

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792314

研究課題名(和文) 歯の移動を行った圧迫側歯根膜に発現するHSPA1Aの破骨細胞分化調整機能の解明

研究課題名(英文) The effect of HSPA1A on the osteoclastogenesis during pressure zone of orthodontic tooth movement

研究代表者

新井 千博 (Arai, Chihiro)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10460221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、矯正歯の移動初期の圧迫側歯根膜に高発現するHeat Shock Protein A1A (HSPA1A)に着目し、破骨細胞の分化調整因子に対するHSPA1Aの影響を明らかにすることである。炎症性サイトカインであるIL6およびIL8の発現をLPS刺激により亢進させたヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLFs)に、HSPA1Aのリコンビナントタンパクを添加したところ、IL6とIL8の発現が共に抑制された。このことは、HPDLFsにおいて、HSPA1Aが破骨細胞の分化に重要な役割を担う炎症性サイトカインの発現に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the interaction of heat shock protein A1A (HSPA1A) with the osteoclastogenesis related factors. The induction of IL6 and IL8 expressions stimulated by LPS were inhibited by administration of recombinant heat shock protein A1A (HSPA1A) in human periodontal ligament fibroblast in vitro. The results suggested that proinflammatory cytokines, which are important factor for osteoclastogenesis, were inhibited by the HSPA1A in PDLFs in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯科矯正学 歯の移動 Heat Shock Protein

1. 研究開始当初の背景

これまで我々は、矯正的に歯を移動した初期の圧迫側歯根膜に Heat Shock Protein A1A(HSPA1A)が細胞内および細胞外に著しく発現することを明らかにしてきた。細胞内に発現する熱ショックタンパク質(HSPs)は分子シャペロンとして機能し、熱刺激や酸欠など様々なストレスから細胞を保護し、恒常性を維持するタンパク質である。一方、細胞外に放出される HSPA1A は Toll-like receptor4 を介して炎症性サイトカインの発現を誘発することが報告され、サイトカイン様の働きをすることからシャペロカインと呼ばれている。しかしながら、これについては否定的な報告もあり、いまだその働きについては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究の目的は、矯正的歯の移動初期の圧迫側歯根膜の細胞外に発現する HSPA1A に着目し、歯根膜線維芽細胞が種々の刺激により発現する炎症性サイトカインなど、破骨細胞の分化調整因子に対する影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

予備実験において、培養したヒト歯根膜線維芽細胞(HPDLFs)にリコンビナント HSPA1A タンパク( rhHSPA1A 100、300ng/ml )を添加し、炎症性サイトカインやそのレセプターの発現を RT<sup>2</sup>Profiler<sup>TM</sup>PCR Array により網羅的に解析したところ、発現が減少する傾向がみられた。

そこで本研究では、*P.gingivalis* 由来の LPS(10  $\mu$ g/ml)により炎症関連因子の発現を誘発した HPDLFs に対する HSPA1A ( rhHSPA1A 300ng/ml ) の影響を、RT<sup>2</sup>Profiler<sup>TM</sup>PCR Array により 85 の炎症性サイトカインとレセプターの発現遺伝子について網羅的に解析を行った (*in vitro*)。さらに LPS により発現誘導を行った IL-6

および IL-8 の mRNA 発現量に対する HSPA1A の影響を real-time RT PCR にて 経時的に観察した (*in vitro*)。

4. 研究成果

LPS の添加により誘発された炎症性サイトカイン/レセプターのうち、十分な発現量が認められたものは 14 遺伝子であった。これらの発現量は rhHSPA1A の添加により減少する傾向が認められた (表)。

Symbol	Fold change	Symbol	Fold change
AIMP1	-1.1451	CXCL6	-2.7614
BMP2	-1.5642	CXCL9	-1.0684
C5	-1.032	CXCR1	-1.0684
CCL1	-1.0684	CXCR2	-1.0684
CCL11	-1.0684	FASLG	-1.0684
CCL13	-1.0684	IFNA2	-1.0684
CCL15	-1.0684	IFNG	-1.0684
CCL16	-1.0684	IL10RA	-1.0684
CCL17	-1.0684	IL10RB	-1.0684
CCL2	-1.061	IL13	-1.0684
CCL20	-1.5427	IL15	1.0827
CCL22	-1.0684	IL16	1.4586
CCL23	-1.0684	IL17A	-1.0684
CCL24	-1.0684	IL17C	-1.0684
CCL26	1.0531	IL17F	-1.0684
CCL3	-1.0684	IL1A	-1.4494
CCL4	-1.0684	IL1B	-1.0758
CCL5	1.7107	IL1R1	-1.2444
CCL7	-1.0684	IL1RN	-1.0684
CCL8	-1.0684	IL21	-1.0684
CCR1	1.0978	IL27	-1.0684
CCR2	-1.0684	IL3	-1.0684
CCR3	-1.0684	IL33	-1.0684
CCR4	-1.0684	IL5	-1.0684
CCR5	-1.0684	IL5RA	-1.0684
CCR6	-1.0684	IL7	1.1286
CCR8	-1.0684	IL8	-1.4901
CD40LG	-1.0684	IL9	-1.0684
CSF1	-1.2705	IL9R	-1.0684
CSF2	-2.4888	LTA	-1.0684
CSF3	-23.5136	LTB	-1.0684
CX3CL1	-1.0684	MIF	1.0314
CX3CR1	-1.0684	NAMPT	-1.0684
CXCL1	-2.0215	OSM	-1.0684
CXCL10	-1.0684	SPP1	1.0752
CXCL11	-1.0684	TNF	-1.0684
CXCL12	-1.0908	TNFRSF11B	-1.7477
CXCL13	-1.0684	TNFSF10	1.0827
CXCL2	-1.4394	TNFSF11	-1.0684
CXCL3	-1.0684	TNFSF13	1.0102
CXCL5	-1.4798	TNFSF13B	1.0978
GAPDH	-1.0107	TNFSF4	1.0978
HPRT1	1.0531	VEGFA	-1.0684
RPLP0	-1.0249	ACTB	-1.032
HGDC	-1.0684	B2M	1.0314

表 LPS10  $\mu$ g/ml vsLPS10/ml+HSPA1A 300ng/ml の PCR Array の結果(マイナスは HSPA1A 添加群で減少した遺伝子を表す)

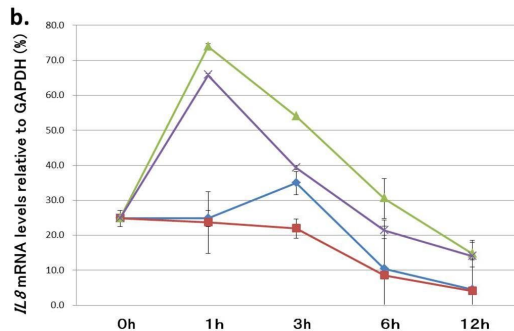
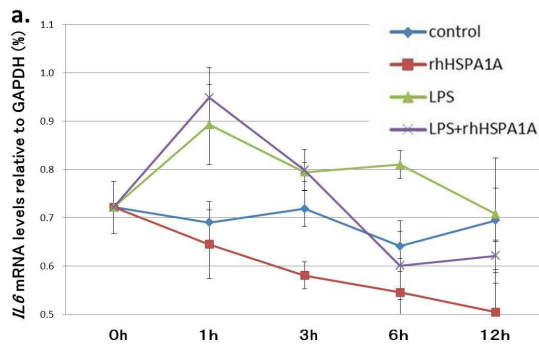


図 Real-time PCR による *IL6* および *IL8* の mRNA 発現量の変化 a. *IL6* b. *IL8* (mean±S.E. n=3)

*IL6* mRNA 発現量は control 群と比較して LPS 添加群で 1 時間後に著しく増加するが、rhHSPA1A + LPS 添加群では LPS 添加群と比較して 6 時間後に著しく減少した。*IL8* mRNA 発現量は *IL6* 同様、control 群と比較して LPS 添加群で 1 時間後に著しく増加するが、rhHSPA1A + LPS 添加群では LPS 添加群と比較して有意に減少した。一方、rhHSPA1A を単独に添加した群では、control 群と比較して *IL6* mRNA の発現量が有意に減少した (図 a, b)。

本研究の結果、rhHSPA1A は炎症性サイトカインやレセプターの発現を誘発することなく、逆に LPS により誘発された炎症性サイトカインの発現を抑制する結果が得られた。したがって、HPDLFs において、細胞外の HSPA1A は破骨細胞の分化に重要な役割を担う炎症性サイトカインの発現に対して抑制的に働く可能性が示唆された。

現在、HSPA1A の破骨細胞分化関連因子に対する影響について mRNA レベル、タンパクレベルで詳細を検討中である (*in vitro*)。さらに今後は、HSPA1A の発現抑制を行ったモデル動物を使用し、矯正歯の移動時の圧迫側歯根膜領域に発現する破骨細胞への影響ならびに歯の移動に対する影響を *in vivo* にて検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Nomura Y, Ishikawa M, Yashiro Y, Sanggarnjanavanich S, Yamaguchi T, Arai C, Noda K, Takano Y, Nakamura Y, Hanada N.

Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. *Histochem Cell Biol.* 2012 137(6) :719-732

査読有

[学会発表](計 2 件)

新井 千博、松澤 匡純、八城 祐一、中村 芳樹  
HSPA1A のヒト歯根膜線維芽細胞に対する影響について  
第 72 回日本矯正歯科学会学術大会、2013 松本

Yashiro Y, Arai C, Wada S, Miyamoto Y, Nakamura Y  
Function of CXCL12 in Periodontal Ligament Fibroblasts  
2<sup>nd</sup> Joint Meeting of the International Bone and Mineral Society and The Japanese Society for Bone and Mineral Research 2013, Kobe, Japan

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 千博 (ARAI CHIHIRO)

鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号：10460221

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし