

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18789

研究課題名（和文）アデノシン三リン酸に着目した矯正歯科治療時の疼痛発症の新規メカニズムの解明

研究課題名（英文）Investigation of the development of pain during orthodontic tooth movement with adenosine triphosphate

研究代表者

水原 正博（Mizuhara, Masahiro）

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：60845402

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：矯正歯科治療中の患者の多くが疼痛を感じるため、矯正歯科治療中の疼痛管理は重要である。本研究ではアデノシン三リン酸(ATP)の小胞輸送体である小胞型ヌクレオチドトランスポーター(vesicular nucleotide transporter; VNUT)に着目し、矯正学的歯の移動時の疼痛発症へのATPの作用を探索した。

NiTiクローズドコイルスプリングを用いて、ラットの歯牙移動を行った。ラットの疼痛関連行動は増加し、阻害薬の投与で減少した。しかし歯根膜組織におけるVNUTの発現変化は認めず、関連性を確認できるには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、矯正学的歯の移動における疼痛発症にATPの小胞輸送体であるVNUTが重要な役割を果たしていることが示された。歯根膜組織におけるVNUTの役割についての詳細な解明は出来なかったものの、広く存在していることから、様々な情報伝達に関与している可能性がある。疼痛発症だけでなく、骨リモデリングの細胞間情報伝達や機序の解明への今後の研究の一助になるとと思われる。

研究成果の概要（英文）：Orthodontic patients experience pain and discomfort to varying degrees during the course of treatment. Therefore, pain control is imperative in orthodontic treatment. In the present study, we examined whether the vesicular nucleotide transporter (VNUT), which is a vesicle transporter of adenosine triphosphate (ATP), in periodontal ligament cells participates in tooth movement-induced nociception.

A fixed nickel-titanium alloy closed-coil spring appliance was constructed to induce mesial movement of the right maxillary first molar in rats. Face-grooming behaviors (indicators of nociception) were significantly increased after experimental tooth movement. Increased face-grooming behaviors were suppressed by systemic administration of the inhibitor. However, changes in expression of VNUT gene was not detected.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 アデノシン三リン酸 小胞型ヌクレオチドトランスポーター クロドロン酸 ビスホスホネート 疼痛

1. 研究開始当初の背景

疼痛は矯正歯科治療における最も大きな副作用の一つである。矯正歯科治療中の患者の多くが疼痛を感じるため、矯正歯科治療中の疼痛管理は重要である。矯正学的歯の移動は、歯に矯正力を加えることにより生じる。歯根膜細胞が矯正力を起因として、様々な生化学的メディエーターを放出することで、歯根膜細胞が周囲の骨芽細胞や破骨細胞に情報伝達することで骨リモデリングが行われる。その結果歯は目的の場所へ移動する。この過程の中で、炎症反応を引き起こすため疼痛を生じるが、その疼痛発症のメカニズムの全容は明らかになっていない。

生化学的メディエーターの一つであるアデノシン三リン酸(ATP)は、生命活動に必須のエネルギー源としてだけでなく、細胞間の情報伝達物質としても注目されている。歯根膜細胞においても、矯正力のようなメカニカルストレスによって ATP が放出されることが過去の研究において示されている。ATP 受容体のプリン作動性 P2 受容体の一種である P2X3 イオンチャネルは、一次求心性侵害受容ニューロンで高度に発現している。過去の動物実験では、三叉神経節の P2X3 受容体が、歯の移動によって誘発される侵害受容の発生とその継続に重要であることが示されている。これらの過去の研究から、歯根膜細胞から放出される ATP が矯正歯科治療における疼痛発症に関与していると考えられる。

細胞からの ATP 放出の経路には様々な経路があり、コネキシンチャネル (Connexin) やパネキシンチャネル (Pannexin) などの膜貫通タンパク質を介した経路や、分泌顆粒が細胞膜外層と融合し、顆粒内容物を細胞外へ放出する、エキソサイトーシスによる経路などが存在する (図 1)。近年、この分泌顆粒への ATP 輸送を行う、小胞型ヌクレオチドトランスポーター (vesicular nucleotide transporter; VNUT) が発見されて注目を浴びている。これまでの研究で VNUT は様々な細胞での発現が確認され、全身の疼痛発症に広く関わっていることが明らかになってきている。申請者はこれまでの研究で、ヒト歯根膜細胞にも VNUT が存在し、メカニカルストレスに反応して、細胞外への ATP 放出を促進することを明らかにした (図 1、2)。しかし、放出された ATP の矯正歯科治療中の疼痛発症への関与は不明である。そこで、矯正力によるメカニカルストレスにより、歯根膜細胞からの VNUT による ATP 放出により、侵害受容性求心性神経終末の ATP 受容体を活性化し、疼痛発症しているのではないかと仮説を立て、検討することとした。

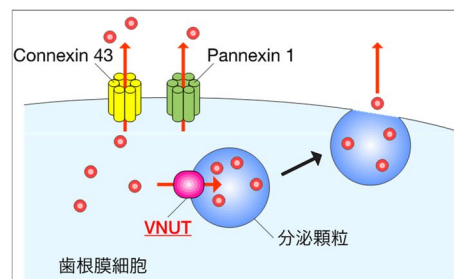


図 1 歯根膜細胞からの ATP 放出経路

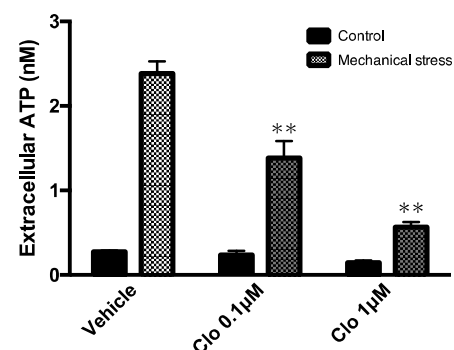


図 2 VNUT を介した ATP 放出量の分析

2. 研究の目的

ATP の小胞輸送体である VNUT に注目し、矯正歯科治療における ATP を介した疼痛発症の新規メカニズムを解明する。実験的歯の移動モデルラットにて、ATP 輸送機構の阻害薬を用いて、疼痛関連行動や侵害刺激伝達の変化を解析することで、矯正学的歯の移動時の疼痛発症への ATP の作用を探索する。本研究によって、歯科矯正臨床のみならず外傷後の疼痛を含む、全身の疼痛に対する新規の鎮痛薬の開発を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験的歯の移動による疼痛関連行動の評価

雄性 Wistar 系ラットの上顎右側切歯-上顎右側第一臼歯間にニッケルチタン合金製のクローズドコイルスプリングを装着し、右側上顎第一臼歯を近心移動させた (図 3)。ラットに矯正力を負荷した時の疼痛の指標として、ラビング行動 (口舐め行動) と、ワイピング行動 (両前肢の拭き取り行動) を、移動開始 1 日後に測定した。

クロドロン酸 (VNUT 阻害薬) を疼痛行動評価の 60 分前に尾静脈より静脈内投与し (図 3)、疼痛関連行動の測定を行った。対照実験として、陽性対照には TNP-ATP (P2X3 阻害薬)、陰性対照には生理食塩水 (Vehicle) をそれぞれ静脈内投与し、疼痛関連行動を測定した。

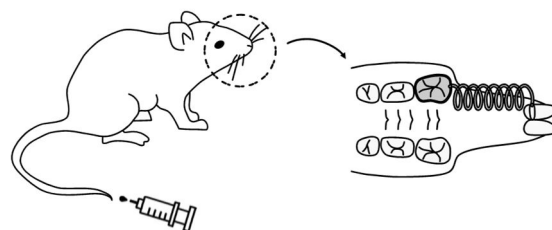


図 3 ラット尾静脈への薬剤投与の方法および上顎骨における装置装着と歯の移動方法

(2) ラットの歯根膜における ATP 放出機構の発現の評価

ラットの右側上顎第一臼歯の実験的歯の移動終了後、組織標本を作成した。ラットを安楽死させた後、上行大動脈に留置針を挿入し、固定液(10%中性緩衝ホルマリン液)を用いて灌流した。灌流固定の後に、上顎第一臼歯及び周辺の組織を含む上顎骨を取り出し、中性緩衝ホルマリン液にて浸漬固定を行った。その後 10%EDTA 溶液に 2 週間浸漬して脱灰を行った。次いで、10、20、30%のショ糖溶液に浸漬し、段階的に脱水を行った。上顎骨を急速に凍結し、クリオスタットを用いて厚さ 5 μm の連続切片を作製した。切片は蛍光免疫染色を行い、ATP 放出機構の発現変化を評価した。

4. 研究成果

(1) 実験的歯の移動による疼痛関連行動の変化

生理食塩水の尾静脈を介した静脈内投与 (Vehicle 処置) を行ったラットでは、ニッケルチタン合金製のクローズドコイルスプリングの装着前(Pre)と比較して実験的歯の移動によってラビング行動、ワイピング行動の両方が増加することを確認した。VNUT 阻害薬であるクロドロン酸 (Clo) の静脈内投与を行ったラットでは、Vehicle 処置をしたラットと比較して、ラビング行動、ワイピング行動の両方が有意に減少した。また、陽性対照として、P2X3 受容体拮抗薬である TNP-ATP の静脈内投与を行ったラットでも同様に、ラビング行動、ワイピング行動の両方が有意に減少した。クロドロン酸を投与したラットの疼痛行動は、陰性対照である TNP-ATP を投与したラットと同レベルにまで減少した(図 4)。

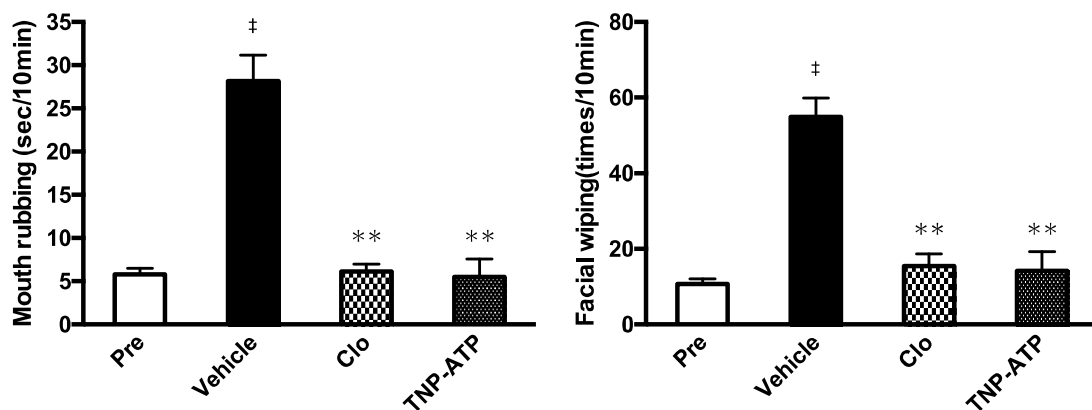


図 4 ラットの実験的歯の移動における、疼痛関連行動であるラビング行動およびワイピング行動の時間と回数、また薬剤投与時の疼痛関連行動の変化

(2) ラットの歯根膜における VNUT の発現

実験的歯の移動を開始 1 日後、灌流固定を行い、上顎骨組織を一塊にして取り出した。組織切片の作製及び蛍光免疫染色を行い、VNUT の発現を観察した。VNUT 免疫反応性は、ラットの歯根膜腔において全体に広く分布していた(図 5)。

しかし、染色条件の設定に苦慮したこともあり、ラットの歯根膜腔における VNUT の発現を確認するにとどまった。実験的歯の移動によるラットの歯根膜腔での VNUT の発現変化および疼痛関連行動との関連までを確認できるまでには至らなかった。



図 5 ラットの歯根膜腔における VNUT の発現

以上より、矯正学的歯の移動における疼痛発症に ATP の小胞輸送体である VNUT が重要な役割を果たしていることが示された。歯根膜組織における VNUT の役割についての詳細な解明は出来なかったものの、広く存在していることから、様々な情報伝達に参与している可能性がある。過去の多くの研究で、細胞外 ATP が骨リモデリングの調節因子の 1 つであることが示されている。歯根膜細胞においては P2Y1(P2Y1 受容体)や P2X7(P2X7 受容体)を介して、osteopontin(OPN)や Receptor activator of NF- κ B ligand(RANKL)の発現を誘導し、細胞外 ATP が破骨細胞活性を始めとする骨リモデリングに関与することが報告されている。疼痛発症だけでなく、骨リモデリングの細胞間情報伝達や機序の解明への今後の研究の一助になるとと思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mizuhara Masahiro, Kometani-Gunjigake Kaori, Nakao-Kuroishi Kayoko, Toyono Takashi, Hitomi Suzuro, Morii Aoi, Shiga Momotoshi, Seta Yuji, Ono Kentaro, Kawamoto Tatsuo	4. 巻 110
2. 論文標題 Vesicular nucleotide transporter mediates adenosine triphosphate release in compressed human periodontal ligament fibroblast cells and participates in tooth movement-induced nociception in rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2019.104607	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------