

原 著

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

前田 隆 亀田 剛 亀田 晃

日本歯科大学新潟歯学部歯科矯正学教室

Takashi MAEDA, Takashi KAMEDA and Akira KAMEDA

The Nippon Dental University School of Dentistry at Niigata, Department of Orthodontics

キーワード：ヒト歯根膜細胞, 持続的圧縮力, 熱ショックタンパク質, メカニカルストレス

細胞に化学物質もしくは物理的な刺激などのストレスが作用すると、それに対する適応機構や生体防御機構として熱ショックタンパク質 (HSP) が産生される。HSP は、さまざまな細胞において各種ストレスにより産生が促進されることが知られている。本研究は、矯正治療における歯の移動時に重要な役割を演じていると思われるヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) に対して持続的圧縮力 (CACF) を負荷し、細胞のタンパク質の産生、特に HSP の産生にどのような影響を及ぼすのかについて研究し、以下の結果を得た。

1. HPLF は、 1 g/cm^2 の持続的圧縮力を 24 時間負荷した時に最も高いアルカリ性フォスファターゼ活性を示した。

2. HPLF に CACF を負荷して細胞のタンパク質の発現を SDS-PAGE で解析した結果、分子量 30~100 kDa のタンパク質産生の促進が認められた。

3. ウェスタンブロット法により、CACF は HPLF の HSP 60, 70, 90 の産生を促進させることが示された。CACF を負荷しなかった群と比較して、それぞれのタンパク質の産生量は約 6.8 倍、約 1.7 倍、約 5.8 倍となった。

以上の結果から、HPLF に CACF を負荷させると、細胞内タンパク質の産生に変化が見られることがわかった。その中でも HSP 60, 70, 90 の産生が促進され、これらがメカニカルストレスに対し、歯根膜線維芽細胞の生体防御機構としての役割を担っていることが示唆された。

(日矯歯誌 56(5) : 296~302, 1997)

Loading of continuously applied compressive force enhances production of heat shock protein 60, 70 and 90 in human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells

Heat shock protein (HSP) is produced by various types of cells. Exposure of the stresses such as chemicals or physical stimulation etc. enhances HSP production, and they can function on cells to adapt to or protect them from such stresses. In orthodontic treatment, periodontal ligament cells play important roles during tooth movement. In this study, we examined the effect of continuously applied compressive force (CACF), that are thought as an optimal orthodontic force, on HSP production in human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells (HPLF) in vitro. The results obtained were as follows :

1. Alkaline phosphatase activity in HPLF was shown as the highest level when cultured for 24 hours under CACF of 1 g/cm^2 .

2. Thirty to one hundred kDa intracellular protein production were enhanced by the loading of CACF (1 g/cm^2) on HPLF as compared to that in non-loading groups using SDS-PAGE.

3. Western blot analysis demonstrated that CACF (1 g/cm^2) loading enhanced the production of HSP60 (approx. 6.8-fold), 70 (approx. 1.7-fold) and 90 (approx. 5.8-fold) compared to non-loading groups.

These data demonstrate that CACF loading enhances the intracellular protein production, such as HSP60, 70, and 90, in HPLF, and may shed new light on our understanding of the cellular mechanism dur-

ing orthodontic tooth movement.

(J. Jpn. Orthod. Soc. 56(5) : 296~302, 1997)

緒 言

歯科矯正治療は、歯に最適な矯正力を負荷することにより迅速、安全かつ確実に歯を移動させて、個体にとって最適な咬合を確立することを目的としている。周知のとおり、歯の移動には、歯槽骨や歯根膜を構成する細胞が深く関与しているが、中でも、歯根膜は矯正力による歯の移動を考える上できわめて重要であることから、歯根膜を構成する細胞に対するメカニカルストレスの影響を検索することは、歯の移動のメカニズムを知るために必要不可欠である。つまり、歯根膜はメカニカルストレスによって刺激を受けているにもかかわらず歯の移動に関与している。これは、ストレスによって産生されるタンパク質になんらかの関与をしているのではないかと考えられる。

一般には、細胞に熱や化学物質もしくは物理学的な刺激などのストレスが作用すると、それに対する適応機構や生体防御機構としてストレスタンパク質と呼ばれるタンパク質が細胞内に産生される。熱ショックタンパク質 [Heat shock protein (以下 HSP と略す)] は、さまざまな細胞において各種ストレスにより産生が促進されることが知られている¹⁻³⁾。そこで本研究は、ヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 [Human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells (以下、HPLF と略す)] に対してメカニカルストレスとして持続的圧縮力 [Continuously Applied Compressive Force (以下、CACF と略す)] を負荷し細胞内タンパク質の産生、特に HSP の産生にどのような影響を及ぼすのかについて研究した。

材料ならびに方法

I. 細胞ならびに培養方法

実験に用いたヒト歯根膜由来線維芽細胞様

細胞 (HPLF) は 11~14 歳の矯正患者より矯正治療のために抜去された健全な小臼歯から Somerman ら⁴⁾の方法により採取した。まず、抜去された小臼歯をリン酸緩衝液 [PBS(-), 0.14 M NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, pH 7.4, 日水製薬社, 東京] で洗浄し可及的に血液を除去した。ついで、他の組織の混入を防ぐために歯根の中央部 1/3 から歯根膜の組織片を採取した。その組織片を 1 mm 角の大きさに切断し、20%ウシ胎仔血清 (FCS; HyClone Laboratories Incorporated, Utah, U. S. A.) 50 µg/ml アスコルビン酸, 50 単位/ml ペニシリン, 500 µg/ml ストレプトマイシン添加グルベッコ改変イーグル最小培養液 (DMEM; Grand Island Biological Corporation, New York, U. S. A.) 中で 37°C, 5%炭酸ガス

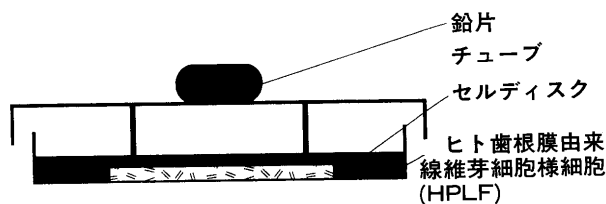


図 1 持続的圧縮力の加圧方法

1×10⁵個のヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) をドロップイノキュレーションにて播種し、HPLF 上に 24 時間、直径 30 mm のセルディスクを置き、その上にプラスチック製のチューブ、プラスチックシャーレの上蓋を載せ、さらにその上に負荷物として鉛片を載せた。

培養器 (Forma Scientific Incorporated, Ohio, U. S. A.) を用いて 5%CO₂/95%air の環境下で培養した。3 週間後、組織片よりアウトグロースした細胞をトリプシン処理し継代を続け HPLF とした。HPLF は、継代 4~6 代の細胞を実験に用いた。

II. CACF の加圧方法

CACF は、直径 35 mm のプラスチックシャーレに 1×10⁵個の HPLF をドロップイノキュレーションした。HPLF がコンフルエントになってから Brunnette ら⁵⁾の方法に準拠して負荷した (図 1)。まず、コンフルエントの HPLF 上に直径 30 mm のセルディスク (住友ベークライト社, 東京) を載せた。この状態を CACF の負荷していない状態とした。さらに、その上にプラスチックチューブ、プラスチックシャーレの上蓋、負荷物 (鉛) を図 1 のように載せることにより CACF を負荷した。圧縮力の大きさはプラスチックシャーレの上蓋、プラスチックチューブ、負荷物の重量の合計とした。

III. CACF のヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) のアルカリファスファターゼ活性 (ALPase 活性)

ALPase 活性は、Lowry ら⁶⁾の方法に準じて測定した。HPLF に CACF を負荷し 24 時間培養した後、細胞層を PBS(-) で洗浄し、アルカリフォスファターゼ抽出液 (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM MgCl₂, 0.1% Nonidet P-40, pH 7.4) を加え上清をアルカリフォスファターゼ測定のため抽出液とした。反応は、0.1 ml の抽出液を 16 mM p-ニトロフェニルホスフェート (p-NPP) と 0.4 mM MgCl₂ を含む AMP バッファー (0.4 ml) に添加し 37°C, 1 時間、インキュベートして行った。反応は、0.25 ml の 0.25 M NaOH を反応液に添加して停止させた。生成された p-ニトロフェノール (p-nitrophenol; p-NP) を分光光度計 (UV160, 島津製作所, 京都) を用いて 410 nm の波長で測定し

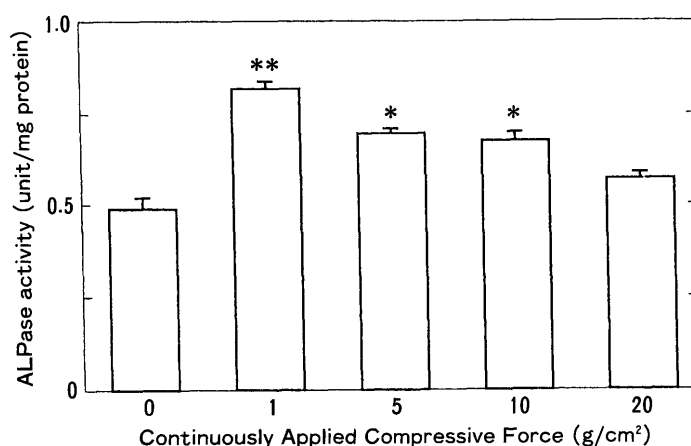


図2 維持的圧縮力がHPLFのアルカリフォスファターゼ活性に対する影響

24時間、ヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞(HPLK)に0, 1, 5, 10, 20 g/cm²の持続的圧縮力を負荷しアルカリフォスファターゼ活性を測定した。(N=7, mean±S.D.)
また、ALPase活性の酵素活性は1時間当たり1 μmolのpNPを生成する酵素量を1 unitとした。

た。なお、標準液にはp-ニトロフェノール (Sigma Chemical Company, Missouri, U. S. A.)を使用した。ALPase活性は1時間当たり1 μmolのp-NPとして求めた。また、ALPaseの値と比較するに当たってはtotal proteinあたりの量と比較した。

IV. 細胞内タンパク質の解析

細胞内タンパク質は、Laemmli⁷⁾の方法に準じて抽出しSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)により解析した。まず、CACFを24時間負荷した細胞層を20 mMリン酸バッファー (pH 7.4)で2回洗浄し、1 mlの20 mM NaK-PO₄ (pH 7.4)の存在下でラバーポリスマンを用いて回収した。回収した細胞の浮遊液は、氷冷下でホモジナイズし細胞を破壊した。この細胞破壊液は、サンプルバッファー (0.25 M Tris-HCl, pH 6.8, 10% SDS, 0.5 M DTT, 0.5% Bromophenol blue, 50% Glycerol)と混ぜて95°Cで3分間熱処理し、10 μgを各試料とした。電気泳動は、0.1% SDS含有12%ポリアクリルアミドゲルを用い、0.1% SDS含有25 mM Tris-0.19 M glycine緩衝液 (pH 8.3)を泳動液としてゲル1枚につき25 mA (定電流)で行った。泳動終了後、クマシーブリリアントブルー (和光純薬工業社、大阪)で染色し泳動パターンを解析した。

V. 熱ショックタンパク質の解析

熱ショックタンパク質の産生の解析には、ウェスタン解析 (Western Blot analysis)により行った。すなわち、細胞内タンパク質をポリアクリルアミドゲルで分画しニトロセルロース膜 (CELLULOSE NITRATE, BA85-0.45 μm, Schleicher & Schuell,

Dassel, Germany)に電極間距離1 cm当たり7 Vの定電圧で転写した。タンパク質を転写したニトロセルロース膜は、1% BSA-TBST2 (50 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 0.05% Tween 20, pH 7.6)で1時間ブロッキングした後に1次抗体 (抗HSP60, 70, 90)を1時間反応させた。1次抗体は抗HSP60 (Monoclonal Anti-Heat Shock Protein 60 Clone LK-2: Sigma Chemical Company, Missouri, U. S. A.), 抗HSP70 (Clone BRM-22), 抗HSP90 (Clone AC-16)を用いた。1次抗体を反応させた後にニトロセルロース膜をTBST2で洗浄した後、アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG (AP-抗mIgG: Sigma Chemical Company, Missouri, U. S. A.)を作用させた。その膜はTris buffered saline (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4)で洗浄後にsubstrate buffer (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5)に置換した。その後、NBT (nitroblue tetrazolium chloride, Grand Island Biological Corporation, New York, U. S. A.)とBCIP (5-bromo-4-chloride-3-indolylphosphate p-toluidine salt, Grand Island Biological Corporation, New York, U. S. A.)を反応させHSPのタンパク質バンドを検出した。

結 果

I. CACFがヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞(HPLF)のALPase活性に及ぼす影響

HPLFに0, 1, 5, 10, 20 g/cm²のCACFを負荷した結果、HPLFのALPase活性は1 g/cm²のCACFを負荷した群において最も著明に上昇した (図2)。また、ALPase活性の酵素活性は1時間当たり1 μmol

の pNP を生成する酵素量を 1 unit として表しました。

II. CACF が HPLF のタンパク質の産生に与える影響

HPLF に 1 g/cm^2 の CACF を 24 時間負荷して細胞内タンパク質の産生の変化を調べた結果、CACF を負荷させることにより細胞内タンパク質の産生が促進していることが伺えた。特に、30 kDa-100 kDa 付近でバンドの増強がみられた(図 3)。その中でも、特に 60, 70, 90 kDa 付近のタンパク質の産生の促進が著明であった。

III. HPLF の熱ショックタンパク質 (HSP) の産生に対する CACF の影響

1 g/cm^2 の CACF を 24 時間負荷し HPLF から抽出したタンパク質に対して HSP 60, 70, 90 に対する抗体を用いてウェスタン解析を行った。その結果、CACF の負荷により HPLF の HSP 60, HSP 70, HSP 90 の産生の促進が認められた。また、CACF を負荷しない時においても認められた。それらの産生は、CACF を負荷しなかった群に対してそれぞれ約 6.8 倍、約 1.7 倍、約 5.8 倍に促進されていた(図 4)。

考 察

歯科矯正治療は、歯に最適な矯正力と考えられている持続的な弱い力を与えることにより効率良く歯槽骨や歯根膜を構成する細胞を活性化または不活性化し、

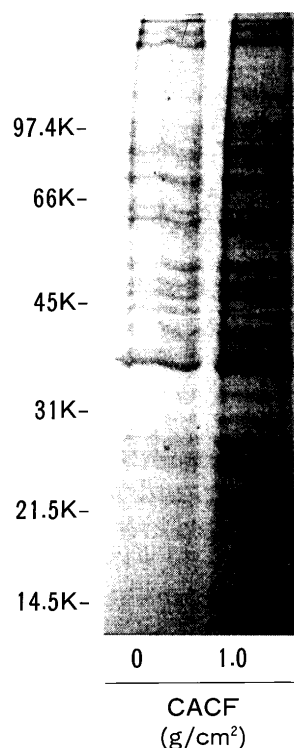


図 3 持続的圧縮力 (CACF) が HPLF のタンパク質産生に対する影響

ヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) に 24 時間、持続的圧縮力 (0 g/cm^2 , 1 g/cm^2) を負荷し抽出したタンパク質 ($10 \mu\text{g}$) を 12%ポリアクリルアミドゲルにて 25 mA で 2 時間、電気泳動を行った。

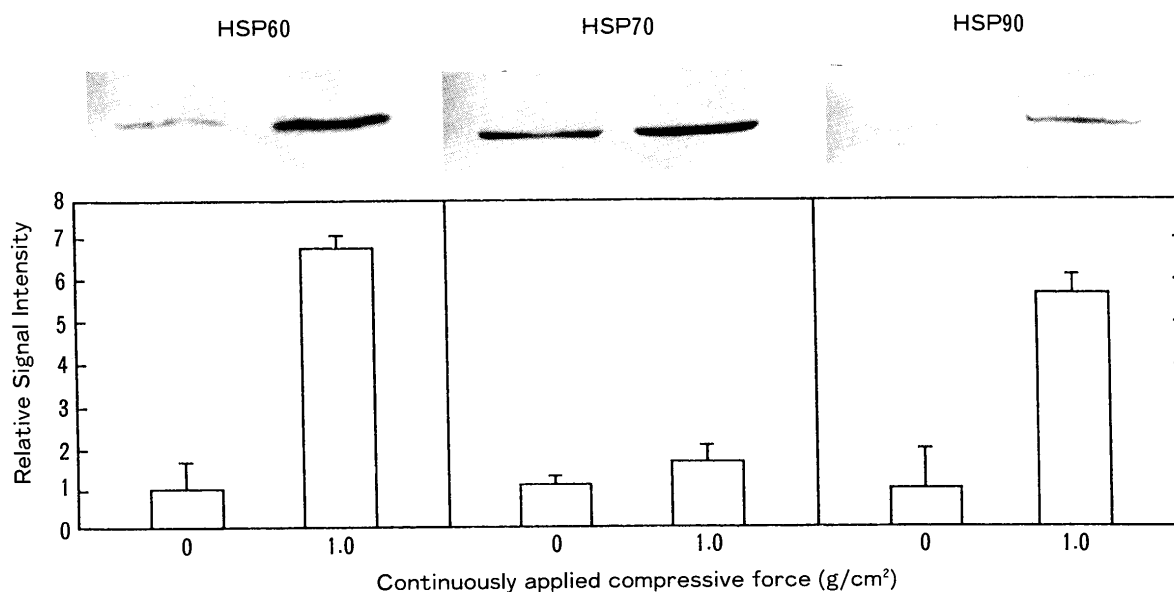


図 4 持続的圧縮力 (CACF) が HPLF の熱ショックタンパク質に与える影響

上段はヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) に 24 時間、持続的圧縮力 (0 g/cm^2 , 1 g/cm^2) を負荷し HSP60, HSP70, HSP90 の抗体を用いたウェスタン解析 ($10 \mu\text{g}$ /タンパク質を 22.5 mA, 1 時間転写した) を示す。下段は HPLF に 24 時間、持続的圧縮力 (0 g/cm^2 , 1 g/cm^2) を負荷した時のタンパク質産生の比較を示す。(n=5, mean $\pm$ S. D.)

すみやかにかつ安全確実に歯を個体にとって最適な位置へ移動させることを目的としている。その実現のためには、歯の移動に関わっている細胞の矯正力に対する生化学的もしくは分子生物学的な解析が必要不可欠である。また、矯正力によって歯根膜がどのように反応しているのか細胞内刺激伝達経路を調べる目的で細胞内タンパク質の産生を調べる必要がある。そこで、本研究は、CACFを負荷することにより、培養したヒト歯根膜線維芽細胞様細胞 (human periodontal ligament-derived fibroblast-like cells; HPLF) のタンパク質の産生がどのように変化するかについて解析した。

In vitro で培養細胞に対して矯正力を再現するために今までにさまざまな方法が試みられてきた。代表的なものとしては、伸展力⁸⁾、静水圧⁹⁾、遠心力¹⁰⁾を利用した方法などがある。しかし、どの方法も一長一短であり、矯正力の再現というには多少なりとも問題がある方法であった。本研究では、その中でも臨床的に用いられる矯正力に近い状態を再現していると思われる方法²⁵⁾として、図1のように細胞層上に負荷物を載せることにより HPLF に CACF を負荷することにした。HPLF は、線維芽細胞と類似した形態を示す。一方で、*in vitro* において石灰物形成能を示し²⁶⁾線維芽細胞と比較して高い ALPase 活性をもち骨芽細胞に近い細胞であると考えられている。そこで、HPLF の ALPase 活性を最も上昇させた CACF (1 g/cm²) をメカニカルストレスに対して高い反応を示す状態として、HPLF のタンパク質の産生に対する影響を解析した。その結果、HPLF に 1 g/cm² の CACF を負荷することにより、30 から 100 kDa のタンパク質の産生が促進されることがわかった。メカニカルストレスの負荷により、骨芽細胞ではインターロイキン 1 やプロスタグランジン E₂ の産生が促進し、さらに 1 kDa 以下や 5 から 20 kDa および 50 から 60 kDa のタンパク質の産生が促進されることが報告されている^{11~15)}。これらの分子量と HPLF において産生が促進されたタンパク質の分子量は必ずしも一致しなかった。このことから、メカニカルストレスのタンパク質産生に対する反応の少なくとも一部は、骨芽細胞と HPLF で異なるものと考えられる。

