

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10168

研究課題名（和文）歯の移動に伴うPiezoチャネルを介した疼痛発症機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of pain caused by tooth movement via Piezo channels

研究代表者

左合 美紗（Sago, Misa）

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号：40815825

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 歯科矯正治療時に歯周組織で生じる様々な変化がすべて矯正力という機械刺激に起因するにも関わらず、歯周組織においてどのような経路を介して機械刺激が受容され疼痛発症に寄与しているかは不明である。本研究では、ヒト歯根膜線維芽細胞（HPdLF）におけるPIEZOチャネルの機能及び発現を調べることでPIEZOチャネルを介した歯の移動に伴う疼痛発症機序を解明することを目的とした。HPdLFの細胞膜上のPIEZO1は圧力によって活性化され、細胞内 Ca²⁺依存性エキソサイトーシスおよび ATP透過性チャネルを介してATP放出を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、ヒト歯根膜線維芽細胞におけるPIEZOチャネルの機能及び発現を明らかにしただけではなく、矯正力を想定した圧力負荷モデルを新規に作製し、圧力負荷時における歯周組織での機械刺激受容を明らかにした。これまでに報告されている調節機構を包括的に捉えることが可能となり、矯正治療時の疼痛に対する治療法の開発、ひいては口腔顔面領域での疼痛発症機序の解明に繋がる。

研究成果の概要（英文）：The various changes that occur in the periodontal tissue during orthodontic treatment are all caused by mechanical stimulation called orthodontic force. However, it remains unclear how mechanical stimuli are received in periodontal tissues and how they contribute to pain development. In this study, we aimed to elucidate the mechanism of pain associated with tooth movement mediated by PIEZO channels by investigating the function and expression of PIEZO channels in human periodontal ligament fibroblasts (HPdLF). PIEZO1 on the cell membranes of HPdLFs is activated by compression force and then induces ATP release via intracellular Ca²⁺-dependent exocytosis and ATP-permeable channels.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：PIEZO

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正治療中90%以上の患者が痛みを訴える。矯正力という持続的な機械刺激により歯根膜では非感性炎症反応が生じ、さまざまな炎症性メディエーターや侵害受容性神経線維からは神経ペプチドが放出されることで疼痛が誘発されると考えられている。これまでの実験的歯の移動モデルにおいて、侵害性熱刺激およびプロトン受容に關与するTRPV1チャンネル、ATP受容に關与するP2Xチャンネル、NMDA受容体、カルシトニン関連遺伝子ペプチド受容体およびケモカインリガンド2受容体に関する研究が報告されている (Qiao H et al. 2015; Gao Y et al. 2016; Cheng Y et al. 2019; Yang Z et al. 2009; Long H et al. 2015; Yang Z et al. 2014)。またヒト歯根膜線維芽細胞に対する機械刺激によりATP放出が増加し、疼痛発症に關与していることも明らかとなった (Mizuhara M et al. 2020)。矯正治療時に歯周組織で生じる様々な変化は、すべて矯正力という機械刺激に起因するにも関わらず、歯周組織においてどのような経路を介して機械刺激が受容され疼痛発症に寄与しているかは不明な点が多い。PIEZ01, 2は2010年に同定された機械受容性イオンチャンネルであり、細胞膜の張力変化に応じて開口し、細胞内に陽イオンを取り入れる。歯根膜にはPIEZ01チャンネル、後根神経節およびメルケル細胞にはPIEZ02チャンネル、三叉神経節にはPIEZ01および2が発現していることが報告されている (Jason Wu et al. 2017)。そこで申請者は、機械受容性イオンチャンネルであるPIEZ0チャンネルに着目し、ヒトおよびラットの組織におけるPIEZ0チャンネルのmRNA発現レベルを調べた。PIEZ01はヒトおよびラットの歯根膜で高い発現傾向を示した。また炎症性シグナルはPIEZ02を介した機械受容性電流の増強に關与することが知られ、Epac1(cyclic AMP sensor)の活性化は、機械的に誘発されたPIEZ02電流を増強することも報告された (Eijkelkamp N et al. 2013)。さらにPIEZ01は三叉神経のTRPV1陽性神経線維に発現していることも報告された (Nikita M et al. 2019)。これらのことから、矯正力が加わることで機械感受性PIEZ0チャンネルを介して疼痛が誘発されるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究は、ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLF) における PIEZO チャンネルの機能及び発現を調べることで機械刺激感受性 PIEZO チャンネルを介した歯の移動に伴う疼痛発症機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) RT-qPCR

ヒト組織細胞での PIEZO1 と PIEZO2 の mRNA 発現量の違いを確認するため、ヒト後根神経節 total RNA、HPdLF のサンプルを用いPIEZ01、PIEZ02 の mRNA 発現量を調べた。

(2) 蛍光免疫染色

歯根膜線維芽細胞に発現する PIEZO1 を視覚的に確認するため蛍光免疫染色を行った。後に紹介する圧力負荷実験で実験環境が低酸素状態になることが想定されたため、実験後の細胞に低酸素マーカーである HIF-1 の発現も調べた。

(3) Ca²⁺ イメージング

細胞膜上に発現する PIEZO1 の活性化状態を観察するため、カルシウムイメージングを行った。PIEZ01 選択的アゴニストである Yoda1 を作用させ、チャンネルの開口による細胞内カルシウムイオン濃度の変化を観察した。

(4) ヒト歯根膜線維芽細胞への圧力負荷モデル開発

2g の分銅を用い、矯正力を想定した in vitro 圧力負荷モデル (IVWLC) を開発した。処置 24 時間後の培養液を回収し、細胞生存率及び ATP 測定を行った。

(5) Yoda1 添加実験及び各種阻害剤添加実験

圧力負荷実験と Yoda1 添加実験において、機械受容チャンネル阻害薬および ATP 経路阻害薬を添加した場合の ATP 放出量の変化を調べた。

(6) PIEZO1 ノックダウン・酸化ストレス・ROS 計測

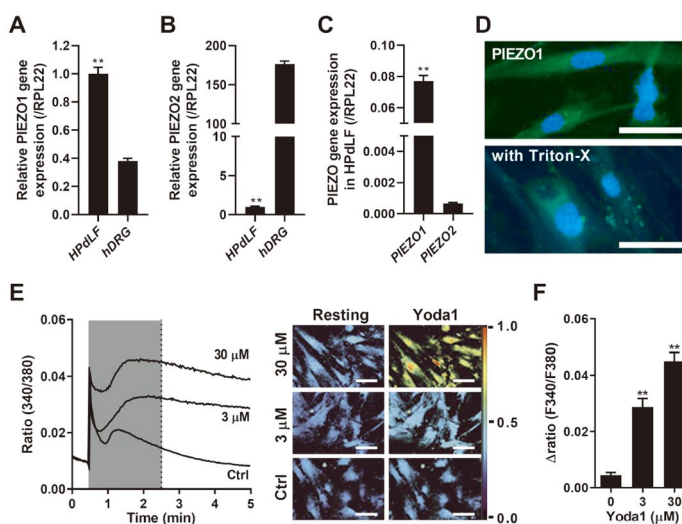
歯根膜線維芽細胞の PIEZO1 の機能を解明するための shRNA による PIEZO1 ノックダウン実験、細胞毒性を示すといわれる活性酸素種 (ROS) の 1 つである過酸化水素を用いた細胞生存率の

評価、圧力負荷実験後の活性酸素種の生産量の変化を測定した。

4. 研究成果

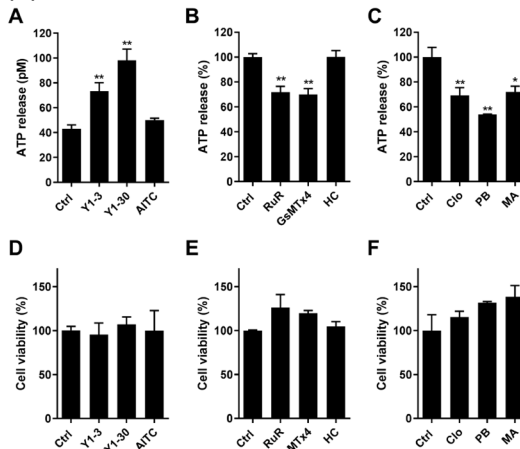
HPdLF では、PIEZO1 mRNA が PIEZO2 mRNA よりも豊富に発現した (図 1 A-C)。HPdLF における PIEZO1 の遺伝子発現が確認されたため、タンパク質レベルでの発現を蛍光免疫染色にて調べた。PIEZO1 染色では、細胞全体に陽性反応があり、細胞核付近に小さな強い陽性反応を認めた。Triton-X 処理により明確に観察された (図 1 D)。次に PIEZO1 の機能的発現を調べるため、PIEZO1 選択的アゴニスト Yoda1 を作用させ、細胞内の Ca^{2+} 動態を調べた。Yoda1 による Ca^{2+} 応答は濃度依存的に増加した。(図 1 E, F)

図 1



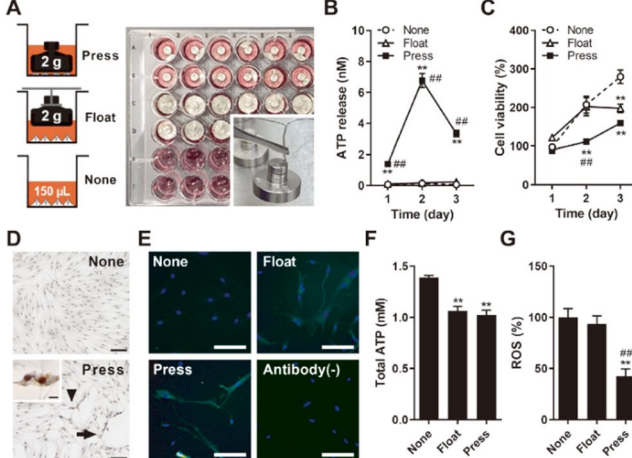
PIEZO1 の活性化により細胞内に Ca^{2+} が流入することが確認された。HPdLF に発現した PIEZO1 は Ca^{2+} 流入以降の細胞応答を誘発する機能を示した。PIEZO1 活性化後の細胞応答として細胞外 ATP 放出が考えられたため、PIEZO1 選択的アゴニストである Yoda1 添加実験を行い、ATP を計測した。Yoda1 は、添加後 24 時間の培養液中の ATP 濃度を用量依存的に増加させた。TRPA1 選択的アゴニスト AITC を添加しても ATP 濃度は変化しなかった。30 μ M の Yoda1 による ATP 放出は、PIEZO1 チャネル阻害作用がある RuR と GsMTx4 によって著しく抑制されたが、HC による変化はなかった。ATP 放出経路阻害剤である Clo, PB, MA は、30 μ M の Yoda1 による ATP 放出を有意に阻害した (図 2 A-C)。RuR や GsMTx4 は細胞膜上に発現したチャネルに作用するため、これらの ATP 放出の抑制は、HPdLF からの細胞外 ATP 放出が細胞内の PIEZO1 ではなく、細胞膜上の PIEZO1 によって開始されることを示唆している。また TRPA1 のみの活性化では細胞外 ATP 放出は起きないことが示された。これらの実験では、試薬添加後の細胞生存率に有意な変化は見られなかった (図 2 D-F)。

図 2



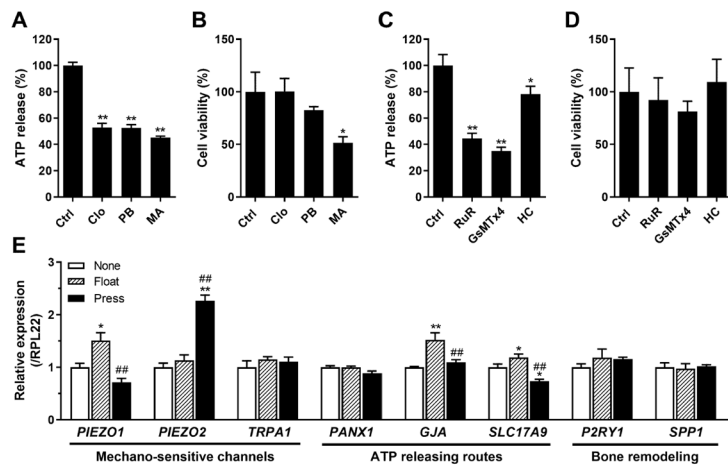
新規に開発した圧力負荷実験にて ATP 放出が誘導されるか検討を行った。Press では、24 時間後の培養液中の ATP 濃度が、None および Float と比較して増加した。Float と Press では、細胞生存率が有意に変化し、それぞれ Float では増加、Press では減少した (図 3 A-C)。本実験では分銅を Well 上に蓋をするように静置するため、細胞への酸素供給状態を評価した。低酸素マーカーである HIF-1 の免疫蛍光検査を行ったところ、Float および Press で免疫陽性を認めた (図 3 D, E)。細胞内の total ATP は Float と Press で有意に低下した (図 3 F)。Float と Press は、分銅によってウェル内の培養液に空気が供給されないため、細胞が低酸素環境下にあったと考えられる。圧力負荷実験において、他群と比較し Press 群で ROS 生産量の低下が認められた (図 3 G)。Press での細胞生存率低下の原因は ROS によるものでなく分銅による機械的損傷とも考えられる。

図 3



Press 条件下での各種阻害剤の影響を調べた。Press による ATP 放出は、RuR、GsMTx4、HC によって 24 時間後に有意に抑制された。試薬添加後の細胞生存率に大きな変化は見られなかった。Clo、PB、MA は、Press による ATP 放出を有意に阻害した。試薬添加後の細胞生存率は、MA が阻害したものの、Clo、PB に有意な変化は見られなかった(図 4 A-D)。MA による細胞生存率低下は、Connexin43 の細胞増殖能への関与を示唆している。

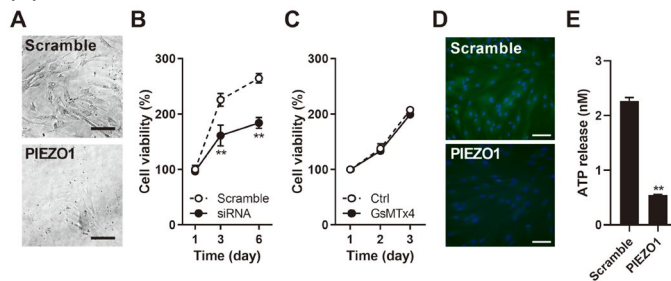
図 4



さらに圧力負荷による遺伝子発現量の変化を調べた。PIEZO1 遺伝子は Press によってダウンレギュレートされ、PIEZO2 遺伝子は逆に発現が増加し、TRPA1 遺伝子は Float および Press で発現が減少した(図 4 E)。PIEZO1 遺伝子のダウンレギュレーションは、細胞生存率低下に関係している可能性がある。PIEZO2 は PIEZO1 に代わってより長く機械刺激を受容する重要なメカノセンサーである可能性がある。骨再形成シグナルの重要な因子として知られている ATP 受容体 P2Y1、オステオポンチンと RANKL の mRNA は、どの条件でも 24 時間後に変化がなかった。変化が認められなかった原因として実験時間の不足が考えられる。

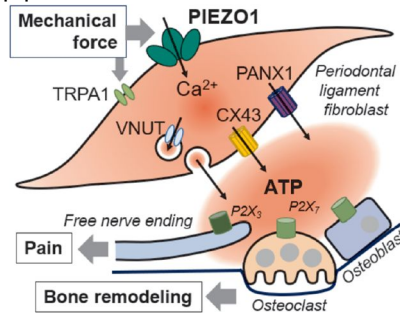
Press 条件で PIEZO1 遺伝子が低下したことを踏まえ、shRNA で Piezo1 ノックダウンをおこなった。shRNA で処理した HPdLF は細胞増殖を示さなかった(図 5 A-E)。一方、PIEZO1 阻害作用がある GsMTx4 の添加では細胞増殖に影響を与えなかった。GsMTx4 は細胞膜上の PIEZO1 に作用することから、細胞小器官に発現する PIEZO1 が細胞増殖に関与すると考えられる。

図 5



以上より、HPdLF の細胞膜上の PIEZO1 は圧力によって活性化され、細胞内 Ca^{2+} 依存性エキソサイトーシスおよび ATP 透過性チャネルを介して ATP 放出を誘導することが示唆された(図 6)。

図 6



< 引用文献 >

Hu Qiao, YuNan Gao, Caidi Zhang, Hong Zhou (2015) Increased expression of TRPV1 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain during experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 123(1):17-23.

Yunan Gao, Yingfei Liu, Kun Zhu, Zhichao Zhang, Hu Qiao, Zhen Lu, Tianyu Zhong, Yong Liu, Hong Zhou (2016) *Neurosci Lett.* 628:67-72.

Yangfan Chen, Peina Huang, Bowen Meng, Lei Gan, Dongle Wu, Yang Cao (2019) *Arch Oral Biol.* 98:81-86.

Zhi Yang, Yang Cao, Yan Wang, Wei Luo, Xiaochuan Hua, Yun Lu, Zhengyu Liao, Wenli Lai, Zhihe ZhaoLong H (2009) *Arch Oral Biol.* 54(1):63-70.

Hu Long, Lina Liao, Meiya Gao, Wenqiang Ma, Yang Zhou, Fan Jian, Yan Wang, Wenli Lai (2015)

Neuropeptides. 52:31-7.

Zhi Yang, Wei Luo, Jing Wang, Yu Tan, Runqing Fu, Bing Fang (2014) *Angle Orthod*, 84(4):730-6..

Masahiro Mizuhara, Kaori Kometani-Gunjigake, Kayoko Nakao-Kuroishi, Takashi Toyono, Suzuro Hitomi, Aoi Morii, Momotoshi Shiga, Yuji Seta, Kentaro Ono, Tatsuo Kawamoto (2020) *Arch Oral Biol*, 110:104607.

Jason Wu, Amanda H Lewis, Jörg Grandl (2017) *Trends Biochem Sci*. 42(1):57-71.

N Eijkelkamp, J E Linley, J M Torres, L Bee, A H Dickenson, M Gringhuis, M S Minett, G S Hong, E Lee, U Oh, Y Ishikawa, F J Zwartkuis, J J Cox, J N Wood (2013) *Nat Commun*. 4:1682.

Nikita Mikhailo, Jarkko Leskinen, Ilkka Fagerlund, Ekaterina Poguzhelskaya, Raisa Giniatullina, Oleg Gafurov, Tarja Malm, Tero Karjalainen, Olli Gröhn, Rashid Giniatullin (2019) *Neuropham*. 149:113-123.

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 Horie Seiwa, Nakatomi Chihiro, Ito-Sago Misa, Morii Aoi, Orimoto Ai, Ikeda Hiroshi, Hsu Chia-Chien, Naniwa Mako, Mizuhara Masahiro, Gunjigake Kaori, Kawamoto Tatsuo, Ono Kentaro	4. 巻 45
2. 論文標題 PIEZ01 promotes ATP release from periodontal ligament cells following compression force	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 European Journal of Orthodontics	6. 最初と最後の頁 565 ~ 574
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ejo/cjad052	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
研究分担者	川元 龍夫 (Kawamoto Tatsuo) (50323704)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	小野 堅太郎 (Ono Kentaro) (40316154)	九州歯科大学・歯学部・教授 (27102)	
研究分担者	郡司掛 香織 (Gunjigake Kaori) (90448811)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	
研究分担者	黒石 加代子(中尾加代子) (Kuroishi Kayoko) (60468303)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	水原 正博 (Mizuhara Masahiro) (60845402)	九州歯科大学・歯学部・助教 (27102)	
研究分担者	森井 葵 (Morii Aoi) (20882046)	九州歯科大学・歯学部・医員 (27102)	

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