

原著

歯科矯正学的メカニカルストレスによりマウス歯根膜組織に発現する熱ショックタンパクの免疫組織化学的観察

村岡理奈¹⁾、中野敬介^{1,3)}、松田浩和¹⁾、共田真紀¹⁾、岡藤範正²⁾、栗原三郎³⁾、
山田一尋²⁾、川上敏行^{1,3)}

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 〒399-0781 塩尻市広丘郷原 1780

²⁾松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 臨床病態評価学 〒399-0781 塩尻市広丘郷原 1780

³⁾松本歯科大学 総合歯科医学研究所 〒399-0781 塩尻市広丘郷原 1780

(受理：平成 21 年 10 月 21 日)

抄録：熱ショックタンパク質 (HSPs) は熱ショックのみならず、メカニカルストレスに対しても発現する。歯科矯正治療は、関連する歯周組織にメカニカルストレスを負荷する。それを受けた後の歯周組織に発現する HSP の状況を調べる事は極めて重要である。そこで今回、我々は、歯科矯正学的メカニカルストレスを Waldo 法によって ddY マウスの歯根膜組織に与え、その後の変化を病理組織学的ならびに免疫組織化学的に検索した。その結果、対照群では HSP27 と 70 はともに極めて弱い発現であったのに対し、実験群の牽引側歯根膜組織に HSP27 と 70 の両者の発現増強がみられた。これらの所見は、HSPs は歯根膜組織の恒常性の維持に寄与している事を示唆していた。

Immunohistochemical Observation of Heat Shock Proteins Expression in Mouse Periodontal Tissues due to Orthodontic Mechanical Stress

Rina Muraoka^{1,2)}, Keisuke Nakano^{1,4)}, Hirokazu Matsuda^{1,2)}, Maki Tomoda^{1,2)}, Norimasa Okafuji³⁾,
Saburo Kurihara⁴⁾, Kazuhiro Yamada^{2,3)} and Toshiyuki Kawakami^{1,4)}

¹⁾ Hard Tissue Pathology Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, 399-0781 Japan

²⁾ Clinical Evaluation Unit, Matsumoto Dental University Graduate School of Oral Medicine, Shiojiri, 399-0781 Japan

³⁾ Matsumoto Dental University Institute for Oral Science, Shiojiri, 399-0781 Japan

(Accepted for Publication, October 21, 2009)

Abstract: Heat shock proteins (HSPs) are induced by not only the heat shock but also the mechanical stress. Orthodontic tooth movement induced mechanical stress in the related periodontal ligament. It is important to examine the immunohistochemical profile change of the Heat shock proteins (HSPs) in the periodontal ligament cells after receiving the mechanical stress for orthodontic treatment. Therefore, we examined the HSPs in the periodontal ligament cells of ddY mice using the Waldo method. In the control group, periodontal ligament was observed as physiological arrangement, and which reacted weakly to HSP27 and HSP70. In the experimental group the extension site of the periodontal ligament cells and the expansion of the blood vessel occurred in the traction side. These tissues were strongly reacted to HSP27 and HSP70. The findings suggest that the HSPs expression work as the mechanism of maintenance of homeostasis in the periodontal tissues.

Key words: Heat Shock Protein, HSP27, HSP70, Periodontal ligament cells, 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 歯学部歯科矯正学講座 Phone & Fax: 0263-51-2086:
E-mail: mura@po.mdu.ac.jp

緒言

歯科矯正治療において、矯正装置により歯に矯正力を加えると、メカニカルストレスとして歯周組織に作用する。

その結果、歯周組織が反応し歯の移動側、いわゆる圧迫側には“破骨細胞の出現により骨の吸収”が惹起される。反対側、いわゆる牽引側では“骨芽細胞の活性化により骨の添加”が起こり、その結果として“歯の移動”が起こることは周知の事実である。この場合、歯根膜に作用しているメカニカルストレスを軽減させるような組織反応が生じる結果として歯は“移動”するのである。これは、歯根膜の恒常性維持による反応と考える事が出来る。近年では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盛んになり多くの報告がある^{1,2)}。歯周組織はメカニカルストレスや炎症に反応し種々の分子を発現して活発なりモデリングを引き起こし、その恒常性を保っている事が明らかとなってきた^{3,4,5)}。

以前より、細胞傷害性刺激やメカニカルストレスにより様々な臓器や組織において発現する主要なタンパクとして、熱ショックにより一時的に発現が増強されるタンパクの一つ熱ショックタンパク(HSPs)が知られている⁶⁾。このHSPsは熱ショックばかりでなく、その他の虚血、感染や炎症などの病理学的諸変化や放射線、酵素ストレス、重金属、砒素、エタノール、活性酸素、アミノ酸誘導体など等の様々な物理化学的ストレスによっても誘導される⁸⁻¹¹⁾。傷害を受けた細胞に対して、防御・修復に関与し、組織の恒常性維持に関与するとされている¹²⁻¹⁶⁾。しかし、実験的歯の移動に伴う歯根膜組織での動態やその役割については、傷害性刺激に対する調節的な細胞反応と同様にこれまでほとんど追究されていない。Shigeharaらは¹⁷⁾、ラットを用いて歯科矯正学的メカニカルストレスを付与した後の当該歯の歯髄に発現する各種因子のmRNAの検索結果を報告しているが、その中の1つの因子としてHSPについてその発現を述べているに過ぎず、我々の知る範囲では歯周組織における発現検索について言及した論文は極めて限られている。すなわち、前田ら⁸⁾は培養したヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞(Human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells:HPLF)に対して持続的圧縮力を負荷した際、HSP60、70、90の産生が促進するという事を報告し、岡崎ら^{10,11)}によって*in vitro*でヒト歯根膜線維芽細胞に周期的伸展力を負荷した場合、HSP47、60、70の発現が増強するという報告がなされている。また、Araujoら¹⁸⁾によって行なわれたヒト歯根膜線維芽細胞の培養系での実験においては、メカニカルストレス付加により変化する遺伝子をマイクロアレイによって検索したもののHSP70の増加していることが述べられているのみである。

そこで本研究では、歯周組織に歯科矯正学的メカニカルストレスを付与することによって起こる、いわゆる“圧迫側”と“牽引側”における歯根膜細胞の変化について、実験動物であるマウスを用いて歯科矯正学的歯の移動実験を行い、同時に発現しているであろう種々のHSPsの発現状況について免疫組織化学的に観察した。

方法

実験動物には、8週齢の35 ± 5g (30 ~ 40g)のddY雄性マ

ウスを使用した。実験方法としてWaldo法(1953)¹⁹⁾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。マウスには、実験開始前にイソフルランと空気の混合ガス吸入による麻酔導入を施し、麻酔導入後、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麻酔維持が出来るように設定を行なった。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爪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にして下顎の固定を行なった。この開口状態下にて、マウスの上顎臼歯歯根膜に持続的なメカニカルストレスを負荷するためにWaldo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角に切ったラバードグムシート(Heavy)を使用した。セパレーターの挿入部位は、マウスの上顎右側第一臼歯と第二臼歯間とし、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。セパレーター挿入の24時間後に、マウス上顎臼歯部歯周組織を摘出し、4%パラホルムアルデヒド0.05Mリン酸緩衝固定液にて24時間固定を行なった。その後、10%EDTA溶液にて3週間脱灰を行った後、パラフィンにて包埋し、厚さ5μmの水平連続切片を作製した後、病理組織学的ならびにHSPの免疫組織化学的検索を行った。免疫染色では、一次抗体として抗マウスHSP27マウスモノクローナル抗体(HSP27 [G3.1]、アブカム株式会社、東京、希釈倍率1:1000)と抗マウスHSP70ウサギポリクローナル抗体(HSP70、Lab Vision Corp, Fremont, CA, USA, 希釈倍率1:5000)を用いた。なお、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。マウスの上顎臼歯の歯数は、上顎第一臼歯(M1)、第二臼歯(M2)、第三臼歯(M3)と3歯あり、歯根数はそれぞれ上顎第一臼歯(M1)が3根、第二臼歯(M2)も3根、第三臼歯(M3)は2 ~ 3根である。今回の実験では、上顎第一臼歯の遠心側根を観察部位とした。なお、この実験は松本歯科大学動物実験指針に則って計画し、動物実験室運営委員会の審査、承認のもとに行なった。