一般に、細胞がストレスに曝されると、そのストレスにより破壊や変性されたタンパク質の再生のために熱ショックタンパク質 (heat shock protein; HSP) の産生が促進される。それだけでなく、最近ではストレス下だけでなく非ストレス下においても HSP が分子シャペロンとしてタンパク質の折り畳みや会合状態を制御していることが知られている^{16~19)}。そこで、HPLF における CACF を負荷した時としない時の HSP の産生について調べた。その結果、CACF を負荷することにより HSP 60, 70, 90 の産生に促進がみられ、特に HSP 60 と 90 で著明であった。これらの産生

は CACF を負荷しない際にも存在していた。

HSP は、その種類によって細胞内における役割が異なる。本研究において著明に産生が促進された HSP 60 は、ストレスに対する防御機構において重要な役割を担うことが知られている^{16~19)}。過度の矯正力を歯に与えた時に圧迫側で硝子様変性が起こる。これに対して、最適な矯正力を与えた時には、圧迫側でそのような極度の病理学的な組織変化はみられないものの、歯根膜組織は貧血などを起こすことが知られている。HPLF において、HSP 60 の産生が促進されたことは、すみやかで安全確実な歯の移動を実現するための矯正力であっても、歯の周囲の組織に少なからずストレスを与え、そのストレスによりタンパク質の破壊や変性が起きていることを裏付けるものなのかもしれない。そうであるとすれば、たとえ最適な矯正力といわれるような弱い矯正力であっても、歯の周囲の組織における変化を念頭に置き、治療に当たり細心の注意をすべきである。

HSP 60 に対して HSP 70 はストレスにより変性されたタンパク質を感知するセンサーとして働くことが知られている^{16,20~23)}。本研究において、HSP 70 は、HSP 60 や 90 と比較すると CACF に対する産生の促進は少量であった。本研究では、HPLF の CACF を 24 時間負荷するという条件に固定したため、HSP 70 の産生の促進があまりみられなかった。この点を明らかにするために今後、経時的な産生量の変化について調べる必要がある。いずれにしても、HPLF において HSP 70 がメカニカルストレスによって変性されたタンパク質のセンサーとなるかどうかはきわめて興味深い。

HSP 60 や 70 に対して HSP 90 における重要な働きの 1 つは、さまざまなタンパク質や物質との相互作用である。特に HPLF において注目すべきは、カルシウムとの結合能である。HPLF にメカニカルストレスを負荷するということは、歯に矯正力を与えた時の圧迫側を再現することになる。通常、圧迫側では骨形成が抑制され骨吸収が促進する。本研究では、メカニカルストレスを負荷することにより HPLF の ALPase 活性が上昇し HSP の産生が著明に促進された。この結果は、*in vivo* での圧迫側でみられる結果とは反対に、メカニカルストレスにより HPLF がより骨芽細胞に近い性質になり骨形成を行うようにも解釈できる。また、HSP 90 がカルシウムと結合することによりカルシウム依存性のシグナル伝達の抑制や何らかの細胞内シグナル伝達の制御を行うことにより骨形成の促進を抑えている可能性も考えられる。そのため、本研究の結果が *in vivo* での圧迫側でみられる結果と一概に一致しないとは断定できない。

本研究では、HPLF においてメカニカルストレスを負荷しない状態においても HSP 60, 70 および 90 の産生が認められた。これらは、メカニカルストレス負荷

時の HSP とは異なり細胞が生存していくため、もしくは、通常の機能を発現する上で重要な役割を担うものと考えられる。他の細胞と同様に、HPLF においても HSP は他のタンパク質との相互作用という点において分子シャペロンとして重要な機能を担っていると考えられる^{16,25)}。

一般的に、分子シャペロンとは、細胞がストレスに対応するために細胞内にストレスタンパク質を作り、防御機構としてタンパク質の折り畳みや会合状態を制御して構造体の形成を助けている因子といわれている。歯根膜線維芽細胞のメカニカルストレスに対する反応を生化学的・分子生物学的に解明していくことは、矯正治療において歯の移動を行う際の歯根膜の役割を知る上できわめて重要といえる。今後 HSP だけでなく、歯根膜線維芽細胞においてメカニカルストレスにより発現が促進もしくは抑制されるタンパク質や遺伝子を明らかにしていくことは、より迅速かつ安全で確実な矯正治療を実現していくうえで必要不可欠であろう。

結 論

矯正治療により必要抜去した健全な小臼歯由来のヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞 (HPLF) を培養し、CACF が及ぼす影響を細胞内タンパク質の産生を解析することにより検討した。

その結果、

1) HPLF は CACF を 1 g/cm^2 で 24 時間負荷した時に最も高い ALPase 活性を示した。

2) HPLF に CACF を負荷して細胞内タンパク質の発現を SDS-PAGE で解析した結果、30~100 kDa のタンパク質の産生の促進が認められた。

3) HPLF における CACF の HSP 60, HSP 70, HSP 90 の産生に対する影響をウェスタン解析を用いて検討したところ、HSP 60, HSP 70, HSP 90 の産生が促進された。産生の促進は CACF を負荷しなかった群に対してそれぞれ約 6.8 倍、約 1.7 倍、約 5.8 倍であった。

以上の結果より、ヒト歯根膜由来線維芽細胞様細胞において CACF を負荷することにより細胞内タンパク質の産生に変化がみられることがわかった。特にその中でも HSP 60, 70, 90 の産生が促進され、HPLF において、これらがメカニカルストレスに対し重要な役割を担っていることが示唆された。

文 献

- 1) Leung, D. Y. M., Glagov, S. and Mathews, M. B.: A new *in vitro* system for studying cell response to mechanical stimulation, *Exp Cell Res* 109 : 285-298, 1977.
- 2) Leung, D. Y. M., Glagov, S. and Mathews, M.

- B.: Cyclic stretching stimulates synthesis of matrix components by arterial smooth muscle cells *in vitro*, *Science* 191 : 475-477, 1976.
- 3) Pouyssegur, J., Shiu, P. R. C. and Pastain I.: Induction of two transformation-sensitive membrane polypeptides in normal fibroblasts by a block in glycoprotein synthesis or glucose deprivation, *Cell* 11 : 941-947, 1977.
- 4) Somerman, M. J., Archer, S. Y., Imm G. R. and Foster, R. A.: A Comparative study of human periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*, *J Dent Res* 67 : 66-70, 1988.
- 5) Brunnette, D. M., Kanoza, R. J. and Marmary, Y.: Interactions between epithelial and fibroblast-like cells in cultures derived from monkey periodontal ligament, *J Cell Sci* 27 : 127-140, 1977.
- 6) Lowry, O. H., Roberts, N. R., Wu M-L, Hixon, W. S. and Crawford, E. J.: The quantitative histochemistry of brain, *J Biol Chem* 207 : 19-37, 1954.
- 7) Laemmli, U. K.: Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄ *Nature* 227 : 680-685, 1970.
- 8) Hasegawa, S., Sato, S., Suzuki, Y. and Brunnette, D. M.: Mechanical stretching increases the number of cultured bone cells synthesizing DNA and alters their pattern of protein synthesis, *Calcif Tissue Int* 37 : 431-436, 1985.
- 9) 相馬俊一: 成長期のウサギ鼻中隔、蝶後頭軟骨結合、下顎頭より分離した軟骨培養細胞の増殖、分化機能に対する静水圧の影響、*阪大歯誌* 34 : 8-25, 1989.
- 10) 小森 成, 鈴木弘之: ヒト由来骨芽細胞様細胞に対する遠心力負荷の影響に関する研究, *日矯歯誌* 50 : 448-457, 1991.
- 11) Binderman, I., Shimshoni, Z. and Somjen, D.: Biochemical pathways involved in the translation of physical stimulus into biological message, *Calcif Tissue Int* 36 : 82-85, 1984.
- 12) Leung, D. Y. M., Glagov, S. and Mathews, M. B.: A new *in vitro* system for studying cell response to mechanical stimulation: Different effects of cyclic stretching and agitation on smooth muscle cell biosynthesis, *Exp Cell Res* 109 : 285-298, 1977.
- 13) Sandy, J. R., Meghji, S., Scutt, A. M., Harvey, W., *et al.*: Murine osteoblasts release bone-resorbing factors of high and low molecular weights stimulation by mechanical deforma-

- tion, Bone and Mineral 5 : 155-168, 1989.
- 14) Kawase, T., Sato, S. and Miake, K. : Alkaline phosphatase of human periodontal ligament fibroblast-like cells, Adv Dent Res 2 : 234-239, 1988.
 - 15) Graig, E. A. and Gross, C. A. : Is hsp 70 the cellular thermometer?, TIBS 16 : 135-140, 1991.
 - 16) Baler, R., Welch, W. J. and Voellmy, R. : Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured protein : hsp 70 as a potential autoregulatory factor, J Cell Biol 117 : 1151-1159, 1992.
 - 17) Hightower, L. E. : Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity, Cell 66 : 191-197, 1991.
 - 18) Skowrya, D., Georgopoulos, C. and Zylicz, M. : The E. coli dnaK gene product, the hsp 70 homolog, can reactivate heat-inactivated RNA polymerase in an ATP hydrolysis-dependent manner, Cell 62 : 939-944, 1990.
 - 19) Neupert, W., Hartl, F. U., Craig, E. A. and Pfanner, N. : How do polypeptides cross the mitochondrial membranes?, Cell 63 : 447-450, 1990.
 - 20) Gross, C. A., Straus, D. B. and Erickson, J. W. : The function and regulation of heat shock proteins in escherichia coli. "Stress proteins in biology and medicine" (edited by Morimoto RI, Tissieres A, Georgopoulos C, 1990, 167-189, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 21) Welch, W. J. : The mammalian stress response cell physiology and biochemistry of stress proteins. "Stress proteins in biology and medicine" (edited by Morimoto RI, Tissieres A and Georgopoulos C) 1990, 223-278, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
 - 22) Morimoto, R. I., Tissieres A and Georgopoulos C : The biology of heat shock proteins and molecular chaperones (edited by Harbor Laboratory Press) New York, 1994.
 - 23) Sanchez, E. R., Toft, D. O., Schlesinger, M. J., and William, B. P. : Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein. J Biol Chem 260 : 12398-12401, 1985.
 - 24) Wiech, H., Buchner, J., Zimmermann, R. and Jakob, U. : HSP 90 chaperones protein folding *in vitro*, Nature 358 : 169-170, 1992.
 - 25) 金井鐘秀, 野原廣美, 花田晃治 : 持続的加圧刺激がヒト歯根膜線維芽細胞に及ぼす初期効果について, 日矯歯誌 51 : 153-163, 1992.
 - 26) 辻 上弘, 出口眞二, 菅谷 彰, 茂木信道, 他 : ヒト歯周組織由来細胞における細胞凝集塊 (スフェロイド) の形成, 日歯周誌 37 : 294-301, 1995.

主 任 : 亀 田 晃 教授 1997 年 5 月 7 日 受付

連絡先 : 前 田 隆

日本歯科大学新潟歯学部歯科矯正学教室

〒 951 新潟市浜浦町 1-8