しIL-11をターゲットとしたreal time PCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

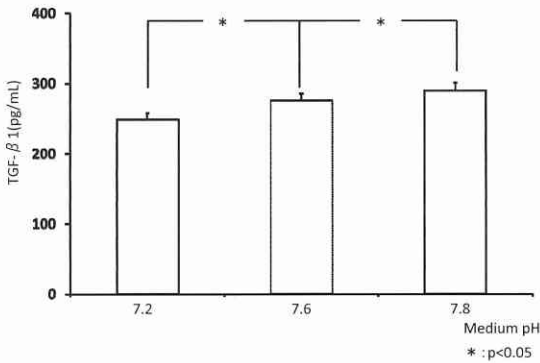


図4 培養上清中のTGF-β1量

SaOS2は、pH7.2, pH7.6, pH7.8の培地で3時間培養を行った。培養上清中のTGF-β1産生量をELISAにより定量した。グラフは平均値±SDを表している。

おける mRNA 発現比において、培養3時間ではpH7.8で3.0倍、6時間ではpH7.6で3.6倍のTGF-β1のmRNAの発現が強く促進された(図3)。また同様にSaOS2の培養上清中のTGF-β1の産生も有意に増加した(図4)。

3. 培養環境pHの変化によるIL-11mRNAの発現

培養環境pHの変化によるSaOS2からのIL-11mRNAの発現の経時的変化をreal time PCRで検討を行った。その結果、TGF-β1と同様pH7.6とpH7.8におけるmRNA発現比において、培養3時間ではpH7.8で3.8倍、6時間ではpH7.6

で5.9倍のIL-11のmRNAの発現が促進された(図5)。

4. 抗TGF-β1抗体が及ぼすSaOS2からのIL-11の産生抑制

TGF-β1はIL-11の有力なインデューサーであることが知られている。そこで、培養環境pHの変化により産生されたTGF-β1が同細胞からのIL-11の産生に参与するかを抗ヒトTGF-β1抗体を用いて検討した。その結果、抗体添加群において有意にIL-11mRNAの発現抑制が認められた(図6)。

5. PDTCによるTGF-β1のmRNA発現阻害

細胞外ストレスのひとつである培養環境pHの変化によるシグナルトランスダクションを解析する一端としてNFκB阻害剤であるPDTCを用い検討した。その結果、培養環境pH7.6において、その濃度依存的にTGF-β1mRNAの発現は有意に抑制された(図7)。

考 察

矯正歯科治療による装置装着後に歯肉炎などの歯周疾患の発症が認められることが知られている。すなわち矯正装置装着は口腔内環境に変化をもたらす、寄生体のみならず宿主に対しても様々な影響を与えている可能性が考えられる。一方、歯周疾患局所においては、歯周病の進行によりアルカ

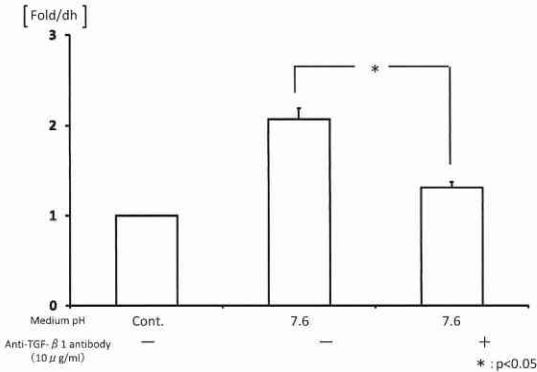


図6 Anti-TGF-β1 antibodyがおよぼすIL-11mRNA発現への影響

SaOS2を、pH7.6の培地にAnti-TGF-β1 antibodyを添加し6時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しTGF-β1をターゲットとしたreal time PCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

けるこれら pH の変化が及ぼす影響を検索した報告は未だ少ない。

骨芽細胞から産生されるサイトカインは、骨芽細胞自身あるいは破骨細胞に対しオートクリンあるいはパラクリンの系を介し骨代謝に重要な役割を果たしている。そのうち TGF-β1は骨形成に促進的に作用することが示されている⁵⁾。これとは反対に、骨吸収を促進するサイトカインとして IL-11があることが知られている^{6,7)}。この TGF-β1と IL-11の持つ骨代謝に対する作用は、それぞれ反対方向にあるものであるが、近年、TGF-β1が歯周組織構成細胞における有力な IL-11産生促進因子であることが報告されている⁸⁾。よって、培養環境 pH の変化による骨芽細胞の機能的役割を考えるために TGF-β1と IL-11に着目し検索を行った。

骨芽細胞の機能の基本的な指標として ALP 活性測定と DNA 合成能測定がある¹³⁾。そこで、培養環境 pH の変化に伴うこれら指標の動態を検討した。その結果、培養環境 pH の上昇に依存的に ALP 活性は上昇しこれとは対照的に DNA 合成能は抑制された。このことから、培養環境をアルカリ性に移行させることは骨芽細胞を分化させることが示された。

TGF-βは骨代謝に重要な役割を果たすサイトカインとして知られている¹⁴⁾。そして、TGF-βは様々な細胞から産生され¹⁵⁾、骨基質^{16, 17)}に豊富に存在することが報告されている。一方、TGF-β1は骨芽細胞を分化誘導するサイトカインのひとつとして挙げられる⁵⁾。そこで、培養環境 pH の変化による骨芽細胞の分化誘導に TGF-β1が関与している可能性が考えられた。よって、培養環境 pH の変化に伴う SaOS2からの TGF-β1産生について検討した。

その結果、real time PCR における mRNA の解析では、培養環境 pH の上昇に伴い TGF-β1の mRNA の発現が強く促進された (図3)。

さらには、培養上清中の TGF-β1の産生量も有意に増加していることを ELISA より確認した (図4)。動物実験における骨折治癒モデルの報告では、治癒が促進される過程で骨芽細胞からの TGF-βの発現が検出される^{18,19)}。また、骨膜下に

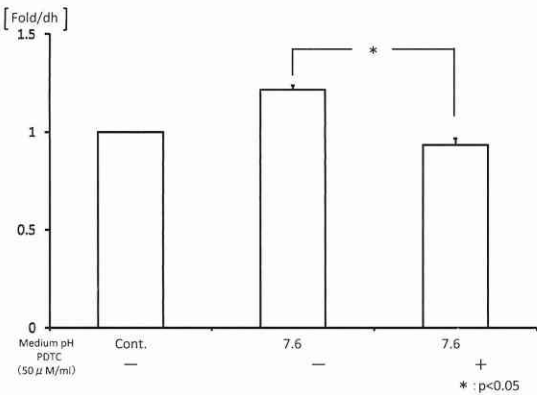


図7 PDTCがおよぼすTGF-β1mRNA発現への影響

SaOS2を、pH7.6の培地にPDTCを添加し1時間培養を行った。培養終了後RNAを回収しTGF-β1をターゲットとしたreal time PCRを行った。グラフは平均値±SDを表している。

りに推移することが示されている¹⁾。口腔内は様々な環境要因に支配されており¹¹⁾、歯周組織も様々な環境ストレスに曝露されていると考える。pHの変化もそのひとつであり、歯周組織構成細胞に対し様々な影響を与えている可能性が示されている²⁾。そして、細胞外 pHの変動は細胞に対し Na⁺/H⁺ 交換輸送系の活性化をもたらす様々な影響を与えていると考えられている¹²⁾。しかし、骨改造に重要な役割を果たしている骨芽細胞にお

TGF- β を投与することで化骨形成を誘導することも報告されている¹⁹⁾。すなわち、骨芽細胞においてその環境が弱アルカリ側に維持されることは、骨形成を促進する可能性が示唆される。

IL-11は、骨吸収に関与するサイトカインとして知られている²⁰⁾。また、IL-11は骨芽細胞から産生されることが示されている^{21,22)}。さらには、IL-11が破骨細胞の形成を促進し骨形成を抑制する機能をもつことも明らかにされている^{23,24)}。一方、歯周組織構成細胞からのIL-11産生は骨代謝に重要なサイトカインであるTGF- β 、IL-1 α などにより促進されることが報告されている^{8,25)}。特に、Yashiro⁸⁾らはTGF- β がヒト歯根膜細胞からのIL-11の産生をTGF- β 1が誘導することを見出している。そこで、SaOS2における培養環境pHの上昇に伴い産生されたTGF- β 1がオートクリンの系を介しIL-11の産生を促進する可能性が考えられた。SaOS2の培養環境pHを上昇させるとTGF- β 1 mRNAの発現促進に従い、IL-11 mRNAの発現が促進された(図5)。さらに、このIL-11 mRNA発現促進が培養環境pHの上昇に伴い産生されたTGF- β 1(図4)によるものかを確認するため、抗TGF- β 1抗体を用いた検索を行った。その結果、抗TGF- β 1抗体添加群で有意にIL-11の産生が抑制された。このことは、骨芽細胞において、自身が産生したTGF- β 1の作用を相殺するためにオートクリンの系を介しIL-11の産生を誘導するというネガティブフィードバックの存在が強く示唆される。

SaOS2における培養環境pHの変化によるTGF- β 1の産生促進機構を解析する一端として、転写因子であるNF- κ Bの関与について、PDTCを用いた阻害実験を行った。その結果、NF- κ B活性阻害剤であるPDTCは、培養環境pHの上昇によるTGF- β 1の産生を抑制した(図7)。このことは、細胞外ストレスによるサイトカインの産生はNF- κ Bに依存的に誘導されることを示唆する。事実、様々な刺激はNF- κ Bを活性化し炎症反応を誘導することが知られている²⁶⁾。また、NF- κ BはTGF- β 1産生における重要なメディエーターである²⁷⁾。さらに、興味あることにIL-11はNF- κ Bの活性を減弱させることが明ら

かとなっている²⁸⁾。すなわち、培養環境pHの変化により活性化されたNF- κ BのシグナルはTGF- β 産生促進に働くもののそのオートクリンの結果産生されたIL-11がNF- κ Bの活性を抑制するというネガティブフィードバックの系が遺伝子レベルにおいても存在することを強く示唆する。

結 論

培養環境pHの上昇は、SaOS2におけるTGF- β 1とIL-11のmRNAの発現を促進した。さらに、SaOS2の産生したTGF- β 1はオートクリンの系を介しIL-11の産生を亢進した。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を遂行するにあたりご協力をいただきました本学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野ならびに本学歯学部口腔衛生学講座の諸先生方に深く感謝いたします。

本論文の要旨は、第52回奥羽大学歯学会(平成23年11月12日 郡山市)において発表した。

文 献

- 1) Bickel, M. and Cimasoni, G. : The pH of human crevicular fluid measured by a new microanalytical technique. *J. Periodntal Res.* **20** ; 35-40 1985.
- 2) Refee, P., Theriot, M. E., Nelson, V. M., Heidemann, J., Kanaa, Y., Horowitz, S. A., Rogaczewski, A., Johnson, C. P., Ali, I., Shaker, R. and Binion, D. G. : Human esophageal microvascular endothelial cells respond to acidic pH stress by PI3K/AKT and p38 MAPK-regulated induction of Hsp70 and Hsp27. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291** ; 931-945 2006.
- 3) Neidlinger-Wilke, C., Stalla, I., Claes, L., Brand, R., Hollen, I., Rubenacker, S., Adam, M. and Kinzl, L. : Human osteoblasts from younger normal and osteoporotic donors show differences in proliferation and TGF beta-release in response to cyclic strain. *J. Biomech.* **28** ; 1411-1418 1995.
- 4) Hanazawa, S., Amano, S., Nakada, K., Ohmori, Y., Miyoshi, T., Hirose, K. and Kitano, S. : Biological Characterization of Interleukin-1-like Cytokine Produced by Cultured Bone Cells from Newborn Mouse Calvaria. *Calcif. Tissue Int.* **41** ; 31-37 1987.

- 5) Noda, M. and Rodan, G. A. : Type beta transforming growth factor (TGF beta) regulation of alkaline phosphatase expression and other phenotype-related mRNAs in osteoblastic rat osteosarcoma cells. *J. Cell Physiol.* **133** ; 426-437 1987.
- 6) Elias, J. A., Tanq, W. and Horowitz, M. C. : Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma interleukin-11 production. *Endocrinology* **136** ; 489-498 1995.
- 7) Kodama, Y., Takeuchi, Y., Suzawa, M., Fukumoto, S., Murayama, H., Yamato, H., Fujita, T., Kurokawa, T. and Matsumoto, T. : Reduced expression of interleukin-11 in bone marrow stromal cells of senescence-accelerated mice (SAMP6) : Relationship to osteopenia with enhanced adipogenesis. *J. Bone Miner. Res.* **13** ; 1370-1377 1998.
- 8) Yashiro, R., Nagasawa, T., Kiji, M., Hormdee, D., Kobayashi, H., Koshy, G., Nitta, H. and Ishikawa, I. : Transforming growth factor- β stimulates Interleukin-11 production by human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J. Clin. Periodontol.* **33** ; 165-171 2006.
- 9) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Wu, M.L., Hixon, Ws. and Crawford, E. J. : The quantitative histochemistry of brain. II. Enzyme measurements. *J. Biol. Chem.* **207** ; 19-37 1954.
- 10) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **7** ; 248-254 1976.
- 11) 松本 勝 : 妊産婦の口腔環境変化に関する疫学的研究. *口腔衛生会誌* **47** ; 51-60 1997.
- 12) Seifter, J. L. and Aronson, P. S. : Properties and physiologic roles of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. *J. Clin. Invest.* **78** ; 859-864 1986.
- 13) Hanazawa, S., Ohmori, Y., Amano, S., Hirose, K., Miyoshi, T., Kumegawa, M. and Kitano, S. : Human purified interleukin-1 inhibits DNA synthesis and cell growth of osteoblastic cell line (MC3T3-E1), but enhances alkaline phosphatase activity in the cells. *FEBS Lett.* **203** ; 279-284 1986.
- 14) Noda, M. and Camilliere, J. J. : *In vivo* stimulation of bone formation by transforming growth factor-beta. *Endocrinology.* **124** ; 2991-2994 1989
- 15) Wahl, S. M., Costa, G. L., Mizel, D. E., Allen, J. B., Skaleric, U. and Mangan, D. F. : Role of transforming growth factor beta in the pathophysiology of chronic inflammation. *J. Periodontol.* **64** ; 450-455 1993.
- 16) Assonian, R. K. and Sporn, M. B. : Type beta transforming growth factor in human platelets : release during platelet degranulation and action on vascular smooth muscle cells. *J. Cell Biol.* **102** ; 1217-1223 1986.
- 17) Seyedin, S. M., Thompson, A. Y., Bents, H., Rosen, D. M., McPherson, J. M. and Conti, A. : Cartilage-inducing factor-A. Apparent identity to transforming growth factor-beta. *J. Biol. Chem.* **261** ; 5693-5695 1986.
- 18) Jingushi, S., Joyce, M. E. and Bolander, M. E. : Genetic expression of extracellular matrix proteins correlates with histologic changes during fracture repair. *J. Bone Miner. Res.* **7** ; 1045-1055 1992.
- 19) Robey, P. G., Young, M. F., Flanders, K. C., Roche, N. S., Kondaiiah, P., Reddi, A. H., Temine, J. D., Sporn, M. B. and Roberts, A. B. : Osteoblasts synthesize and respond to transforming growth factor-type beta (TGF-beta) *in vitro*. *J. Cell Biol.* **105** ; 457-463 1987.
- 20) Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D. J., Suda, T., Ng, K. W. and Martin, T. J. : The role of gp130-mediated signals in osteoclast development : regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures. *J. Exp. Med.* **183** ; 2581-2591 1996.
- 21) Kido, S., Kuriwaka-Kido, R., Umino-Miyatani, Y., Endo, I., Inoue, D., Taniguchi, H., Inoue, Y., Imamura, T. and Matsumoto, T. : Mechanical stress activates smad pathway through PKC δ to enhance interleukin-11 gene transcription in osteoblasts. *PLoS One.* Sep 29 **5** ; 1-10 2010.
- 22) Sakai, K., Mohtai, M., Shida, J., Harimaya, K., Benvenuti, S., Brandi, M. L., Kukita, T. and Iwamoto, Y. : Fluid shear stress increases interleukin-11 expression in human osteoblast-like cells : its role in osteoclast induction. *J. Bone Miner. Res.* **14** ; 2089-2098 1999
- 23) Suda, T., Udagawa, N., Nakamura, I., Miyaura, C. and Takahashi, N. : Modulation of osteoclast differentiation by local factors. *Bone* **17** ; 87S-91S 1995.
- 24) Morgan, H., Tumber, A. and Hill, P. A. : Breast cancer cells induce osteoclast formation by stimulating host IL-11 production and down-regulating granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *Int. J. Cancer* **109** ; 653-660 2004.

- 25) Kurita-Ochiai, T., Ochiai, K., Suzuki, N., Otsuka, K. and Fukushima, K. : Human gingival fibroblasts rescue butyric acidinduced T-cell apoptosis. *Infect. Immun.* **70** ; 2361-2367 2002
- 26) Collind, T., Read, M. A., Neish, A. S., Whitley, M. Z., Thanos, D. and Maniatis, T. : Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules : NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J.* **9** ; 899-909 1995.
- 27) Rameshwar, P., Narayanan, R., Qian, J., Denny, T. N., Colon, C. and Gascon, P. : NF-kappa B as a central mediator in the induction of TGF-beta in monocytes from patients with idiopathic myelofibrosis : an inflammatory response beyond the realm of homeostasis. *J. Immunol.* **165** ; 2271-2277 2000.
- 28) Lai, P. C., Smith, J., Bhargal, G., Chaudhry, K. A., Chaudhry, A. N., Keith, J. C, Jr., Tam, F. W., Pusey, C. D. and Cook, H. T. : Interleukin-11 reduces renal injury and glomerular NF-kappa B activity in murine experimental glomerulonephritis. *Nephron. Exp. Nephrol.* **101** ; 146-154 2005.

著者への連絡先；黒田栄子，(〒963-8611)郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部成長発育歯学講座歯科矯正学分野

Reprint requests : Eiko KURODA, Division of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, Department of Oral Growth and Development, Ohu University School of Dentistry

31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan