

原 著

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

岡崎 雅子・清水 義之・千葉 美麗
三谷 英夫

東北大学大学院歯学研究科歯科学専攻発達加齢・保健歯科学講座顎発達・咬合形成学分野
(主任: 三谷英夫教授)

Expression of heat shock proteins induced by cyclical stretching stress in human periodontal ligament fibroblasts

Masako Okazaki, Yoshiyuki Shimizu, Mirei Chiba
and Hideo Mitani

*Department of Orthodontics, School of Dentistry,
Tohoku University (Chief: Prof. Hideo Mitani)*

Abstract: The purposes of this study were to examine the induction of heat shock proteins (HSPs) 47, 60, and 70 in human periodontal ligament fibroblasts (PDLFs) subjected to cyclical stretching stress *in vitro* and to elucidate the expression of HSPs in periodontal tissue subjected to mechanical stress. PDLFs obtained from healthy human premolars, freshly extracted from 4 orthodontic patients, were examined. The PDLFs were incubated in α -MEM medium containing 10% fetal bovine serum and were seeded in 6-well flexible silicon bottom plates coated with type I collagen. Cyclical stretching stress (1 sec stretching/1 sec relaxation, 15% elongation) was applied to the PDLFs for 72 hours. Cell homogenate was subjected to 10% SDS polyacrylamide gel electrophoresis, and HSP production was analyzed by Western blotting methods, using anti-HSP47, 60, or 70 antibody. Two types of HSP production patterns were observed in response to cyclical stretching stress. PDLFs that expressed low alkaline phosphatase (ALPase) activity showed marked increases in HSP47, 60, and 70 production, while PDLFs that expressed high ALPase activity showed no significant change in HSP production. These results indicate that the expression of HSPs is regulated by mechanical stress whereas the expression profile of HSPs differs among the individual types of PDLFs.

Key words: heat shock protein, cyclical stretching stress, periodontal ligament fibroblasts

緒 言

ストレスタンパク質(熱ショックタンパク質; Heat shock protein: HSP)とは、熱ショック、重金属、炎症、ウイルス感染などに伴い、変性タンパク質、異常タンパク質の産生¹⁾やタンパク質の構造変化等²⁾が起きることにより誘導される一連のタンパク質群であ

る。ストレスタンパク質は、種々のタンパク質と複合体を形成することによりストレス環境下でのタンパク変性を防いだり、変性タンパク質の除去や再生に対していわゆる分子シャペロンとしての積極的な働きをすると同時に、正常な状態においてもタンパク質の生合成や細胞内輸送において欠くことの出来ない役割を果たしている^{3,4)}。

歯科矯正治療においては、歯周組織にメカニカルストレスを負荷することによって歯の移動を行うが、歯の移動時の圧迫側および牽引側の歯周組織に存在する様々な細胞には、メカニカルストレスに加えて、局所的な血管組織の圧縮や伸展と歯根膜線維の過剰な圧縮、牽引力により生ずる炎症が引き起こすストレスも加わるものと考えられる。したがって、矯正力による歯の移動時の歯周組織の改造変化機構におけるストレスタンパク質の発現とその動態および役割は非常に興味深いと考えられるが、それに関する知見は少ない。

ヒト歯根膜線維芽細胞 (Periodontal ligament fibroblast: PDLF) のストレスタンパク質の発現に関しては、熱ショックや菌体成分の刺激により HSP47⁵⁾、HSP70⁶⁾ の発現が増強するという報告や、萌出歯胚において I 型コラーゲンの局在と HSP47 の局在が一致しているという報告⁷⁾ がなされている。しかしながら、メカニカルストレスによる誘導に関する研究は、持続的圧縮力によって、HSP60, 70, 90 の産生は促進されるという前田ら⁸⁾ の報告がなされているが、伸展力を負荷した場合の報告は皆無である。骨芽細胞においては、静水圧負荷により骨芽細胞様細胞 MG-63 細胞が HSP70 において熱ショックと同様な反応を負荷直後より示すこと⁹⁾、ニワトリ頭蓋冠より採取した骨芽細胞様細胞が周期的伸展力により HSP73 の発現が増強すること¹⁰⁾ などが報告されている。

そこで本研究では、熱刺激で誘導される代表的なストレスタンパク質として HSP60, 70 を、またコラーゲン合成に関与している HSP47 に関して、*in vitro* で PDLF に周期的伸展力を負荷してこれらの発現を調べることにより、矯正力による歯周組織の改造機構におけるストレスタンパク質の発現誘導を明らかにすることを目的とした。

材料および方法

1. ヒト歯根膜線維芽細胞培養法

PDLF は、臨床的に健全な歯周組織と歯髄を有している 14 歳から 21 歳の治療開始前の矯正患者 4 名より、本研究の趣旨に本人の同意の上で抜去、提供された第一小白歯から採取した。この第一小白歯の歯頸部および歯根部を除く歯根中央 3 分の 1 部分より他の組織が混入しないように歯根膜組織片を剥離し、10% 牛胎仔血清 (FBS; Flow 社) および 100 units/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン (和光純薬) 添加

α -MEM 培養液 (Flow 社) 中で、直径 35 mm の培養ディッシュ (Falcon 社) 上に静置させ、5% CO₂, 37°C インキュベーター中で培養した。歯根膜片から out-growth したほぼ均一な紡錘形を呈している線維芽細胞様細胞をコンフルエントになるまで培養して PDLF を得た。初代培養で時々混入が認められる上皮系の細胞は、0.05% trypsin - 0.02% EDTA を含む、PBS (-) (和光純薬) の処理時間の調節で継代中に除いた。

2. 実験に用いた PDLF の特徴と Alkaline phosphatase (ALPase) 活性の測定法

実験には継代 5-6 代の 4 種類の PDLF を用いた。各 PDLF の伸展力負荷開始時の ALPase 活性と継代数を表 1 に示す。各 PDLF の ALPase 活性は、コンフルエント時に PDLF を PBS 洗浄後、10 mM Tris-HCl 溶液 (pH 8.5) 中にて超音波ホモジナイズして酵素液とし、8.6 mM p-nitrophenyl phosphate, 2.4 mM MgCl₂ を含む 0.6 M α -amino-2-methyl-1-propanol 溶液 (pH 10) 中で反応させ、410 nm の波長で分光光度計 (UV-1200, 島津製作所) で測定した。また同時にタンパク量測定キット dotMETRIC (Genio Technology 社) を用いてタンパク量を測定し、ALPase 活性は単位タンパク量あたりの単位時間における p-nitrophenyl phosphate 分解量として算出した。

3. 周期的伸展力の負荷方法

PDLF を、フレキシブルなシリコンメンブレン底面を持つ Type I コラーゲンで表面処理を施した培養ディッシュ (Flexcell international 社) 上で培養し、コンフルエント後、Flexercell Strain unit (Flexcell international 社) を用いて、1 秒間 stretch, 1 秒間 relax, 15% elongation の周期的伸展力を 72 時間負荷した。伸展力の負荷条件は、PDLF と骨芽細胞に関する

表 1 実験に用いた PDLF の特徴

	ALPase activity (unit/mg protein)	Passage No.
PDLF-1	0.24 \pm 0.03	5
PDLF-2	0.42 \pm 0.06	6
PDLF-3	2.01 \pm 0.10	6
PDLF-4	2.78 \pm 0.40	6

測定値は平均値 \pm S.D. で示す。(n=4)

る過去の研究を参考¹¹⁻¹⁴⁾にして、PDLFの機能発現の変化が明確に認められる比較的強めの条件を選定した。

4. 細胞破碎液の調整とストレスタンパク質のタンパク発現の解析

周期的伸展力負荷後、細胞をPBSで洗浄し、10% TCAで処理した後、培養ディッシュより剥離し、尿素 Triton-X 溶液 (9 M Urea, 2% Triton-X, 5% Mercaptoethanol) 中で超音波ホモジナイズした。10% LDS 溶液 (10% lithium dodecylsulfate, 0.1% bromophenol blue) を加えて、2 M Tris 溶液で中和した後、再度超音波ホモジナイズして電気泳動用の試料とした。また、各試料中のタンパク量をタンパク量測定キット dotMETRIC (Geno Technology 社) により測定し、1 試料 10 μ g に調整して 10% SDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行なった。電気泳動後、50 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol 溶液を用いて 12 V, 20 分間の条件で PVDF 膜 (イモビロン-P, Millipore 社) にタンパク質を転写し、各種ストレスタンパク質の経時的なタンパク発現は、これらに対する抗体 (マウス抗ヒト HSP47, 60, 70 モノクローナル抗体, StressGen 社) を用いてウェスタンブロッティング法により調べた。2 次抗体は ALPase 標識ラビット抗マウスポリクローナル抗体 (Promega 社) を用い、nitroblue tetrazolium (NBT) 溶液 (Promega 社) と 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP) 溶液 (Promega 社) にて可視化した。また、ウェスタンブロッティングの結果を写真撮影し、Polaroid 社の Polascan35 にて画像を取り込み、マッキントッシュ Power PC 7300 コンピューター上で画像解析ソフト NIH Image (written by Wayne Rasband at the U.S. National Institutes of Health and available from the Internet by anonymous ftp from zippy.nimh.nih.gov or on floppy disk from NTIS, 5285 Port Royal Rd., Springfield, VA 22161, part number PB93-504868) にてデンストグラムを作成し、伸展力負荷開始 12, 24, 72 時間後の各バンドの濃度解析を行った。

5. 統計処理について

画像解析ソフト NIH Image で行った実験群と対照群の濃度解析の結果について二元配置分散分析 (two-way ANOVA) を行った後、Dunnett 法を用いて計測

値の平均値の差の検定に関する統計処理を行った。なお、統計処理は同培養時間の対照群と周期的伸展力負荷群の 2 群間で行った。

結 果

ウェスタンブロッティングの結果は、図 1 のように周期的伸展力を負荷した PDLF-1 の HSP47 の発現を代表として示した。濃度解析の結果は、実験開始時の対照群の濃度に対する負荷開始 12, 24, 72 時間後の実験群と対照群のそれぞれの濃度の比率として示した。また、図 2 に PDLF-1, 2, 3, 4 の濃度解析の結果を示した。

伸展力を負荷しない対照群においても、PDLF-1, 2, 3, 4 は共に HSP47 の発現を経時的にわずかに増強させる傾向があったが、72 時間の実験期間中はほぼ定常的な HSP47, 60, 70 の発現を示した。

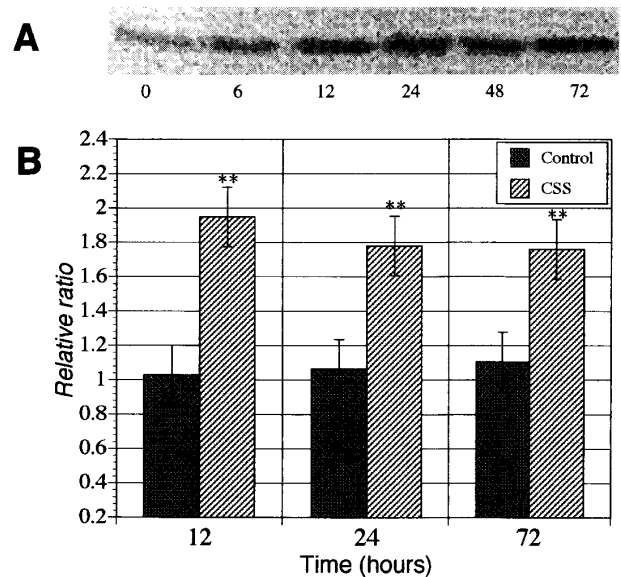


図 1 周期的伸展力負荷による PDLF-1 の HSP 47 の発現の経時変化

A: 実験群の抗 HSP 47 抗体によるウェスタンブロッティングの結果

B: NIH Image による濃度解析 ($n=3$)

Control: 対照群

CSS (Cyclical stretching stress): 周期的伸展力負荷群

測定値は Relative ratio として実験開始時の対照群の濃度 (0 time control) に対する比率として求め、平均値 \pm S.D. で示す。

同培養時間の対照群と周期的伸展力群の 2 群間に Dunnett 法を用いて統計処理を行った。

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

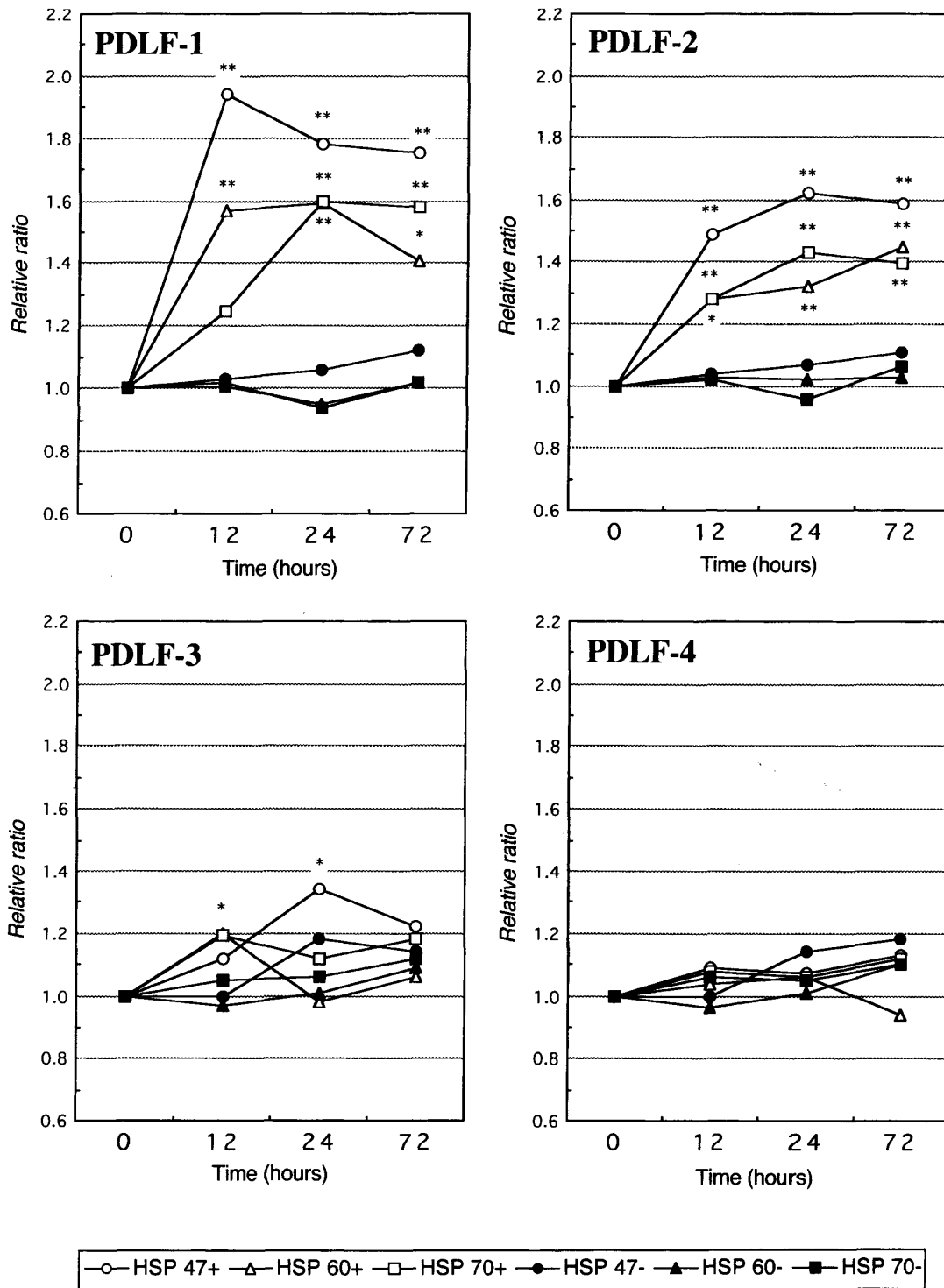


図2 周期的伸展力負荷による PDLF-1, 2, 3, 4 の HSP 47, 60, 70 の発現の経時的変化
 + : 周期的伸展力負荷群 - : 対照群
 測定値は Relative ratio として実験開始時の対照群の濃度 (0 time control) に対する比率として求め、
 平均値で示す ($n=3$)。
 同培養時間の対照群と周期的伸展力群の 2 群間にて Dunnett 法を用いて統計処理を行った。
 ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

PDLF-1は、周期的伸展力負荷によりHSP47, 60, 70の発現を増強した。HSP47の発現は、負荷開始時から徐々に増強し、負荷開始12~24時間後ではほぼ最大値に達し、以降72時間後までほぼ一定の様相を示した。HSP60の発現は、負荷開始24時間後ではほぼ最大値に達し、それ以降は減衰した。HSP70の発現は、負荷開始時から徐々に増強し、負荷開始24時間後ではほぼ最大値に達し、72時間後ではやや減衰した。

PDLF-2はPDLF-1と同様に、周期的伸展力負荷によりHSP47, 60, 70の発現を負荷開始時から徐々に増強した。HSP47, 70の発現は負荷開始24時間後ではほぼ最大値に達し、以降72時間後までほぼ一定の様相を示した。HSP60の発現は負荷開始72時間後ではほぼ最大値に達した。

PDLF-3は、PDLF-1と同様に、HSP47, 60, 70の発現をわずかに増強する傾向はあったが、HSP47の負荷開始24時間後とHSP60の負荷開始12時間後の発現が有意に増加した以外は、対照群と比べて有意な差は認められなかった。

PDLF-4は、周期的伸展力の負荷によるHSP47, 60, 70の発現の増強を示さず、各ストレスタンパク質共に、その発現には対照群と有意な差が認められなかった。

以上のように、周期的伸展力を負荷するとPDLFはHSP47, 60, 70の発現を変化させたが、その発現様相は個々のPDLFによって変動し、発現を有意に増強した細胞(PDLF-1, 2)と、そうでない細胞(PDLF-3, 4)の2種類に大別できた。4種類のPDLFに形態的な差は認められず、いずれの細胞もほぼ均一な紡錘形の線維芽細胞様の形態を示していたが、ストレスタンパク質の発現を有意に増強したPDLF-1, 2は、表1で示すように実験開始時のALPase活性がPDLF-3, 4よりも低い細胞であった。なお、結果は示さないが、実験期間中にPDLF-1, 2, 3, 4共にALPase活性を上昇させる傾向があったが、実験開始時の計測値をほぼ維持していた。

考 察

ストレスタンパク質はその分子量からいくつかのファミリーに分けられるが、それぞれ機能は異なる^{3,4)}。HSP70は、熱ショックにより誘導されることが発見された最初のストレスタンパク質で、ほとんどすべてのタンパク質に対してシャペロン機能を持ち、炎

症¹⁵⁻¹⁷⁾等の場においてその誘導機構の研究が進んでいる。HSP60は、分子量6万程度の多量体でサブユニットから構成される特有の構造を持ち、シャペロン¹⁸⁾とも呼ばれ、*in vitro*でシャペロン機能が確認できる唯一のストレスタンパク質である。また、HSP60は、HSP70と同様にほとんどすべてのタンパク質に対してシャペロン機能を持つ^{19,20)}。一方、HSP47は小胞体に局在し、プロコラーゲンに特異的に結合してシャペロン機能を果たし²¹⁾、コラーゲン合成に特異的に関与する。本実験結果では、PDLF-1, 2においてHSP47, 60, 70の発現の増強が認められた。したがって、HSP47の発現の変化は周期的伸展力による細胞のコラーゲン合成の変化に、HSP60と70の変化は周期的伸展力による細胞内の何らかのタンパク質の修復もしくは合成の変化に関係していることが推察された。メカニカルストレスによるストレスタンパク質の発現機構については解明すべき点が多いが、Haskin⁹⁾は骨芽細胞様細胞MG-63細胞に静水圧を負荷すると、経時的に細胞形態は丸い形態から細長い形態へと変化し、細胞質に局在していたHSP70は細胞質から核へと移行し、その動態は熱ショック反応と類似していると報告している。一方、ニワトリ頭蓋冠より採取した骨芽細胞様細胞に周期的伸展力を4日間負荷すると、HSP73の発現が著明に増強するが、HSP80, 90, 100の発現は減弱する¹⁰⁾という報告や、PDLFに圧縮力を負荷するとHSP60の発現が約6.8倍増強するという報告⁸⁾がある。前田等⁸⁾の報告と比較すると本実験の結果の約1.7倍と著しく誘導量に差があるが、これは、直接細胞膜に圧縮力が加わる負荷様式と細胞底面の細胞外基質や接着分子を介して細胞に伸展力が加わる本実験のような負荷様式との相違と、ストレスタンパク質発現量の定量法の相違が関係していると思われる。これらの報告から、ストレスタンパク質の発現は、細胞の種類やメカニカルストレスの負荷様式の違いにより変化すると考えられる。

本実験では、4種類のPDLFに周期的伸展力を負荷したが、興味深い事に、PDLFの種類によりその発現様相は異なり、変化が大きかったPDLF-1, 2とほとんど変化の認められなかったPDLF-3, 4の2つに大別された。PDLFは線維芽細胞様細胞の一種で、高いALPase活性²²⁾を有し、長期培養下で石灰化物を形成するため骨芽細胞様細胞の性質も含まれていると考えられている²³⁻²⁶⁾が、*in vitro*の実験で用いられるPDLFは、ほとんどがmix populationの細胞²⁷⁻²⁹⁾で

ある。本実験で用いた4種類のPDLFは、4名の患者の第一小臼歯より、方法で述べたようにほぼ同条件で採取し、継代数もほぼ同一であったが、実験開始時のALPase活性は個々の細胞で異なり、PDLF-1,2はPDLF-3,4と比較すると低い活性を示した。PDLFにおけるALPase活性の機能的役割に関しては明らかではないが、ALPase活性の高いPDLFはコラーゲン合成が高いという報告²⁹⁾があり、ALPase活性はPDLFの様々な機能発現の相違の一つの指標になると考えられる。本実験に用いたPDLFのメカニカルストレスによるストレスタンパク質の発現のバリエーションの原因は明確ではないが、個々のPDLFの機能発現の相違が密接に関係していることが推察された。また、PDLFは骨芽細胞に類似した性質を示す^{23-26,30)}が、メカニカルストレスに対する反応は異なり、骨芽細胞が1% elongationを越える伸展刺激で増殖活性を著しく低下させる³¹⁾のに対して、PDLFは9% elongationでも増殖活性をほとんど変化させず¹¹⁾、PDLFはメカニカルストレスに対する抵抗性が骨芽細胞より高いと考えられている。本実験で用いた高いALPase活性を示したPDLF-3,4は、PDLF-1,2より骨芽細胞に近い性質を示す細胞であることも考えられ、このことがメカニカルストレスに対する反応性もしくは抵抗性に関係している可能性も否定できない。また、今回の実験では、伸展力の強度と頻度を、1秒間stretch, 1秒間relax, 15% elongationと固定した条件で行ったが、これらの条件を変えるとストレスタンパク質の発現様相も変化することも考えられる。

メカニカルストレスによる情報伝達機構については、細胞表面のインテグリン分子群と細胞骨格タンパク質を介した情報伝達機構³²⁾、カルシウムイオンチャンネルによる情報伝達機構やPGE₂, IL-1等の液性因子を介した系³³⁾、NOを介した系³⁴⁾等が考えられている。一方、細胞内情報伝達機構におけるストレスタンパク質の役割に関しては、HSP70が定期的に細胞骨格タンパク質のアクチンと結合³⁵⁾していることから、い

わゆるクロスリンカータンパク質として細胞骨格タンパク質と共同で様々な細胞内反応に携わっていると考えられている³⁶⁾。したがって、細胞にメカニカルストレスが負荷された際に、ストレスタンパク質が、細胞表面のインテグリン分子群や細胞骨格タンパク質と共同でその情報を伝達する系が存在することが推察され、本実験で示された周期的伸展力によるPDLF-1,2におけるストレスタンパク質の発現の増強が、この情報伝達機構と関係している可能性も考えられた。

本研究の結果から、周期的伸展力によりPDLFはストレスタンパク質の発現を増強させることが明らかになり、矯正力による歯の移動時の歯周組織においても、メカニカルストレス負荷に伴う細胞内のタンパク質の変性に対するストレスタンパク質の防御機構が存在することと、ストレスタンパク質が発現することにより情報が伝達され、歯周組織の改造が進行する可能性が示された。今後、メカニカルストレスの負荷により発現を増強させる各ストレスタンパク質の経時的な遺伝子発現や細胞内局在の変化を調べると共に、そのターゲットとなるタンパク質を同定することで、メカニカルストレスによるストレスタンパク質の発現様式をより明確にすることが必要であると考えられる。さらに、各PDLFの機能発現の相違によるストレスタンパク質の発現のバリエーションの原因について詳細に検討することも不可欠であると考えられる。また、矯正力による歯の移動時の歯周組織におけるストレスタンパク質の発現様相を調べるための*in vivo*の研究が望まれる。

本論文の要旨は、第56回日本矯正歯科学会大会(1997年9月29,30日東京),77th International Associations for Dental Research(1999年3月10-13日Vancouver)において発表した。

なお、この研究は、平成9,10,11年度文部省科学研究費助成金、基盤研究(C)課題番号09672091の補助によるものである。

内容要旨：本研究は、*in vitro*にてヒト歯根膜線維芽細胞(Periodontal ligament fibroblast:PDLF)に周期的伸展力を負荷した場合の種々のストレスタンパク質(Heat shock protein:HSP)の発現を調べることにより、メカニカルストレスによる歯周組織の改造機構におけるストレスタンパク質の発現誘導を明らかにすることを目的とした。実験には健全な小臼歯から採取した4種類のPDLFを用いた。細胞をシリコンメンブレン底面を持つ培養ディッシュ上で培養し、1秒間stretch, 1秒間relax, 15% elongationの周期で伸展力を72時間負荷した。ストレスタンパク質の発現は、電気泳動後、抗HSP47, 60, 70モノクローナル抗体を用いてウェスタンブロットティング法にて調べた。その結果、ストレスタンパク

質の発現パターンは2種類認められ、ALPase 活性が低い値を示した PDLF-1, 2 は周期的伸展力負荷により HSP47, 60, 70 の発現を有意に増強したのに対して、ALPase 活性が高い値を示した PDLF-3, 4 は周期的伸展力負荷によってもその発現をほとんど変化させなかった。これらの結果より、PDLF のストレストタンパク質の発現はメカニカルストレスにより制御されているが、その発現パターンは個々の PDLF の機能発現の相違により異なることが示唆された。

文 献

- 1) Hightower, L.E.: Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides, *J. Cell. Physiol.* **102**: 407-427, 1980.
- 2) Pouyssegur, J., Shiu, R.P.C. and Pastan, 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.
- 3) Gething, M.J. and Sambrook, J.: Protein folding in the cell, *Nature* **355**: 33-45, 1992.
- 4) Ellis, J.: Proteins as molecular chaperones, *Nature* **328**: 378-379, 1987.
- 5) Sauk, J.J., Norris, K., Moehring, J. and Somerman, M.J.: The expression of colligin/hsp47 after stress in human periodontal fibroblasts *in vitro*, *Arch. Oral Biol.* **35**: 645-651, 1990.
- 6) 辻村紀代子, 森下真行, 河原和子, 福永真佐美, 鶴田圭伊子, 岩本義史: ヒト歯根膜由来線維芽細胞の熱ショック蛋白質遺伝子発現に関する研究, *日歯周誌* **37**: 287-293, 1995.
- 7) Shroff, B., Smith, T., Norris, K. and Sauk, J.J.: Hsp47 is localized to regions of type I collagen production in developing murine femurs and molars, *Connective Tissue Res.* **29**: 273-286, 1993.
- 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, *日矯歯誌* **56**: 296-302, 1997.
- 9) Haskin, C.J., Athanasiou, K.A., Klebe, R. and Cameron, I.L.: A heat-shock-like response with cytoskeletal disruption occurs following hydrostatic pressure in MG-63 osteosarcoma cells, *Biochem. Cell Biol.* **71**: 361-371, 1993.
- 10) Buckley, M.J., Banes, A.J. and Jordan, R.D.: The effects of mechanical strain on osteoblasts *in vitro*, *J. Oral Maxillofac. Surg.* **48**: 282-283, 1990.
- 11) Matsuda, N., Yokoyama, K., Takeshita, S. and Watanabe, M.: Role of epidermal growth factor and its receptor in mechanical stress-induced differentiation of human periodontal ligament cells *in vitro*, *Arch. Oral Biol.* **43**: 987-997, 1998.
- 12) Yamaguchi, M., Shimizu, N., Goseki, T., Shibata, Y., Takiguchi, H., Iwasawa, T. and Abiko, Y.: Effects of different magnitudes of tension-force on prostaglandin E₂ production by human periodontal ligament cells, *Arch. Oral Biol.* **39**: 877-884, 1994.
- 13) Yamaguchi, M., Shimizu, N., Shibata, Y. and Abiko, Y.: Effects of different magnitudes of tension-force on alkaline phosphatase activity in periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.* **75**: 889-894, 1996.
- 14) Shimizu, N., Yamaguchi, M., Goseki, T., Shibata, Y., Takiguchi, H., Iwasawa, T. and Abiko, Y.: Inhibition of prostaglandin E₂ and interleukin 1- β production by low-power laser irradiation in stretched human periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.* **74**: 1382-1388, 1995.
- 15) Teshima, S., Rokutan, K., Takahashi, M., Nikawa, T. and Kishi, K.: Induction of heat shock proteins and their possible roles in macrophages during activation by macrophage colony-stimulating factor, *Biochem. J.* **315**: 497-504, 1996.
- 16) Margulis, B.A. and Welsh, M.: Analysis of protein binding to heat shock protein 70 in pancreatic islet cells exposed to elevated temperatures or interleukin 1 beta, *J. Biol. Chem.* **266**: 9295-9298, 1991.
- 17) Cowley, Bd. Jr., Muessel, M.J., Douglass, D. and Wilkins, W.: *In vivo* and *in vitro* osmotic regulation of HSP-70 and prostaglandin synthase gene expression in kidney cells, *Am. J. Physiol.* **269**: F854-862, 1995.

- 18) Ellis, R.J.: Molecular chaperones: the plant connection, *Science* **250**: 954-959, 1990.
- 19) Hartl, F.U., Martin, J. and Neupert, W.: Protein folding in the cell: role of molecular chaperones HSP70 and HSP60, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**: 293-322, 1992.
- 20) Ishii, N., Taguchi, H., Sumi, M. and Yoshida, M.: Structure of holo-chaperonin studied with electron microscopy: Oligomeric cpn 10 on top of two layers of cpn 60 rings with two stripes each. *FEBS Lett.* **299**: 169-174, 1992.
- 21) Nagata, K., Saga, S. and Yamada, K.M.: A major collagen-binding protein of chick embryo fibroblasts is a novel heat shock protein, *J. Cell Biol.* **103**: 223-229, 1986.
- 22) Somerman, M.J., Archer, S.Y., Imm, R.A. and Foster, R.A.: A comparative study of periodontal ligament cells and gingival fibroblasts *in vitro*, *J. Dent. Res.* **37**: 66-70, 1988.
- 23) Piche, J.E., Carnes, D.L.Jr. and Graves, D.T.: Initial characterization of cells derived from human periodontia, *J. Dent. Res.* **68**: 761-767, 1989.
- 24) Goseki, M., Oida, S., Takeda, T., Ogata, Y., Iimura, T., Maruoka, Y. and Sasaki, S.: Identification of bone-type alkaline phosphatase mRNA from human periodontal ligament cells, *J. Dent. Res.* **74**: 319-322, 1995.
- 25) Nohutcu, R.M., McCauley, L.K., Koh, A.J. and Somerman, M.J.: Expression of extracellular matrix proteins in human periodontal ligament cells during mineralization *in vitro*, *J. Periodontol.* **68**: 320-327, 1997.
- 26) Liu, H.W., Yacobi, R., Savion, N., Narayanan, A.S. and Pitaru, S.: A collagenous cementum-derived attachment protein is a marker for progenitors of mineralized tissue-forming cell lineage of the periodontal ligament, *J. Bone Miner. Res.* **12**: 1691-1699, 1997.
- 27) Hou, L.T. and Yaeger, J.A.: Cloning and characterization of human gingival and periodontal ligament fibroblasts, *J. Periodontol.* **64**: 1209-1218, 1993.
- 28) Giniger, M.S., Norton, L., Sousa, S., Lorenzo, J. A. and Bronner, F.: A human periodontal ligament fibroblast clone releases a bone resorption inhibition factor, *J. Dent. Res.* **70**: 99-101, 1991.
- 29) 岡部太一: 歯根修復に関する研究, 第5報 年齢別および細胞継代数によるヒト歯根膜細胞の分化機能の比較, *東北歯誌* **10**: 87-99, 1991.
- 30) Basdra, E.K., Komposch, G.: Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an *in vitro* analysis, *Eur. J. Orthod.* **19**: 615-621, 1997.
- 31) Neidlinger-Wilke, C., Wilke, H.J. and Claes, L.: Cyclic stretching of human osteoblasts affects proliferation and metabolism: a new experimental method and its application, *J. Orthop. Res.* **12**: 70-78, 1994.
- 32) Yen, E.H.K., Carvalho, R.S., Bumann, A., Schwazer, C., Nance, D. and Scott, J.E.: Mechanical strain alters integrin and cytoskeleton pattern in osteoblast-like cells, *J. Dent. Res.* **73**: S267, 1994.
- 33) Saito, M., Saito, S., Ngan, P.W., Shanfeld, J. and Davidovitch, Z.: Interleukin-1beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress *in vivo* and *in vitro*, *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* **99**: 226-240, 1991.
- 34) Pitsillides, A.A., Rawlinson, S.C., Suswillo, R. F., Bourrin, S., Zaman, G. and Lanyon, L.E.: Mechanical strain-induced NO production by bone cells: a possible role in adaptive bone (re)modeling? *FASEB J.* **9**: 1614-1622, 1995.
- 35) Kabakov, A.E. and Gabai, V.L.: Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stresses, *Experientia* **49**: 706-713, 1993.
- 36) Tsang, T.C.: New model for 70 kDa heat-shock proteins' potential mechanisms of function, *FEBS Lett.* **323**: 1-3, 1993.