

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20589

研究課題名(和文) 歯牙移動時におけるTRPチャンネルを介した新規疼痛メカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the new pain mechanism with TRP channel at orthodontic tooth movement.

研究代表者

中村 政裕 (Nakamura, Masahiro)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20708036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、実験的歯牙移動時において機械的受容器であるTRPチャンネルを介した疼痛メカニズムが存在するかについて検討を行った。歯根膜組織中には歯髄組織と比較しTRPV2をはじめTRPC1やC6などのチャンネルが存在し、歯根膜自由神経終末においてTRPV2の発現を認めた。また、TRPV2アンタゴニストを作用させた結果、三叉神経脊髄路核尾側亜核における疼痛発現マーカーの減少を認めた。これらの結果から、歯牙移動時の機械的刺激受容にTRPV2チャンネルが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we investigated if the new pain mechanism with Transient Receptor Potential (TRP) channel exist at experimental orthodontic tooth movement. There were TRPV2, TRPC1 and C6 in the periodontal ligament (PDL) tissues compared with the pulp tissues. The TRPV2-positive free nerve endings were observed in the PDL. Moreover, c-fos-positive cell were decreased at trigeminal subnucleus caudalis by the antagonist to the TRPV2. From the above, it is suggested that TRPV2 channel is concerned in the pain stimulus reception at orthodontic tooth movement.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯牙移動 疼痛発現メカニズム TRPチャンネル 矯正歯科治療

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療時、歯に矯正力を加えることで数日間疼痛が生じる。これは歯牙移動時の周囲組織の炎症反応によって生じる痛みであり、抗炎症薬が一定の鎮痛効果を有することが知られている(Roche JJ. et al., 1997)。しかし、歯牙移動時の痛みは個人差が大きく、抗炎症薬による薬理効果も個人差が大きいことから、炎症性反応以外の痛みを生じる機序が存在することが予測されるが、その発生機序や制御機構は依然として不明である。近年、痛み刺激と Transient Receptor Potential (TRP) チャンネルの関連性についての報告が多くなされ、温度刺激、pH 刺激、圧刺激などの侵害刺激に対し、自由神経終末における侵害受容器として様々な TRP チャンネルが活性化し、痛み刺激が発生する事が明らかになってきた(Gold MS. et al., 2010)。しかし、歯の移動によって生じる痛みの発生や制御に、TRP チャンネルがどの様に参与しているのか国内外において未だ研究されていない。

我々の研究室では、これまでの研究成果として、歯の移動によって生じる痛みの情報が末梢神経から中枢神経系に伝達され、制御されるメカニズムを明らかにしてきた(Fujiyoshi. et al., 2000)。これにより歯牙移動時の痛み刺激が c-Fos シグナル活性にて確認することが可能となった。一方、TRP チャンネルは末梢神経での侵害受容器として機能している事が報告されている。

これらの事実から我々は、矯正歯科治療時における歯牙への圧刺激などの侵害刺激に対し、TRP チャンネルが活性化し痛みの発現につながっているのではないかと考えた。さらに、歯の移動時に特異的に活性化されるチャンネルを同定する事で、その TRP チャンネルの阻害を行い c-Fos 活性シグナル低下が確認できれば歯の移動時の痛みに対する投薬治療が可能であるという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、歯根膜組織自由神経終末での TRP チャンネルの存在を確認し、さらに歯牙移動時の TRP チャンネルを介した疼痛メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 正常萌出歯から採取した歯根膜組織を用いたマイクロアレイによる TRP チャンネル発現の網羅的解析。

我々の研究室では、矯正歯科治療において便宜抜歯した歯牙歯根膜から歯根膜細胞を単離・培養する方法を確立しており(Kawanabe, 2006)、この手法を用いて便宜抜歯からヒト歯根膜組織を剥離し、ISOGEN にて歯根膜組織の mRNA を回収した。その後、組織中の TRP チャンネルをマイクロアレイにて網羅的に解析を行った。対照群として同歯の歯髄組織を選択した。

(2) 実験的歯牙移動モデルマウスおよびラットの作成、薄切切片作成。

当初、8 週齢の ICR マウスを用い実験を遂行する予定であり、歯牙移動モデルマウスの作成および延髄三叉神経脊髄路核における c-Fos 陽性細胞の確認まで行ったが、サンプルサイズが著しく小さくばらつきが大きかったため、統計処理が困難であった。そのため、途中より 8 週齢の SD ラットを使用し、右側第一大臼歯および第二大臼歯間に弾性エラスティックを挿入することで歯牙移動モデルを作成した。実験開始 12 時間、24 時間、3 日、5 日、7 日、14 日後に、4%PFA を用いて灌流固定を行う。その後、通報に従い、凍結包埋およびパラフィン包埋を行う。マイクロトームを用い、上顎骨は 8 μ m の連続切片を作成する。また、延髄は 40 μ m で連続切片を作成する。

(3) TRPV2 チャンネルの発現領域の免疫組織化学的観察

ラット歯根膜組織中の自由神経終末に TRPV2 チャンネルが存在するかを確認するため、固定前の歯牙移動ラットに Fluoro-Gold を大白歯歯間部へ局所投与し、凍結薄切切片を作成した。その後、TRPV2 の免疫蛍光染色と共染色を行い、発現部位を確認した。

(4) 歯牙移動モデルラット延髄における c-Fos 発現解析

延髄の薄切切片作製後、三叉神経脊髄路核尾側亜核の二次ニューロン核内における c-Fos 発現量の変化と矯正力負荷後の時間経過による変化を、Sumigoto ら(1993)の報告に基づき c-Fos 特異抗体を用いた免疫組織化学染色および免疫蛍光染色にて観察した。なお、尾側亜核二次ニューロンの領域を規定するためにクリューババレー染色を行った。

(5) TRPV2 チャンネル阻害薬に対する c-Fos 発現動態解析

TRPV2 チャンネルのアンタゴニストであるトラニラスト (300mg/kg/day) を粉餌と混ぜてモデルラットに与え、尾側亜核二次ニューロンでの c-Fos 発現量の変化を比較することとした。

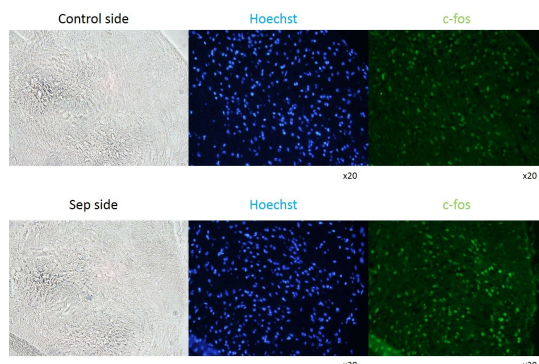
4. 研究成果

本研究では、まず歯根膜組織中に存在する TRP チャンネルの同定から行った。その結果、歯髓組織に比べ TRPV2, TRPC1, C6 の mRNA 発現量が増加していることが明らかとなった。

Son ら(2009)によると TRPV2 は象牙芽細胞において機械的刺激の受容器として作用していることが報告されていることから TRPV2 に着目し実験を進めることとした。

ラットにて歯牙移動モデルを作成し、歯根膜自由神経終末における TRPV2 の発現を確認する事とした。その結果、免疫蛍光染色にて自由神経終末の標識である Fluoro - Gold 陽性領域と TRPV2 陽性領域の共発現を認めた。さらに歯牙移動モデルにて疼痛マーカーの発現を確認するため、三叉神経脊髄路核尾側

亜核の二次ニューロンの c-Fos 染色を行った。その結果、obex の吻門 500 μ m から尾側 1500 μ m の領域において、実験側にて優位に多くの陽性細胞を認めた。



さらに時間依存的 c-Fos 陽性細胞数の分布を確認したところ、12 時間から 24 時間で Fos 陽性細胞の増加を認めた。

そこで、TRPV2 チャンネルを介した疼痛発現メカニズムを確認するために TRPV2 アンタゴニストであるトラニラストを使用し、同様に c-Fos 染色を行った。その結果、わずかではあるが 12 時間から 24 時間にかけて c - Fos 陽性細胞数の減少を認めた。

これらの結果から、実験的歯牙移動時における疼痛発現に TRPV2 チャンネルを介した機械的刺激受容メカニズムの関与が示された。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

6．研究組織

(1)研究代表者

中村 政裕 (Nakamura Masahiro)

岡山大学病院・矯正歯科・助教

研究者番号： 20708036

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし