

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463102

研究課題名(和文) 矯正学的歯の移動速度に対するHSPA1Aの影響の解明

研究課題名(英文) The effect of HSPA1A on the rate 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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、熱ショックたんぱく質A1A(HSPA1A)の矯正学的歯の移動速度に対する影響を調べることである。初めに、培養したヒト歯根膜線維芽細胞に対するHSPA1Aの影響を検討したところ、HSPA1Aは、歯の移動に重要な役割を担うIL6, IL8やTNFなどの炎症性サイトカインを誘導することが明らかになった。次に、HSPA1Aの機能抑制剤を投与したラットにおいて歯の移動実験を行ったところ、抑制していない群に対して抑制群の歯の移動量は有意に減少した。以上より、矯正学的歯の移動にはHSPA1Aが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this project was to examine the effect of heat shock protein A1A (HSPA 1A) on the rate of orthodontic tooth movement. First, we examined the effect of HSPA 1A on cultured human periodontal ligament fibroblasts, which revealed that HSPA 1A induces inflammatory cytokines such as IL6, IL8 and TNF. These cytokines are important factor of the orthodontic tooth movement. Next, we examined the effect of HSPA1A on the rate of orthodontic tooth movement using rat experimental model. The rate of tooth movement was inhibited by functional inhibitor of HSPA1A when compared with control group. These results indicated that the HSPA1A may participate in the orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：HSPA1A 矯正学的歯の移動

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、矯正学的歯の移動を行ったラット歯根膜の圧迫側領域に、熱ショックタンパク質 A1A (HSPA1A) が著しく発現することを報告してきた。細胞内で発現する HSPA1A は分子シャペロンとして様々なストレスから細胞を守る働きがあることから、歯の移動により圧迫側で起こるメカニカルストレスや虚血による酸欠状態から細胞を守るために発現していることが推察される。HSPA1A は細胞の保護作用だけでなく、アポトーシスの抑制や抗炎症作用を有していることが示唆されている。そこで我々は、歯周病病原菌である *P.gingivalis* 由来のリポ多糖 (LPS) で炎症性サイトカインを誘発させた歯根膜線維芽細胞に HSPA1A を作用させる実験を行ったところ、炎症性サイトカインの発現を抑制する所見を得た。矯正学的歯の移動においても、圧迫側歯根膜では炎症性サイトカインが発現しており、破骨細胞の分化誘導や歯の移動にとって重要な因子であることが報告されている。したがって、同部位で発現する HSPA1A は、炎症性サイトカインの発現を抑制していることが考えられる。このことから、矯正学的歯の移動時に圧迫側歯根膜に発現する HSPA1A を抑制することで、炎症性サイトカインの発現抑制をすることなく破骨細胞の分化誘導を促し、結果として矯正学的歯の移動速度を上げる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 培養ヒト歯根膜線維芽細胞に対する HSPA1A の影響やそのメカニズムを詳細に検討する (in vitro)。(2) HSPA1A の機能を特異的に抑制する Pifthrin- μ (2-phenylethynesulfonamide) を用いてラットにおける矯正学的歯の移動量および破骨細胞の形成や吸収状態を組織学的に、また炎症性サイトカインなどの影響を遺伝子およびタンパクレベルで詳細に検討する (in vivo)。

3. 研究の方法

(1) 培養実験

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 50, 100, 300ng/mL) を添加し、IL8 の発現量を mRNA レベルで解析し、条件の検討を行った。次に IL6, IL8 および TNF α の発現を定量 PCR により mRNA レベルで、ELISA 法によりタンパクレベルで解析した。また、Toll 様受容体 4 (TLR4) の選択的阻害剤である TAK-242 (1 μ M) を作用させ、同様の実験を行った。さらに、NF κ B p65 のリン酸化をウエスタンブロッティングによりタンパクレベルで解析した。

(2) 動物実験

矯正学的歯の移動モデルラットの作製

12 週齢 Wistar 系雄性ラットの左右上顎第一臼歯を Ni-Ti クローズドコイルスプリング (10gF) を用いて近心に移動した。実験群と対照群に分け、実験群には歯の移動開始前日から、HSPA1A の選択的機能抑制分子である Pifthrin- μ (3 mg/kg) を腹腔内投与、対照群には偽薬を 2 日に 1 回、腹腔内投与を行った。

歯の移動距離の計測

移動開始から 1 週間および 2 週間後にマイクロ CT を撮影し、解析ソフトを用いて歯の移動距離を計測した。

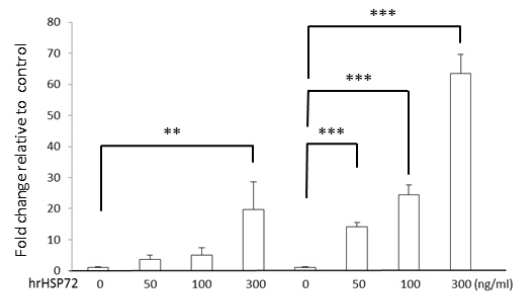
組織学的および免疫組織学的検討

歯の移動開始 6 時間、24 時間、1 週間および 2 週間後に還流固定を行い、脱灰後にパラフィン包埋を行い、薄切切片を作製した。HE 染色、アルカリフォスファターゼ染色および炎症性サイトカインの免疫染色を行い、観察する。

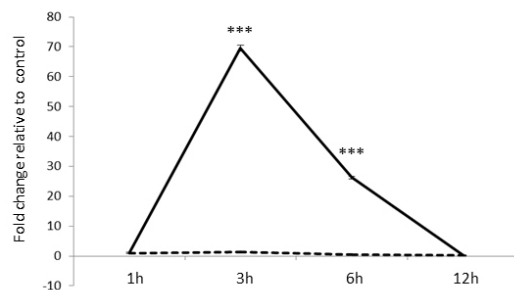
4. 研究成果

ヒト歯根膜線維芽細胞に rhHSPA1A を添加したところ、IL8 mRNA の発現が濃度依存的に増加した。この発現は培養液中に 10% FBS を含有した群で顕著であった (下図 A)。IL8 mRNA の発現量は、添加後 3 時間でピークを示した (下図 B: 実線が rhHSPA1A 添加群 点線は対照群)。

A



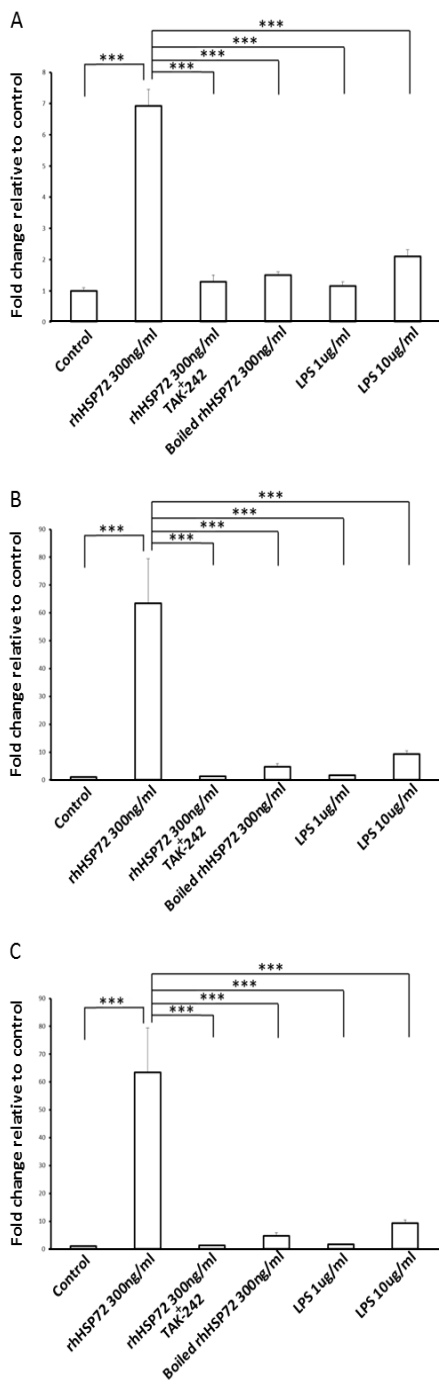
B



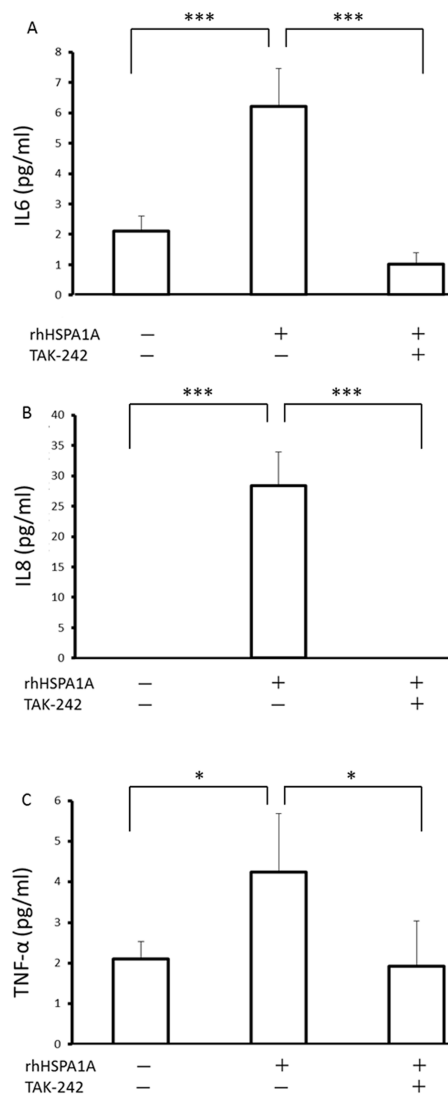
次に、IL6、IL8 および TNF α の発現量を定量 PCR により mRNA レベルで解析したところ、rhHSPA1A (300ng/ml) の添加により、著しい発現が認められた。この発現量は、LPS (1 μ g/ml および 10 μ g/ml) が誘発する炎症性サイトカインの発現量よりも有意に高かった。

一方、TLR4 の選択的阻害剤である TAK-242

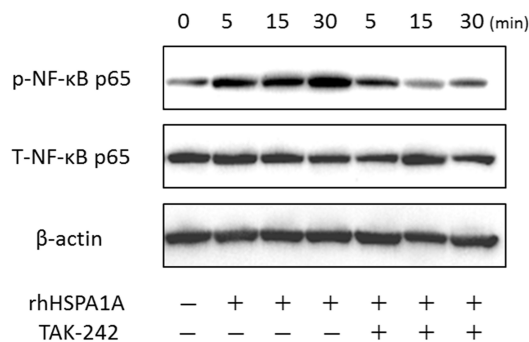
を作用させた群では、rhHSPA1A による *IL6*、*IL8* および *TNF α* の発現は抑制された(下図)。



ELISA 法によりタンパク質レベルで解析したところ、rhHSPA1A(300ng/ml)添加 24 時間後の *IL6*、*IL8* および *TNF α* の発現量は対照群と比較して有意に増加した。一方、TAK-242 を作用させた群では *IL6*、*IL8* および *TNF α* の発現に変化は認められなかった(右上图)。



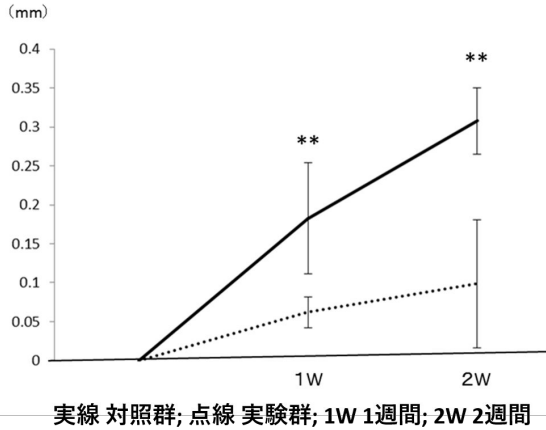
さらに、NF κ B のリン酸化を調べたところ、HSPA1A の添加後 5 分後にリン酸化が増加したが、TAK-242 を作用させた群に変化は認められなかった(下図 p-NF- κ B p65)。



以上の結果より、細胞外の HSPA1A は、歯根膜線維芽細胞膜上に存在する受容体である TLR4 に結合し、NF κ B p65 のリン酸化を介して炎症性サイトカインの発現を誘導することが示唆された。これは、我々が申請時に予想していた結果と逆になるが、他の細胞を用いた過去の論文と一致する所見である。

(2) 動物実験

ラットの上顎第一臼歯を10gの矯正力で近心に移動したところ、HSPA1Aの選択的機能抑制剤であるPifthrin- μ を投与した実験群では、移動開始から1週間、2週間共に対照群と比較して移動距離が有意に少なかった(下图)。



一方、移動開始2週間後のHE染色による組織学的所見では、両群に明らかな差は認められなかった(下图A:対照群、B:実験群)。



対照群の上顎第一臼歯中央口蓋根の水平断切片
b:歯槽骨 p:歯根膜 d:歯 矢印:歯の移動方向



実験群の第一臼歯中央口蓋根の水平断切片
b:歯槽骨 p:歯根膜 d:歯 矢印:歯の移動方向

以上の結果より、矯正学的歯の移動にHSPA1Aが関与する可能性が示唆された。

現在、歯の移動開始6時間、24時間、1週間および2週間後の組織学的および免疫組織

学的検討を行っているところである。

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)

M Matsuzawa, C Arai, Y Nomura, T Murata, Y Yamakoshi, S Oida, N Hanada, Y Nakamura
Periostin of human periodontal ligament fibroblasts promotes migration of human mesenchymal stem cell through the α 3 integrin/FAK/PI3K/Akt pathway
J Periodontal Res. 2015 Dec;50(6): 855-863: doi: 10.1111/jre.12277.
査読有

[学会発表](計 4 件)

新井 千博、川合 暢彦、下田 信治、田中 栄二、中村 芳樹
矯正学的歯の側方移動に対する低出力超音波パルス(LIPUS)照射の効果
第75回日本矯正歯科学会大会、2016年11月7日~9日 アスティとくしま(徳島県徳島市)

新井 千博、松澤 匡純、中村 芳樹
細胞外のHSPA1Aは歯根膜線維芽細胞に作用してIL6およびIL8の発現を誘導する
第74回日本矯正歯科学会大会、2015年11月18日~20日 福岡国際会議場・マリンメッセ(福岡県福岡市)

松澤 匡純、新井 千博、山越 康雄、八城 祐一、大井田 新一郎、中村 芳樹
歯根膜線維芽細胞に発現するペリオスチンの間葉系幹細胞に対する作用について
第73回日本矯正歯科学会大会、2014年10月20日~22日 幕張メッセ(千葉県千葉市)

松澤 匡純、新井 千博、中村 芳樹
歯根膜におけるペリオスチンの機能について
第32回日本骨代謝学会学術集会、2014年7月24日~26日 大阪国際会議場(大阪府大阪市)

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

野村 義明(NOMURA YOSHIAKI)
鶴見大学・歯学部・准教授
研究者番号: 90350587

中村 芳樹(NAKAMURA YOSHIKI)
鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：10097321

花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916