

原著

実験的歯科矯正力により歯根膜組織に発現する HSP70 の 役割に関する一考察

村岡理奈^{1,2)}、中野敬介^{1,4)}、松田浩和^{1,2)}、共田真紀^{1,2)}、岡藤範正³⁾、
山田一尋^{2,3)}、川上敏行¹⁾

¹⁾ 松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患病態解析学

²⁾ 松本歯科大学 歯学部 歯科矯正学講座

³⁾ 松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 臨床病態評価学

⁴⁾ 松本歯科大学 歯学部 口腔病理学講座

(受理：平成 23 年 10 月 15 日)

抄録：実験的歯科矯正力によりマウス歯根膜組織に誘導される HSP70 と p-HSP70 の初期における発現状況の変化を免疫組織化学的に検討した。その結果、対照群歯根膜線維芽細胞はその歯根膜の全周にわたる HSP70 と p-HSP70 の活性が低い状態で保たれていた。実験群では、HSP70 は時間の経過とともに陽性反応が増強していた。p-HSP70 は、HSP70 の発現より若干遅れて陽性反応の増強を示していた。これらの実験結果は HSP70 がホメオスタシスの維持や傷害を受けた細胞の修復、またそのリン酸化した p-HSP70 として、牽引側歯根膜組織における骨芽細胞活性化による同部への骨添加傾向へのシフトが正常に行われるよう分子シャペロンとして働いていることを示唆した。

A Consideration on the Role of HSP70 Appearing in the Periodontal Tissues due to Experimental Orthodontic Force

Rina Muraoka^{1,2)}, Keisuke Nakano^{1,4)}, Hirokazu Matsuda^{1,2)}, Maki Tomoda^{1,2)}, Norimasa Okafuji³⁾,
Kazuhiro Yamada^{2,3)} and Toshiyuki Kawakami¹⁾

¹⁾ *Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan*

²⁾ *Department of Orthodontics, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan*

³⁾ *Clinical Evaluation Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, Japan*

⁴⁾ *Department of Oral Pathology, Matsumoto Dental University School of Dentistry, Shiojiri, Japan*

Abstract: We examined immunohistochemical expressions of HSP70 and p-HSP70 in the orthodontic periodontal tissues. In the control group, the HSP70 and p-HSP70 expression was observed in the periodontal ligament fibroblasts and that was kept in low levels. In the experimental group, the strong expression of HSP70 was detected according to over time. However, p-HSP70 expression was a bit delayed. The data suggests that HSP70 has been closely involved in the repair of tissue to maintain homeostasis of the periodontal tissues by the activation of periodontal ligament fibroblasts. Farthermore, the data also suggests that HSP70 act as a molecular chaperone of osteogenesis through an activation of osteoblasts.

Key words: Heat Shock Protein, HSP70, Periodontal tissues, Orthodontic mechanical stress, Orthodontic tooth movement

著者連絡先：村岡理奈 〒399-0781 長野県塩尻市広丘郷原 1780 松本歯科大学 大学院 歯学独立研究科 硬組織疾患病態解析学
Phone&Fax:0263-51-2035, Email: mura@po.mdu.ac.jp

緒言

メカニカルストレスは、タンパク質の構造変化をもたらすストレスタンパクを誘導する。歯科矯正治療においては、

矯正装置によるメカニカルストレスによって歯周組織に改造現象が起こり、その結果として“矯正学的な歯の移動”が起こる。絶えず変化する外部環境への適切な応答、つまり内部環境の恒常性（ホメオスタシス）維持を行ない、メカニカルストレスから細胞を保護する細胞組織の営みである。近年、細胞分化や形態形成を調整する各種のタンパク性因子に関する研究が多くなされている¹⁻¹¹⁾。歯根膜組織では、メカニカルストレスに対して、そのホメオスタシス維持のために種々の分子を発現するという活発な動態が認められる^{8,9)}。

さて、このメカニカルストレスによって誘導されるタンパクの一つに、ストレスタンパクとも呼ばれる熱ショックタンパク（Heat Shock Proteins: HSPs）が挙げられる。HSPsは熱ショック以外にも、様々な化学的ストレスによって誘導される。このHSPsはメカニカルストレスを受けた細胞タンパクの修復や、分化など細胞機能の制御に関連する¹²⁾と考えられているが、歯科矯正学的な歯の移動においては、歯根膜組織に発現するHSPsについて、その動態や機能についてこれまでほとんど追究されていない。*In vitro*での研究としては、ヒト歯根膜線維芽細胞の培養系での実験におけるHSPsについて言及している報告がいくつかなされているが¹³⁻¹⁵⁾、*in vivo*での歯周組織におけるHSPsの発現検索についての報告は極めて限られている¹⁶⁾。我々はこれまでマウスの実験系を用いて、歯科矯正学的メカニカルストレス負荷後の歯周組織でHSP27、およびHSP70が発現することを確認し⁹⁾、さらにその詳細、とくにHSP27について追究し報告してきた⁸⁾。しかし、HSP70についてのその発現初期からの詳細な追究はされていない。

そこで本研究では、マウスを実験動物に用いて歯科矯正学的歯の移動実験を行い、歯周組織に歯科矯正学的メカニカルストレスを負荷することによって生じる牽引側、および圧迫側歯根膜組織の変化について観察し、同部位に発現するHSP70に着目し、同時にp-HSP70についても免疫組織化学的に検討した。

材料と方法

1) 実験動物

8週齢で、体重 $35 \pm 5g$ （30 ~ 40g）のddY系雄性マウス計30匹を日本SLC株式会社（浜松、日本）から購入し使用した。マウスは空調設備により、 24 ± 1 に制御された環境下にて、床敷き（Paper clean:ペーパーレット株式会社、浜松）を敷いたプラスチック製のゲージ内で飼育した。飼育中は水と固形飼料（Picolab Rodent Diet 20: 日本SLC株式会社、浜松）を自由に摂取できるようにした。

2) 実験方法

実験方法の概略は我々の既報¹⁻⁹⁾と同様である。すなわち、Waldo法¹⁷⁾により、マウス歯周組織にメカニカルストレスを負荷した。実験に先立ち、マウスには動物用吸入麻酔剤イソフルラン（ISOFLU: 大日本住友製薬株式会社アニマ

ルサイエンス部、大阪）と空気の混合ガス（ブレ麻酔時濃度4.0%）吸入による麻酔導入を行なった。なお、安定持続した麻酔下による実験を行なうため、ガス麻酔濃度、流速の一定調節が可能な実験小動物用ガス麻酔システム（DSファーマバイオメディカル株式会社ラボトリープロダクツ部、大阪）を使用した。麻酔奏効後、手製の実験台上にマウスの上半身を起こして座位の状態にて固定した。イソフルラン吸入麻酔は、マウスの鼻部より吸入孔を介して、実験時間中の全身麻酔の維持（維持麻酔時濃度1.0%）が出来るように設定した。実験中はマウスを開口状態に保つために、実験台の上方からマウスの上顎切歯に尻糸を掛けて上顎の固定を行い、実験台の下方からはマウスの下顎前歯にゴムを掛けて下顎を引き下げようようにして固定した。この開口状態にて、マウスの上顎臼歯歯根膜部に持続的なメカニカルストレスを負荷するために、Waldoの方法によりセパレーターを挿入した。なお、セパレーターには、約 2×2 mm角に切ったHeavy Forceのラバーダムシート（Ivory, Premium Rubber Dam Pure Latex: Heraeus Kulzer GmbH & Co. KG, Hanau, Germany）を二つ折りにし使用した。セパレーターの挿入部位は、マウスの上顎右側の第一臼歯（M1）と第二臼歯（M2）間とし、経時的にセパレーターでの圧迫によるメカニカルストレスを同部歯根膜に負荷した。

実験群は10分群、20分群、1時間群、3時間群、9時間群および24時間群の6群に分け、各群別の例数は5とした。各実験時間経過後には、当該部のマウス上顎臼歯部歯周組織を一塊にして摘出した。標本作製として、経時的に摘出したマウスの上顎部を4%パラホルムアルデヒド0.05Mリン酸緩衝固定液にて24時間固定し、その後EDTA溶液にて3週間脱灰を行い、パラフィンにて包埋し、厚さ $5\mu m$ の水平断連続切片を作製した。対照群として、同一固体のマウス上顎左側臼歯部歯周組織（無処置の反対側）を用いた。本実験における観察部位は、マウス上顎第一臼歯の遠心頬側根とした。

なお、本実験は松本歯科大学動物実験指針に則って計画し、松本歯科大学動物実験室運営委員会の審査、承認のもと行った。

免疫組織化学的検討

まず免疫染色に先立ち、60 のインキュベータにて30分間の前処置後、キシレンにて脱パラフィンを行った。免疫組織化学的検討はDako Envision + Kit-K4006（Dako, Glostrup, Denmark）を用いて行った。1次抗体として抗ウサギHSP70ウサギポリクロナール抗体（HSP70（K-20）: sc-1060-R, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. 希釈倍率1:5000）と、抗ウサギp-HSP70ウサギポリクロナール抗体（p-HSP70（Tyr 525）: sc-130194, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA. 希釈倍率1:5000）を用いた。サンプルはヘマトキシリンにて対比染色した。また、ネガティブコントロールも同じ実験プロトコルにて、1次抗体を使用せずに染色した。

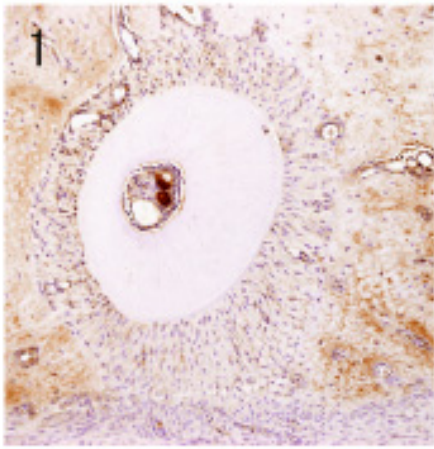


図1. 歯根膜全周の線維芽細胞で HSP70 が弱発現している (対照群マウス上顎左側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: HSP70、× 100)

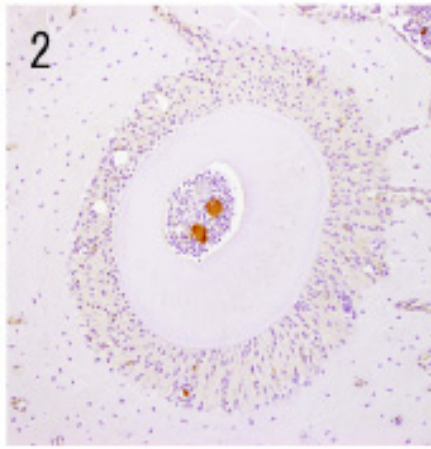


図2. p-HSP70も歯根膜全周に弱発現している (対照群マウス上顎左側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: p-HSP70、× 100)

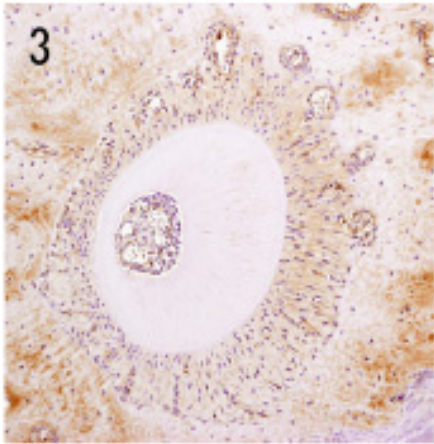


図3. 牽引側と圧迫側の HSP70 の陽性反応の増強を認める (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: HSP70、20min、× 100)

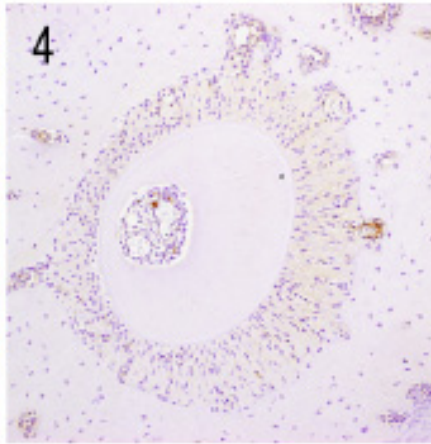


図4. p-HSP70 は対照群と比較し、変化は無い (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: p-HSP70、20min、× 100)

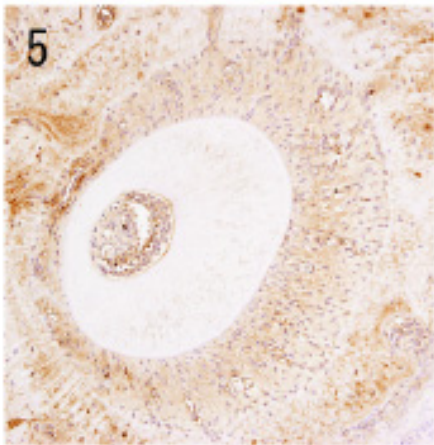


図5. 牽引側、圧迫側ともに HSP70 陽性反応が強く発現し、陽性反応は圧迫側でより強発現している (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: HSP70、9h、× 100)

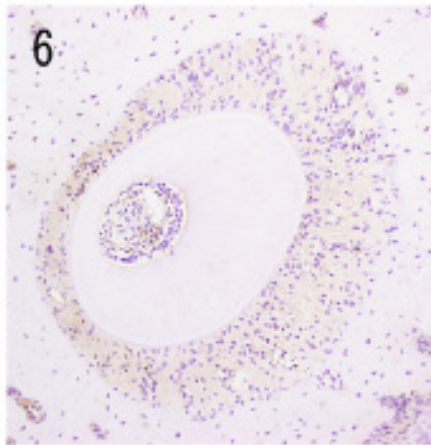


図6. p-HSP70 の陽性反応が強くなり始め、圧迫側でより強発現している (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: p-HSP70、9h、× 100)

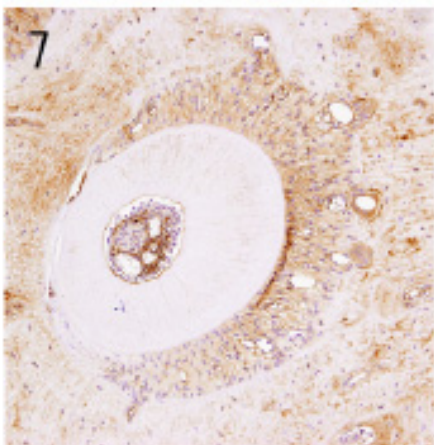


図7. 牽引側の発現強度は、9時間群よりさらに強い。圧迫側では消失している (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: HSP70、24h、× 100)

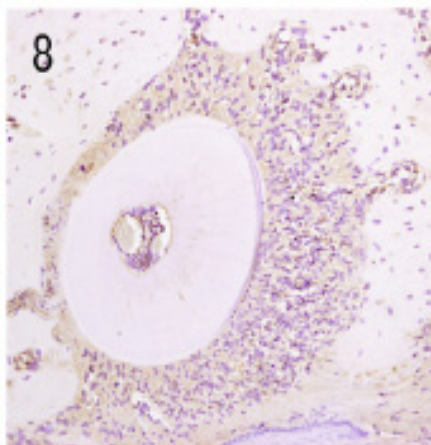


図8. p-HSP70 の牽引側の発現強度は全実験期間中、最も強く、圧迫側は全域において検出されない (実験群マウス上顎右側第一臼歯遠心頬側根歯根膜組織、IHC: HSP70、24h、× 100)

結果

対照群

マウス上顎左側第一臼歯遠心類側根の歯根膜全周に、HSP70 ペプチドの弱い発現があった。詳細にみると、主として歯根膜線維芽細胞の細胞質での発現であった(図1)。p-HSP70においては、その発現はかなり弱いものであった(図2)。

実験群

10分群標本を観察すると、HSP70の発現は牽引側に局在化しており、これは対照群よりもやや強く歯根膜線維芽細胞の細胞質に発現していた。しかし圧迫側ではほとんど変化しなかった。一方p-HSP70の発現は、牽引側、圧迫側両者において、ほぼ対照群と同程度であった。

20分群では、HSP70において牽引側と圧迫側に、歯根膜線維芽細胞の細胞質の陽性反応は10分群よりも強まっていた(図3)。p-HSP70は10分群と同様に変化しなかった(図4)。

1時間群では、牽引側の伸展した歯根膜線維芽細胞にHSP70の発現領域は20分経過群と比べ、若干広くなっていた。p-HSP70は、牽引側および圧迫側ともに変化はなかった。

3時間群では、かなり伸張した歯根膜線維芽細胞とセメント芽細胞の細胞質が、HSP70に強く陽性を呈した。陽性細胞の分布領域は1時間群と比較して圧迫側の方向に伸びていた。この時点においても、p-HSP70の発現強度に差はみられなかった。

9時間群のHSP70では、強く牽引された歯根膜線維芽細胞とセメント芽細胞、および骨芽細胞の細胞質に陽性反応が強く発現し、その免疫反応陽性領域は3時間群と比較してさらに圧迫側方向に拡大し、圧迫側にまで及んでいた。そして、その陽性反応は圧迫側での発現の方がより強くなっていた(図5)。この時期、p-HSP70の陽性反応が強くなり始め、これは圧迫側でより強く発現していた(図6)。

24時間群でのHSP70では、圧迫側で、歯槽骨と密に近接している部分以外の歯根膜全域の線維芽細胞と、セメント芽細胞および骨芽細胞の細胞質に強い陽性反応がでていた。牽引側における歯根膜線維芽細胞の発現強度は、9時間群よりさらに強くなった。一方、歯槽骨と近接した圧迫側ではHSP70は消失していた(図7)。また、p-HSP70の牽引側における発現強度は全実験期間中、最高だった。なお、圧迫側のp-HSP70は、HSP70と同様に全域において検出されなかった(図8)。

考察

歯科矯正治療における歯の移動の機構を明らかにするために多くの実験がなされ、近年では病理組織学的反応や細胞分化、さらには形態形成などを調節する各種の転写因子に関する研究がなされている^{10,11)}。しかし、歯科矯正学的な歯の移動において、歯根膜組織に発現するHSPsについ

て、その動態や機能についてこれまでほとんど追究されておらず、解明されていないところが多い。In vitro では、ヒト歯根膜線維芽細胞の培養系での実験においてHSPsについて言及している報告がいくつかなされているが¹³⁻¹⁵⁾、in vivo での歯周組織におけるHSPsの発現検索についての報告は極めて限られている¹⁶⁾。

我々はこれまで歯科矯正治療の免疫組織化学的基盤の確立のため、歯科矯正治療を模して負荷したメカニカルストレスにより、当該部の歯根膜線維芽細胞に発現するHSPsであるHSP27、およびHSP70が発現することを確認し⁹⁾、さらにHSP27の発現変化について追究した⁸⁾。その結果、平常時に弱発現しているHSP27は、歯根膜組織のホメオスタシスの維持や歯根膜線維芽細胞の活性化による組織の修復にHSP27が密接に関与しているとの考察をした。一方、メカニカルストレス負荷後、経時的に牽引側歯根膜組織に強発現したHSP27は、同時期に牽引側歯根膜組織に発現するRunx2やMsx2などの骨芽細胞の活性化による骨添加傾向への分子シャペロンとして働く事を強く示唆する知見を得、牽引側における骨芽細胞への分化調節機構の一端を明確に説明した⁸⁾。しかし、当該部細胞の受けるメカニカルストレスによる傷害的作用の修復に関する細胞反応については、これまでほとんど追究されていない。そこで今回、各種の傷害に対して発現し、受傷部の恒常性の維持に働くと考えられるHSP70について着目したのである。

HSPs(Heat Shock Proteins)とは、正常な生育温度より高い温度の熱ショックにさらされると、誘導・合成されるタンパク質のことである¹²⁾。また、熱ショックばかりでなく、さまざまな物理的・化学的ストレスによっても誘導されてくること事から、ストレスタンパク質とも呼ばれている。このHSPsは、1962年、Ritossa¹⁸⁾が、ショウジョウバエの唾液腺多染色体上に誘導されるパフのパターンの変化を研究の中から偶然に発見した。さらに、パフからHSPsのmRNAが転写されることも確認され、その後HSPsの研究が進み、カイコのように熱ストレスを受けない環境で飼われてきた生き物にも、熱ストレスに対応できる遺伝子が保存されていたという報告もなされ¹⁹⁾、これらHSPsの発現は、大腸菌から高等動物細胞にまで、温熱による遺伝子発現変化がみられることが解明された。

HSPsは、一部の超好熱性古細菌を除くすべての生物の細胞内に広く分布するタンパクである。細胞に何らかのストレスが加わった場合に発現する以外にも、平衡状態の細胞内に発現しており、細胞の分化や機能維持など、種々多様な細胞の営みに必須のタンパクであるという事が、これまでのin vitroならびにin vivoの実験にて判明してきている¹³⁻¹⁶⁾。HSPsの多くはストレスに対する細胞の応答として発現し、細胞内タンパク質が受ける変性などのダメージから保護する働きを持っている。古代、細胞がおかれた地球の過酷な環境下において、その生存のために獲得した熱ショックタンパク質は、非生理的的刺激により誘導され、分子シャペロン²⁰⁾として細胞死から逃れるという、抗アポトーシス

機能をもっているのである。HSPは、十数kDaから数百kDaのポリペプチドからなり、その分子量によって分類されている。そして、これらHSPの発現状況や発現部位、タンパクの機能はそれぞれ異なっている。以前からHSP70やHSP90などの高分子量HSPsは、未成熟な状態のタンパク質に一時的に結合し、ポリペプチドの折りたたみや会合を媒介し、タンパクが成熟するのを介添えする機能を持つ分子シャペロンとして働くことが知られている²¹⁾。低分子量HSPsも同様に、細胞内において分子シャペロンとして機能することが推測されている。しかしその詳細は明らかにされていない。今回追究したHSP70は、ATP依存性に作用する熱ショックタンパク質のひとつであり、新生タンパク質が正しく折り畳まれるようにして、新生タンパク質の変性を抑制するとともに、変性したタンパクの処理、修復、再生不可能な変性タンパクの処理を行なうことが知られている。そこで、このHSP70は歯科矯正学的歯の移動実験においては、とくに骨形成側となる牽引側に発現し、タンパクの再生過程により強く関与しているであろうということ、そして圧迫側においても発現し、タンパク処理の機能に関与しているであろうと考えたのである。また、HSP70は種々のリン酸化酵素の作用によってリン酸化される過程を経て、p-HSP70として機能を発揮すると考えられていることから、今回の研究ではp-HSP70についても検討した。

まず、メカニカルストレスの負荷時間について、Reitan²²⁾は、メカニカルストレスに対応した単純で急速な細胞性骨改造反応は、牽引側においてはメカニカルストレス適用後1日～2日で骨形成を開始すると述べている。また、我々はこれまでに経時的にメカニカルストレスを与えた歯根膜細胞にHSP27ペプチドとHSP70ペプチドの発現は、極めて短時間のうちに起こっていることを確認した⁹⁾。これらのことから、今回検討対象とした細胞分化に関与するHSP70やp-HSP70は、24時間以内にその発現状況を変化するものと考えた。

また、Watanabeら¹⁻³⁾はマウスの臼歯にメカニカルストレスを与え、20分という短時間で牽引側の歯根膜線維芽細胞に、Runx2とMx2の強い免疫染色陽性所見がみられ、時間の経過とともに増強していることを発表している。また、我々⁸⁾はWatanabeらと同実験系においてHSP27の発現変化を観察したところ、実験開始10分群では、HSP27の発現は牽引側に局在化しており、これは対照群よりもやや強く歯根膜線維芽細胞の細胞質に認められた。そこで今回我々は、実験期間の設定においてラバーダムシートを挿入後の時間の設定を10分から最大24時間までとした。

免疫組織化学的結果について考察を加える。対照群のマウス上顎左側第一臼歯の遠心頬側歯根膜において、全域の歯根膜線維芽細胞の細胞質にHSP70とp-HSP70の弱い活性が認められた。歯は1日に何千回もの咀嚼によるメカニカルストレスが常時かかっており、その状況下において、それを支持する歯根膜組織はその生理的機能を維持しているのである。この対照群歯根膜組織における本所見は、HSP70

とp-HSP70が歯根膜組織の生理的な機能維持、歯根膜のホメオスタシスを維持するための機能も携えているものと強く推察される。これはHSPが非ストレス環境下においても構成的に発現しており、恒常性維持のために機能しているという報告と一致する⁸⁾。

次に、実験群のメカニカルストレス負荷後のHSP70およびp-HSP70の発現状況の変化を検討したところ、牽引側歯根膜線維芽細胞の免疫染色陽性所見は、HSP70が10分で既に対照群よりもやや強く出始めていた。この陽性反応は時間の経過とともに増強し、9時間群のHSP70では、その免疫反応領域はさらに圧迫側にまで拡大し、強く牽引された歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞の細胞質に陽性反応が現れた。この経時的に発現強度を増す理由としては、先にも記した様に、HSPsは各種の傷害に対して受傷部の修復に働くこととされていることから、メカニカルストレスによる歯根膜線維芽細胞等に現れた各種の退行性変化、すなわち細胞傷害の修復に関与しているものと考えられる。

