

令和元年6月18日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H07144

研究課題名(和文) 矯正力負荷によって惹き起こされる大脳皮質局所神経回路の変化の神経メカニズム

研究課題名(英文) Experimental tooth movement changes somatotopic organization of the somatosensory and insular cortices

研究代表者

堀貫 恵利 (HORINUKI, Eri)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：30805990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：矯正力負荷1日後に、対照群と比較して上顎臼歯歯根膜刺激に応答する興奮性および抑制性ニューロンの割合がともに増加し、個々の細胞におけるカルシウム信号の最大振幅が顕著に増大した。また対照群と比較して、下顎臼歯歯根膜刺激に応答するニューロンの割合が有意に増加した。矯正力負荷7日後には、上顎臼歯歯根膜刺激に応答するニューロンの割合および、カルシウム信号の最大振幅の増大傾向は対照群と類似した値まで減少した。また、下顎臼歯歯根膜刺激に応答するニューロンの割合も対照群と同程度まで回復した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験で得られた結果は、持続的な末梢刺激である矯正力が大脳皮質に与える影響をより正確に理解する一助となる。

矯正力負荷1日後に、一時的に大脳皮質における興奮性および抑制性ニューロンの神経活動が変化し、7日後にそれらの活動変化が対照群と同程度にまで回復したという本実験の結果は、「矯正力は大脳皮質の興奮性を持続的には変化させない」という仮説に対する明確なエビデンスとなる。このエビデンスは、矯正治療における中枢神経系の影響は限定的であることを示すものであり、臨床治療での安全性を担保することに寄与する。

研究成果の概要(英文)：In the animals 1d after experimental tooth movement (1d ETM), the number of neurons and their amplitude of Ca<sup>2+</sup> signals responding to maxillary molar pulp stimulation were increased both in excitatory and inhibitory neurons.

In contrast to very small population of excitatory and inhibitory neurons responding to the mandibular molar stimulation in control rats, 1d ETM showed significant increases in excitatory and inhibitory neurons responding to mandibular molar stimulation. Interestingly, most of mandibular molar-responding neurons also responded to maxillary molar stimulation. The population of excitatory and inhibitory neurons that responded only to maxillary molar PDL stimulation was almost comparable between control and 1d ETM. The facilitative responses in 1d ETM were almost recovered 7d after ETM.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根膜 疼痛 大脳皮質 カルシウム・イメージング 二光子励起レーザー顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

矯正力によって歯根膜で局所的な炎症が生じ、骨のリモデリングが起こる (Davidovitch et al., 1988; Krishnan and Davidovitch, 2016)。この際放出される炎症性メディエーターやニューロペプチドは、侵害受容性の神経に作用し痛みを生じさせる (Ferreira et al., 1978; Verri et al., 2006)。しかし、侵害情報を最終的に認知するとされている大脳皮質において、矯正力が歯根膜感覚の処理にどのような影響を与えるかについては不明な点が多い。

我々は、膜電位感受性色素 (RH1691) を用いた光学計測法による研究で、歯根膜への侵害刺激が大脳皮質体性感覚野および島皮質で処理され、矯正力負荷 1 日後に歯根膜刺激に対する大脳皮質神経活動が顕著に亢進すること (Horinuki et al., 2015)、その増大した大脳皮質神経活動が、矯正力負荷 7 日後に対照群と同程度まで回復することを明らかにし (Horinuki et al., 2016; 図 1)、矯正力によって長期に続く可塑的变化は生じないことを明らかにしつつある。

以上の結果は、持続的な末梢からの刺激によって、大脳皮質において一時的に神経活動の変化が生じることを示しているが、光学計測法ではその詳細なメカニズムを解明することができない。例えば大脳皮質には興奮性および抑制性神経細胞やグリア細胞が存在するが、光学計測法はその活動の総和を反映しており、各細胞の興奮性をとらえることはできない。そこで本研究課題では、二光子励起レーザー顕微鏡によるカルシウム・イメージングを行い、歯根膜刺激に対する大脳皮質神経細胞の応答特性と、矯正力によって生じる細胞単位での活動変化を検討することとした。そして、矯正力によって大脳皮質局所神経回路がどのように変化するかを明らかにすることで、矯正治療における痛みの発生機序の解明に寄与することを目的とした。

## 2. 研究の目的

矯正治療を受ける患者の多くは治療後の痛みを訴えるが、特に中枢神経系に対するその影響については不明な点が多く、エビデンスに基づいた安全な矯正治療の確立には中枢神経系への影響の解明が必須である。我々は光学計測法を用いて、矯正力負荷 1 日後に歯根膜刺激に対する大脳皮質神経活動が顕著に亢進し (Horinuki et al., 2015)、その過興奮が 1 週間以内に正常レベルに回復すること (Horinuki et al., 2016) を明らかにしてきた。しかし、光学計測法は多くの神経細胞やグリア細胞の活動が重積した状態を反映しており、各々の細胞で生じる活動は観察出来ない。そこで本研究は、二光子励起レーザー顕微鏡による細胞内カルシウム・イメージング法を用いて、矯正力負荷時の歯根膜刺激に対する大脳皮質の興奮性・抑制性神経細胞の活動性を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 歯根膜刺激に対する大脳皮質神経細胞のカルシウム・イメージング

#### 二光子励起レーザー顕微鏡によるカルシウム・イメージング

我々は膜電位感受性色素 (RH1691) を用いた光学計測法による研究で (Horinuki et al., 2015, 2016)、歯根膜感覚が大脳皮質体性感覚野および島皮質領域で処理されていること、矯正力を負荷することで歯根膜刺激に対する神経活動が経時的に変化することを明らかにした。これらの研究結果を踏まえて、本研究課題ではまず、歯根膜の電気刺激を行った際の大脳皮質に存在する興奮性神経細胞・抑制性神経細胞・グリア細胞それぞれにおけるカルシウム信号を解析し、歯根膜刺激に対する大脳皮質体性感覚野および島皮質領域における単一細胞ごとの活動特性を解明することとした。

まず、光学計測法で明らかにした歯根膜感覚の処理に関連する大脳皮質領域相当部の頭蓋骨を直径約 0.5-1.0 mm 程度開窓して脳硬膜を除去し (Horinuki et al., 2015), 950 nm のレーザーで観察領域の撮像を行った。光学計測法を用いた研究から、上顎歯根膜刺激時と下顎歯根膜刺激時では、初期応答領域がわずかに異なっており、その後皮質での応答が広がると両者の応答領域が重複することが分かっている。本研究課題では、上顎臼歯に矯正力を負荷する予定であるため、上顎臼歯歯根膜刺激に対する初期応答領域を開窓し、神経細胞の活動を観察した。撮像範囲は大脳皮質 層から / 層を含む、脳表から約 400  $\mu\text{m}$  までとした。その後、カルシウム指示薬である OGB-488 とアストロサイトのマーカーである SR-101 を皮質浅層に弱圧で注入し、神経細胞およびアストロサイトの標識を行い、上下顎切歯および臼歯歯根膜刺激時の細胞におけるカルシウム信号を 800 nm のレーザーで記録した。電気刺激は歯根膜に挿入した双極電極で行い、7 V50 Hz の 5 連刺激を与えた。

#### 興奮性神経細胞、抑制性神経細胞、アストロサイトの同定

興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を判別するため、本研究課題では、GABA 作動性抑制性神経細胞に Venus を発現させた Venus-VGAT トランスジェニックラットを使用した。OGB-488 および SR-101 による細胞標識前と標識後の組織画像を重ね合わせ、Venus 陽性の細胞を抑制性神経細胞、Venus 陰性の細胞を興奮性神経細胞、SR-101 で標識された細胞をアストロサイトと判断した。

#### 歯根膜刺激に対するカルシウム信号の解析

細胞の種類を同定した後、細胞ごとにカルシウム信号を解析し、上下顎切歯および臼歯歯根膜刺激に対する応答率、応答時の最大振幅、刺激に対する潜時、応答持続時間などを調査した。細胞の種類による応答特性の違いや、刺激部位による違いを検討し、歯根膜感覚が大脳皮質局所神経回路内でどのように処理されているかを解析した。

## (2) 矯正力負荷による大脳皮質神経細胞の応答変化

### 矯正力負荷モデル動物の作成

ラット上顎右側臼歯と上顎切歯にコイル・スプリングを結紮して矯正力を負荷し、モデル動物を作成した。以前の我々の研究で (Horinuki et al., 2016), 矯正力を負荷して 1 日後に歯根膜刺激に対する大脳皮質神経活動が最も増大し、その増大傾向が、矯正力負荷 7 日後に減少することが分かっている。この結果を踏まえて、モデル動物は、矯正力を負荷してから 1 日後および 7 日後に二光子励起レーザー顕微鏡下でカルシウム・イメージングを行い、大脳皮質神経細胞およびアストロサイトの応答変化を検討することとした。記録終了後、実際にモデル動物で歯牙移動が生じていたかを上顎臼歯の移動量を測定して確認した。

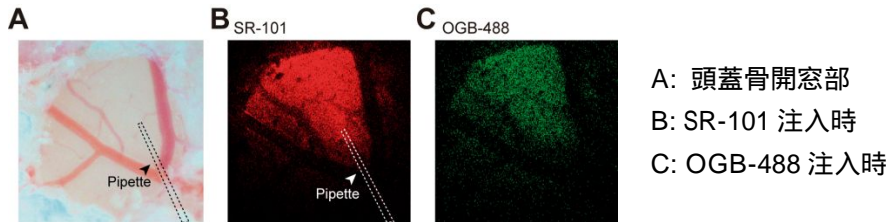
### 矯正力負荷モデルを用いたカルシウム・イメージング

光学計測法を用いた研究では、矯正力を負荷して 1 日後に歯根膜刺激に対する大脳皮質の膜電位が顕著に増大することが分かっており、この結果から、大脳皮質に存在する興奮性および抑制性神経細胞やアストロサイトの活動性が増大している可能性が推察される。しかし、すべての細胞で同様に応答性の変化が生じているのか、細胞の種類によって異なる変化が生じているのかは不明である。これらの可能性について検証するため、対照群で得られた大脳皮質神経細胞およびアストロサイトの応答と矯正力負荷モデルで得られた応答を比較し、矯正力を負荷した上顎臼歯歯根膜刺激に対して応答を示す細胞の割合、応答時の振幅、潜時、応答持続時間等の変化を、細胞の種類ごとに解析した。また、矯正力を負荷していない下顎切歯、下顎臼歯および上顎切歯歯根膜刺激に対する大脳皮質神経細胞の応答の変化についても検討を行った。

#### 4. 研究成果

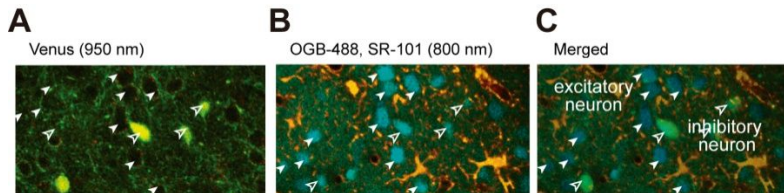
##### (1) 神経細胞およびアストロサイトの染色

大脳皮質神経細胞及びアストロサイトの染色を行うため、皮質表層からカルシウム指示薬である OGB-488 と、アストロサイトのマーカーである SR-101 を弱圧にて注入した。



##### (2) 神経細胞の同定

本実験では、興奮性ニューロンと抑制性ニューロンを区別するため、抑制性ニューロンに Venus を発現させた VGAT Venus ラットを使用した。Venus 陰性かつ OGB-488 陽性の細胞を興奮性ニューロン、Venus 陽性かつ OGB-488 陽性の細胞を抑制性ニューロンとし、それぞれ白い矢印と白抜きの矢印で示している。

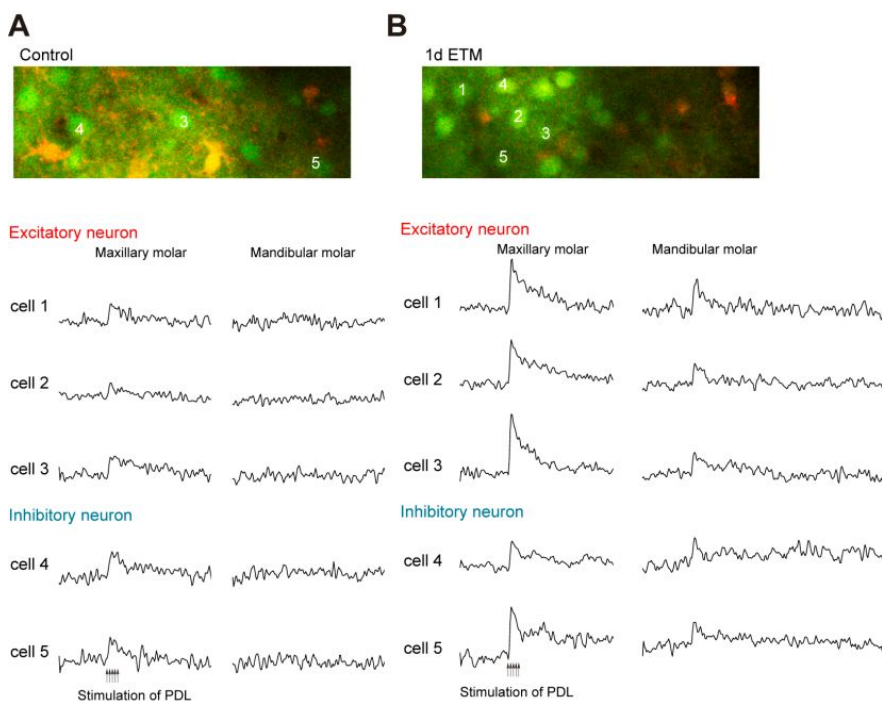


A : OGB-488 および SR-101 負荷前。緑で表示されているのが Venus 陽性ニューロン。

B : OGB-488 および SR-101 負荷後。青で表示されているのは OGB 陽性ニューロン，オレンジで表示されているのがアストロサイトである。

C : A および B の重ね合わせ。

##### (3) 歯根膜刺激に対する大脳皮質神経細胞のカルシウム信号



対照群(A)および矯正力負荷1日後(B)の興奮性・抑制性神経細胞における、上下顎臼歯歯根膜電気刺激時のカルシウム信号の一例。上段にはOGB-488とSR-101負荷後の大脳皮質を示す。緑で表示しているのがニューロン、オレンジで表示しているのがアストロサイトである。

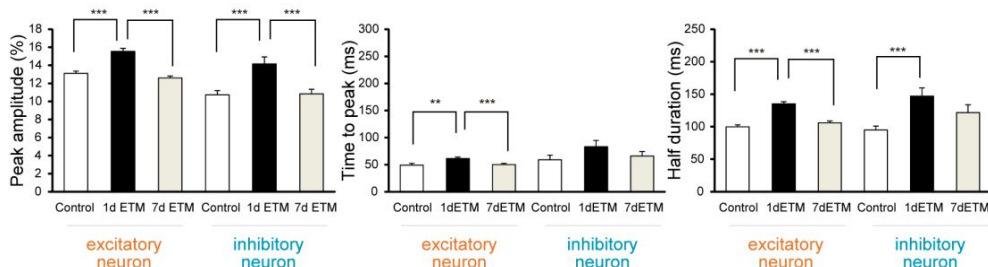
A：対照群では，興奮性・抑制性ニューロンのどちらにおいても上顎臼歯歯根膜刺激に対してカルシウム信号が観察された。この視野内では，下顎歯根膜刺激に対する応答は認められなかった。

B：対照群と比較して，矯正力負荷1日後に，興奮性および抑制性ニューロンにおいて，カルシウム信号の振幅が増大傾向を示した。また，下顎歯根膜刺激への応答も観察された。

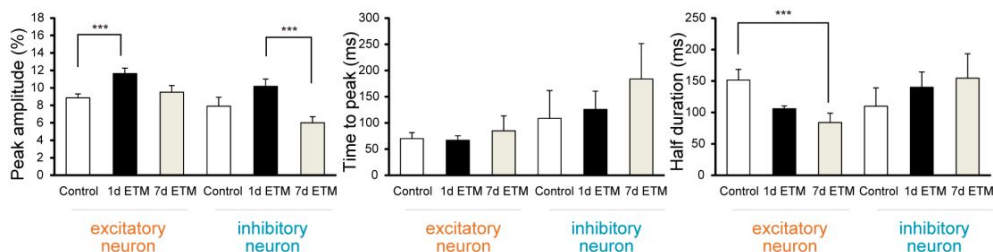
#### (4) 矯正力負荷によるカルシウム信号の変化

対照群および矯正力負荷1日後，矯正力負荷7日後の大脳皮質ニューロンにおける上顎および下顎臼歯歯根膜刺激時のカルシウム信号の解析結果。矯正力負荷1日後に，上顎および下顎臼歯歯根膜刺激に対する応答の最大振幅が，興奮性・抑制性ニューロンのいずれにおいても増大し，その増大傾向は矯正力負荷7日後に対照群と同程度まで回復した。

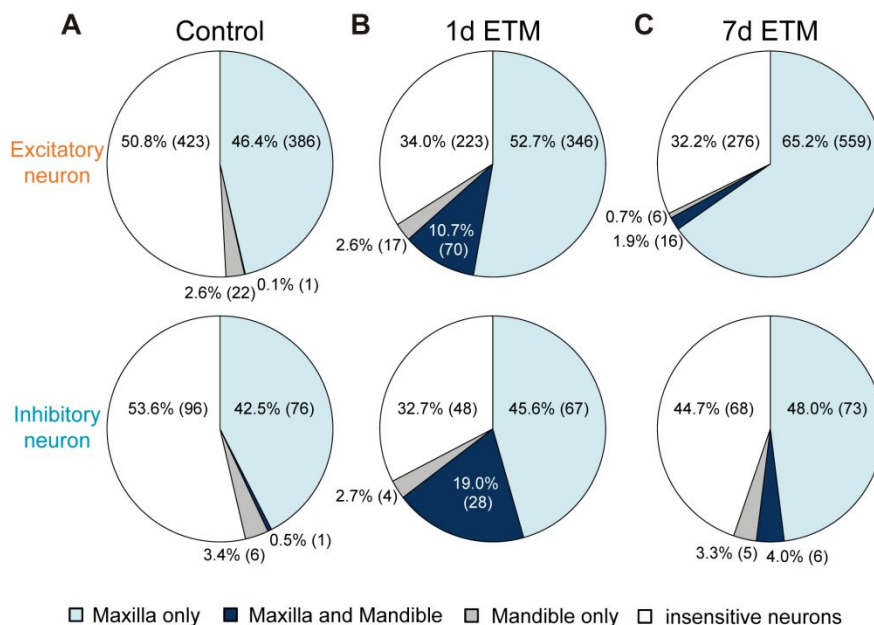
##### Maxilla



##### Mandible



(5) 上下顎歯根膜刺激に対する興奮性および抑制性神経細胞の応答性



□ Maxilla only ■ Maxilla and Mandible ▒ Mandible only □ insensitive neurons

A: 対照群における, 上顎臼歯および下顎臼歯歯根膜刺激に対するニューロンの応答性の解析結果。観察したニューロンが上顎および下顎歯根膜刺激のどちらに応答を示したかを割合で表示した。括弧内には実際のニューロン数を示す。  
対照群では, 上顎臼歯歯根膜刺激に応答を示すニューロンが多く観察された。本実験の観察視野において, 上下顎臼歯両方に応答を示すニューロンおよび下顎臼歯のみに応答するニューロンはほとんど認められなかった。

B: 矯正力負荷1日後に, 上顎歯根膜刺激, および上下顎歯根膜刺激両方に応答を示すニューロンの割合が顕著に増加した。

C: 矯正力負荷7日後に, 上下顎歯根膜刺激両方に応答を示すニューロンが減少した。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計4件)

- (1) 堀貫恵利, 本吉満, 小林真之 (2018) 矯正力負荷による大脳皮質ニューロンの歯根膜刺激に対する興奮応答の時系列解析, 第77回日本矯正歯科学会大会
- (2) 堀貫恵利, 小林真之, 清水典佳 (2017) 矯正力は大脳皮質興奮性および抑制性ニューロンの歯根膜刺激に対する応答を増大させる, 第59回歯科基礎医学会
- (3) 堀貫恵利, 小林真之, 清水典佳 (2017) 矯正力は大脳皮質ニューロンの歯根膜電気刺激に対する応答を増大させる, 第76回日本矯正歯科学会大会
- (4) Horinuki E, Shimizu N, Kobayashi M (2017) Experimental tooth movement increases the excitability of excitatory and inhibitory neurons in the insular cortex, 30<sup>th</sup> Taiwan association of orthodontists annual meeting

6. 研究組織