結果

メカニカルストレスを負荷後H-E染色にて病理組織学的検討を行ったところ、対照群のマウス上顎左側第一臼歯の遠心側根歯根膜では、歯根膜細胞の走向のばらつき、歯根膜線維の乱れや歯槽骨の吸収などはみられなかった(図1)。実験群のマウス上顎右側第一臼歯の遠心側根歯根膜では、メカニカルストレスを負荷した24時間後において、歯根膜線維が圧縮されている部分と伸展している部分が観察された。HSP27およびHSP70の発現状況は免疫組織化学的に、対照群では、両者ともに全域の歯根膜線維芽細胞で弱かった(図2)。一方、実験群では、HSP27とHSP70ともに圧迫側において完全に陰性を示していた。牽引側では、かなりの数の歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞の細胞質に強い発現がみられた。なお、細胞質と核の染色態度に差があり、核内移行を思わせる様な所見もあった(図3, 4)。

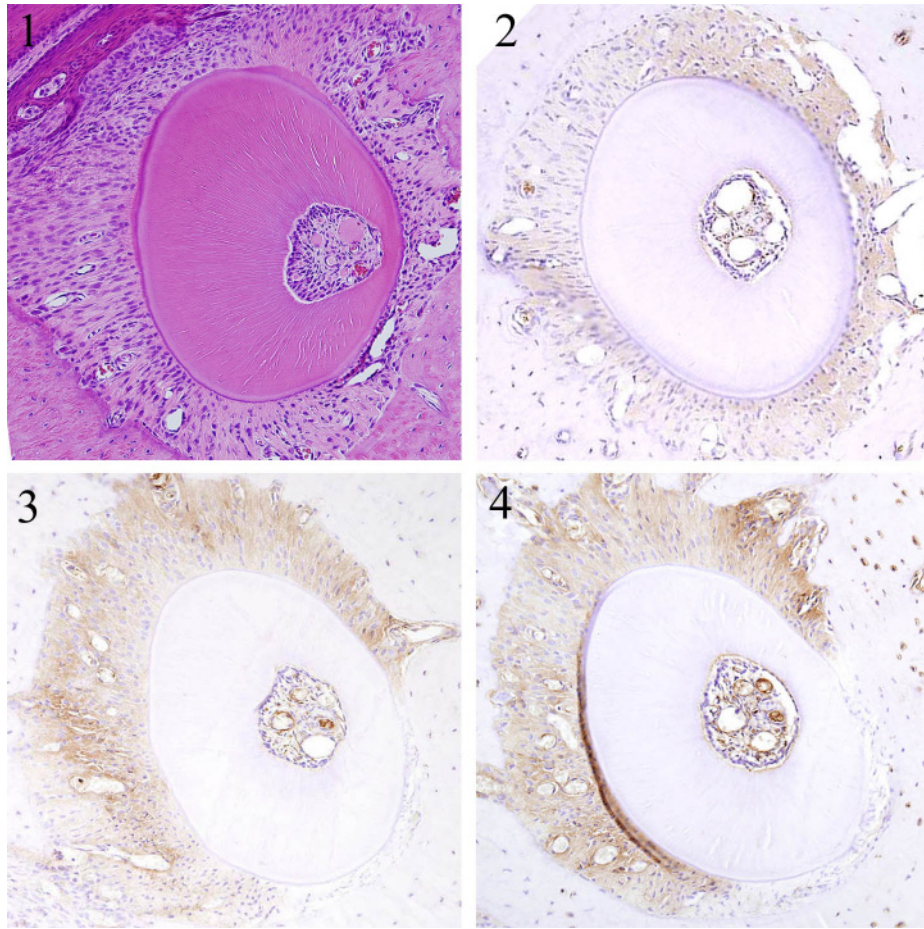


図1. 歯根膜細胞や歯根膜線維は整然と配列している（対照群マウス上顎左側第一臼歯遠心類側根歯根膜、HE、x100）
 図2. 全域の歯根膜線維芽細胞にHSPの弱い活性が認められる（対照群マウス上顎左側第一臼歯遠心類側根歯根膜、IHC: HSP70、x100）
 図3. 牽引側では、歯根膜細胞の伸展および血管の拡張が生じ、同部では歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞にHSP27の発現が認められる。一方、圧迫側では完全に陰性である（実験群マウス上顎左側第一臼歯遠心類側根歯根膜組織、IHC: HSP27、24h、x100）
 図4. 牽引側では、HSP70が発現している。一方、圧迫側のHSP70発現は完全に陰性化している（実験群マウス上顎左側第一臼歯遠心類側根歯根膜組織、IHC: HSP70、x100）

考察

矯正学的歯の移動について、骨の吸収と添加の様相やその機構を明らかにする見地から、多くの動物実験がなされている。圧迫側と牽引側における歯槽骨や歯根膜の変化について病理組織学的に検討している報告が多い。近年では、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盛んになり、多くの報告が為されている¹⁻⁵⁾。それによると、歯周組織はメカニカルストレスや炎症に反応し種々の分子を発現して活発なりモデリングを引き起こし、その恒常性を保っている事が明らかとなってきた³⁻⁵⁾。

我々（Watanabe^{1,2)}ら）は、その観点からさらに発展させ歯科矯正治療を模して実験的に負荷したメカニカルストレスによって、当該部の歯根膜線維芽細胞に発現するRunx2とMsx2の免疫組織化学的变化について追究し、Msx2はRunx2に対して促進的に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。しかし、HSPsの発現など当該部の細胞の受ける傷害性刺激に対する調節的な細胞反応については、ほとんど追究されていない。

HSPsとは、熱ショックにより一時的に発現が増強されるタンパクの一つである⁶⁾。また、熱ショックばかりでなく、その他の虚血、感染や炎症などの病理学的諸変化や、放射線、酵素ストレス、重金属、砒素、エタノール、活性酸素、アミノ酸誘導体など等の様々な物理化学的ストレスによっても誘導される⁸⁻¹¹⁾事から、ストレスタンパク²⁰⁾とも呼ばれている。これらHSPsの一群は、Ritssa(1962)²¹⁾によって、高温環境に暴露された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研究の中から発見された。その後、当時開発されたばかりのSDS-PAGEを用いて、ショウジョウバエの熱ショックに伴い合成されるタンパクが初めて分離された。いくつかの主要タンパクは、唾液腺以外の組織を熱ショック

処理することによっても同様に誘導され、熱ショックタンパク (Heat Shock Proteins: HSPs) と総称されることになった。さらに、パフから HSPs の mRNA が転写されることも確認された。その後、大腸菌、酵母、さらに哺乳類の細胞等でも HSPs の研究が進み、HSPs の発現が種を超えた普遍的な現象であることが証明された。HSPs の多くはストレスに対する細胞の応答として発現し、タンパクの変性を抑制するとともに、変性したタンパクの修復を行なうことが知られている。また HSPs は平衡状態の細胞内に広く分布するタンパクであり、実は非ストレス下においても恒常的に発現しており、細胞の分化、増殖、生存、機能維持など様々な細胞の営みに必須のタンパクである事が、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¹²⁻¹⁶⁾。HSP は、十数 kDa から数百 kDa のポリペプチドであり、分子量によって、HSP90 ファミリー・HSP70 ファミリー・HSP60 ファミリー・低分子量 HSP (HSP27) に分類され、それぞれ個別に命名されている。そして、これら HSP の発現状況、発現部位、タンパクの機能はそれぞれ異なるという報告が、これまでにいくつかなされている。

そこで今回は、歯根膜を構成する線維芽細胞が受ける傷害性刺激に対して発現しているであろう HSPs について、とくに HSP27 と HSP70¹⁸⁾ について追究した。まず、メカニカルストレスを負荷後、H-E 染色にて病理組織学的検討を行ったところ、対照群のマウス上顎左側第一臼歯の遠心側根歯根膜では、歯根膜線維の乱れや歯槽骨の吸収などはみられなかった (図 1)。実験群のマウス上顎右側第一臼歯の遠心側根歯根膜では、メカニカルストレスを負荷した 24 時間後において、歯根膜線維が圧縮されている部分と伸展している部分が観察された。これは Watanabe¹⁾ らの結果、ならびに Kawakami^{3,4)} らの総説による病理組織像と同様であった。HSP27 および HSP70 の発現状況の変化についての免疫組織化学的検討においては、対照群のマウス上顎左側第一臼歯の遠心側根歯根膜における HSP27 と HSP70 では、全域の歯根膜線維芽細胞に弱い活性が認められた (図 2)。この対照群歯根膜組織における所見は、HSP27 と HSP70 が歯根膜組織の生理的な機能維持に関与し、歯根膜の恒常性を維持しているためと考えられる。

次に、実験群のメカニカルストレス負荷後の HSP27 および HSP70 の発現状況を観察したところ、実験群歯根膜組織の牽引側では、歯根膜細胞の伸展および血管の拡張が生じており、同部では HSP27 と HSP70 の発現があった。詳細には、牽引側ではかなりの数の歯根膜線維芽細胞と骨芽細胞の細胞質に強い発現がみられた。したがってこれらの反応は、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。

一方、圧迫側において両 HSPs は完全に陰性化していた。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 (図 3,4)。

以上、歯科矯正治療によるメカニカルストレスは、Runx2 や Mx2 などの各種因子による改造を起こす一方で、その初

期から HSP27・HSP70 が発現して、歯根膜組織の恒常性の維持に密接に関与している可能性が示唆された。今後は HSP27 と HSP70 の 24 時間以内の経時的変化を調べ、詳細な発現状況変化の観察を行っていききたい。そして、実験個体数を増やし、これらの組織反応の妥当性を追究していく予定である。

謝辞

この研究の一部は、日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 (C) (#19592374, #20592419) の補助によって行った。

文献

1. Watanabe T, Nakano K, Muraoka R, Shimizu T, Okafuji N, Kurihara S, Yamada K and Kawakami T. Role of Mx2 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, 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
3. 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(7/8), 2009 in Press
4. Kawakami T, Nakano K, Shimizu T, Watanabe T, Muraoka R, Kimura A and Hasegawa H. Immunohistochemical Basis for Orthodontic Treatment. In Biochemistry and Histocytochemistry Research Developments. Fuchs S and Auer Med, Nova Science Publishers Inc, NY, 2010, in Press
5. 渡邊武寛, 中野敬介, 村岡理奈, 清水貴子, 岡藤範正, 栗原三郎, 山田一尋, 川上敏行. 歯科矯正学的牽引側における歯根膜線維芽細胞の免疫組織化学. J Hard Tissue Biol 18(4):175-180, 2009
6. Milton, J.S. Heat shock proteins. J Biol Chem 265: 12111-12114, 1990
7. 田中郁夫. 熱傷創の局所における HSP27 および HSP70 の発現と分布 ラット表皮において. 埼玉医大誌 28: 25-32, 2001
8. 前田 隆, 亀田 剛, 亀田 晃. 持続的圧縮力はヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞において熱ショックタンパク質 60, 70, 90 の産生を促進する. J Jpn Orthod Soc 56: 296-302, 1997
9. 呂井利奈. ストレスタンパク質 HSP90 ファミリータンパク質の構造と発現. 歯基礎誌 40: 528-541, 1998
10. 岡崎雅子, 清水義之, 千葉美麗, 三谷英夫. 周期的伸展力によるヒト歯根膜線維芽細胞のストレスタンパク質の発現に関する研究. 東北歯誌 19: 108-115, 2000
11. Shimizu Y, Okazaki M, Suzuki H and Mitani H. Induction of Heat shock proteins with *in vitro* application of mechanical stress in human periodontal ligament fibroblasts. in Interna

村岡理奈 ほか：メカニカルストレスにより発現する歯根膜のHSPs

- tional conference on dynamics and regulation of the stress response : 81, 1998
12. Lindoquist S. The heat shock response. *Ann Rev Biochem* 55: 1151-91, 1986
 13. Gething MJ, Sambrook J. Proteins folding in the cell. *Nature* 355: 33-45, 1992
 14. Hendrick JP and Hratl FU. Chaperone functions of the heat-shock proteins. *Ann Rev Biochem* 62: 349-84, 1993
 15. Craig EA, Weissman JS and Horwich AL. Heat shock proteins and molecular chaperones: mediators of protein conformation and turnover in the cell. *Cell* 78: 365-72, 1994
 16. Hratl FU. Molecular chaperone in cellular protein folding. *Nature* 381:571-9, 1996
 17. Shigehara S, Matsuzaka K and Inoue T. Morphohistological change and expression of HSP70, osteopontin and osteocalcin mRNAs in rat dental pulp cells with orthodontic tooth movement. *Bull Tokyo Dent Coll* 47: 117-124, 2006
 18. 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
 19. Waldo CM. Method for the study of tissue response to tooth movement. *J Dent Res* 32: 690-691, 1953
 20. 永田和宏. ストレスタンパク質 細胞内の名脇役たち. *科学* 61: 50-59, 1991
 21. Ritossa F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophira*. *Experientia* 18: 571-573, 1962