さらに24時間群でのHSP70において、圧迫側で歯槽骨と密に近接した部以外の歯根膜全域における線維芽細胞とセメント芽細胞、および骨芽細胞の細胞質に強い陽性反応がでていた。24時間群の牽引側におけるHSP70の陽性反応の発現強度は、9時間群よりも強くなり、HSP70においては実験開始後24時間付近にその発現のピーク迎えるものと思われる。また、細胞質と核の染まり方の差が出ており、核内移行を思わせる様な所見が若干あった。しかし、これは明瞭ではなかった。24時間群の牽引側におけるp-HSP70の発現強度は、全実験時間中、24時間群が最も強くなった。これらの反応は、歯根膜組織に対するメカニカルストレスにより誘導されたものと考えられる。なお、p-HSP70はHSP70よりも遅れて発現していたという所見より、各種リン酸化酵素等によってリン酸化されたHSP70は、p-HSP70として分子シャペロン機能を携えて平常時とは異なる働き、つまり、牽引側歯根膜組織における骨芽細胞活性化による同部への骨添加傾向へのシフトが正常に行われるよう、分子シャペロンとして働いているものと考えられる。

次に、圧迫側歯根膜線維芽細胞の免疫染色陽性所見について、考察を加える。Araiら¹⁶⁾は実験動物にラットを用いて、ラット圧迫側歯根膜に発現する17のHSP関連遺伝子の発現について検討し、固定式装置による上顎第一臼歯の舌側移動6時間後に、マイクロアレイ解析にてHSP27とHSP70が多く発現する傾向を認め、またReal-time RT-PCRにより、HSP70 mRNAが有意に増加するということ報告しており、歯の移動開始初期に圧迫側歯根膜に発現するHSP70 (HSPa1a) が、それ以降に生じる歯の移動現象に関与していることが考えられると述べている。今回、我々が検索したHSP70とp-HSP70のマウス圧迫側歯根膜における発現については、メカニカルストレス負荷9時間後に発現増強している。これは、Arai¹⁶⁾らのデータと若干の発現時間の差異はあるものの、同様の発現を示している。メカニカルストレス負荷9時間群の圧迫側の歯根膜線維芽細胞において、HSP70および

p-HSP70の発現強度が牽引側の歯根膜線維芽細胞への発現強度よりも強かったという所見から、圧迫側の歯根膜線維芽細胞も、牽引側同様、メカニカルストレスに反応して種々のタンパク因子を産生するということが言えるであろう。そして、細胞傷害を強く受けた圧迫側に発現するHSP70は、圧迫側における破骨細胞等の分化に関与し、その新生タンパク質の変性を抑制するとともに、変性したタンパクの処理、修復、再生不可能な変性タンパクの処理を行なう機能を担っていると考えられる。

24時間群における圧迫側の全域においては、HSP70とp-HSP70の陽性反応はほぼ消失していた。この所見は病理組織学的にも、歯根膜線維芽細胞が強く圧迫されることで退行性変化を生じ、細胞が死滅していたという所見と一致する⁸⁾。本実験における24時間群のように、長時間、歯科矯正学的メカニカルストレスの範疇を超える強い圧迫力が細胞に加わった場合には、細胞はストレスに適応するその機能を発揮できずに死滅してしまうと考えられる。したがって、本実験法は、長時間の強い圧迫をし続けると歯根膜に負荷される力が大き過ぎることから、圧迫側においてHSP70、p-HSP70が強発現した実験開始9時間群以降、24時間群までの間のより詳細な経時的変化の検討には適していないと言えるであろう。

以上より、これらの実験結果はHSP70がホメオスタシスの維持や障害を受けた細胞の修復、またそのリン酸化したp-HSP70として、牽引側歯根膜組織における骨芽細胞活性化による同部への骨添加傾向へのシフトが正常に行われるよう分子シャペロンとして働き、タンパク質のフォールディング等の立体構造形成を助けていることを示唆した。同じく圧迫側に発現するHSP70は、圧迫側における破骨細胞等の分化に関与して、その新生タンパク質の変性を抑制するとともに、変性したタンパクの処理、修復、再生不可能な変性タンパクの処理を行なう機能も担っているであろう。

謝辞

本研究の一部は、日本学術振興会科学研究費 若手研究(B) #23792456、基盤研究研究(C) #2259230 および #23593075 の助成を受けたものである。

参考文献

1. Watanabe T, Nakano K, Muraoka R, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Role of Msx2 as a promoting factor for Runx2 at the periodontal tension sides elicited by mechanical stress. *Eur J Med Res* 13: 425-431, 2008
2. Watanabe T, Nakano K, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Immunohistochemistry of the periodontal ligament fibroblasts in orthodontic tension sides. *J Hard Tissue Biol* 18: 175-180, 2009
3. Watanabe T, Okafuji N, Nakano K, Shimizu T, Muraoka R,

- Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Periodontal tissue reaction to mechanical stress in mice. *J Hard Tissue Biol* 16: 71-74, 2007
4. Kawakami T, Nakano K, Shimizu T, Kimura A, Okafuji N, Tsujigiwa H, Hasegawa H and Nagatsuka H. Histopathological and immunohistochemical background of orthodontic treatment. *Int J Med Biol Front* 15: 591-615, 2009
5. Nakano K, Muraoka R, Tomida M, Matsuura S, Okafuji N, Siar CH and Kawakami T. Possibility of odontoblasts activity up-regulation due to orthodontic mechanical stress in mice. *J Hard Tissue Biol* 19: 13-16, 2010
6. Matsuda H, Nakano K, Muraoka R, Tomoda M, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. BMPs and related factors appearing in the mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *J Hard Tissue Biol* 19: 153-160, 2010
7. Matsuda H, Muraoka R, Tomoda M, Nakano K, Okafuji N, Yamada K and Kawakami T. Immunohistochemical observation of BMP in the mouse orthodontic periodontal tension sides. *J Hard Tissue Biol* 18: 181-184, 2009
8. Muraoka R, Nakano K, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Immunohistochemical expression of heat shock proteins in the mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *Eur J Med Res* 15: 475-482, 2010
9. Muraoka R, Nakano K, Matsuda H, Tomoda M, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Immunohistochemical observation of heat shock proteins expression in mouse periodontal tissues due to orthodontic mechanical stress. *J Hard Tissue Biol* 18: 193-197, 2009
10. Saito Y, Yoshizawa T, Takizawa F, Ikegami M, Ishibashi O, Okuda K, Hara K, Ishibashi K, Obinata M and Kawashima H. A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J Cell Sci* 115: 4191-4200, 2002
11. Yoshizawa T, Takizawa F, Iizawa F, Ishibashi O, Kawashima H, Matsuda A, Endo N and Kawashima H. Homeobox protein Msx2 acts as a molecular defense mechanism for preventing ossification in ligament fibroblasts. *Mol Cell Biol* 24: 3460-3472, 2004
12. Lindquist S and Craig EA. The Heat-Shock Proteins. *Annu Rev Genet* 22: 631-677, 1988
13. Maeda T, Kameda T and Kameda A. Loading of continuously applied compressive force enhances production of heat shock protein 60, 70 and 90 in human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells. *J Jpn Orthod Soc* 56: 296-302, 1997
14. Okazaki M, Shimizu Y, Chiba M and Mitani H. Expression of heat shock proteins induced by cyclical stretching stress in human periodontal ligament fibroblasts. *Tohoku Univ Dent*

村岡理奈 ほか：歯科矯正力により歯根膜に発現する HSP70

- J 19: 108-115, 2000
15. Araujo RMS, Oba Y and Moriyama K. Identification of genes related to mechanical stress in human periodontal ligament cells using microarray analysis. *J Periodont Res* 42: 15-22, 2007
 16. Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, Noda K, Choi JW, Yashiro Y, Hanada N and Nakamura Y. HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. *Histochem Cell Biol* 134: 337-43, 2010
 17. Waldo CM. Method for the study of tissue response to tooth movement. *J Dent Res* 32: 690-691, 1953
 18. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in drosophila. *Experientia* 18: 571-573, 1962
 19. Miyagawa Y, Lee JM, Maeda T, Koga K, Kawaguchi Y and Kusakabe T. Differential expression of a Bombyx mori AHA1 homologue during spermatogenesis. *Insect Mol Biol* 14: 245-253, 2005
 20. Hratl FU. Molecular chaperone in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-579, 1996
 21. Gething MJ and Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-44, 1992
 22. Reitan K. Tissue behavior during orthodontic tooth movement. *Am J Orthodont* 46: 881-900, 1960

