

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 8日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592596

研究課題名（和文） 歯の移動によって生じる痛みのメカニズムを探る新たなアプローチ

研究課題名（英文） New approach to the mechanism of the pain by orthodontic tooth movement

研究代表者

村上 隆（MURAKAMI TAKASHI）

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：00534786

研究成果の概要（和文）：歯に矯正力をかけると痛みが生じる。これまで痛みのメカニズムの解明へ向けた研究は、神経細胞にその焦点が置かれていた。本研究では新たに、神経細胞をとりまくグリア細胞に着目し、歯の移動によって生じる痛みの発生にどのように関与するかを探索した。本研究の結果、歯の移動時におけるグリア細胞の経時的発現が明らかとなっただけでなく、痛み関連因子である CGRP 及び VR1 の関与も明らかにすることが出来た。

研究成果の概要（英文）：Orthodontic tooth movement evokes a pain. As for the past research to the mechanism of the pain, the focus has been placed on neural cells. This research newly focused on glial cells surrounding neurons, and searched how glial cells involved in the development of the pain by orthodontic tooth movement. This research revealed not only temporal distribution of activated glial cells but also the involvement of CGRP and VR1 in central nervous system during orthodontic tooth movement.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 / 矯正・小児系歯学

キーワード：グリア、痛み、歯の移動、共焦点顕微鏡、組織学的形態計測

1. 研究開始当初の背景

歯に矯正力をかけると痛みが生じる。しかし、その発生と制御の機構は依然不明な点が多い。これまでの痛みのメカニズム解明へ向けた研究の殆どは、神経細胞にその焦点が置かれていた。

一方、グリア細胞は神経細胞の周囲をとり

まき数的には神経細胞の数倍にも及んでい。従来、グリア細胞は経細胞の維持やその神経細胞の働きを補助する程度にしか考えられてこなかったが、最近痛みの情報伝達に重要な役割を示すことが明らかにされている。

我々の研究グループはこの痛みが発生す

るメカニズムについて、侵害情報が中枢神経系ならびに末梢神経系の神経細胞においてどのように伝達ならびに制御されるかを検討してきた。しかし、いまだその機構は依然不明な点が多く、臨床において痛みに対する対策は十分であるとは言い難い。一方、これまでニューロンの支持細胞としてあまり注目がなされていなかったグリア細胞が、痛みの発生に直接関与することが明らかになり注目をあつめている。しかしながら、歯の矯正によって生じる痛みの発生に、グリア細胞がどのように関与しているのか国内外において未だ研究されていない。

そこで、今回、歯の移動によって生じる痛みの発生にグリア細胞が果たす役割を検討する。

2. 研究の目的

我々の研究グループは歯の移動で生じる痛みが一般的な急性痛とどのように異なるのか検討を重ね、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と中枢神経系において伝達ならびに制御されるメカニズムを明らかにしてきた。一方、歯の移動による痛みは通常では痛みとして感じない咬合力などの刺激を痛みとして感じる事が特徴で、このような痛覚過敏はアロディニアと呼ばれる。このアロディニアの形成にグリア細胞の活性化が関与することが最近の研究から示されている。これらのことから、我々は歯の移動によって生じる痛みに関与するグリア細胞が関与するという着想にいたった。

この様な着想のもと、本研究の前実験として実験的歯の移動モデルで痛みが延髄後角におけるグリア細胞の分布にもたらす影響を検討したところ、マイクログリアとアストロサイトの分布が著しく増加することを既

に研究成果として観察している。そこで、グリア細胞の役割をさらに検討するために延髄後角でマイクログリアとアストロサイトの果たす役割をさらに詳細に検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験的歯の移動時において、延髄後角より上位の中枢神経系におけるマイクログリアやアストロサイトの蛍光免疫染色を行う。各組織に対し、時間経過ごとに画像解析ソフトを用いて定量化し、比較検討する。

①実験的歯の移動モデルおよび切片作成。6週齢雄性Wister系ラットをネンブタール全身麻酔下で、左側上顎第一、第二臼歯間に矯正用ゴムを挿入し実験的歯の移動を行う。実験開始12時間、24時間、3日、5日、7日、14日、28日後に、ジエチルエーテル全身麻酔下で4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いてそれぞれ灌流固定を行う。その後、通法に従い、凍結包埋する。延髄後角や、さらに上位の中枢神経系に関してマイクロトーム(Leica, Germany)を用い、それぞれの時間経過ごとに厚さ20 μ mの連続切片を作成する。

②実験的歯の移動時におけるアストロサイトおよびマイクログリアの検索。作成したそれぞれの連続凍結切片を用いて、各組織および実験的歯の移動時間経過ごとにおけるアストロサイトおよびマイクログリアの活性化および分布を、アストロサイトおよびマイクログリアそれぞれの特異抗体を用いた蛍光免疫染色により検索する。

③アストロサイトおよびマイクログリア活性化の三次元構築ならびに組織学的定量化。蛍光免疫染色をおこなった組織切片それぞれを共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行う。これを、画像解析ソフト(Win-Roof)を用いて、アストロサイトおよびマイクログリア

ア分布領域の広さ、染色濃度そして量的変化を二値化し、定量解析を行う。

(2) P2X4受容体のmRNAの発現動態およびタンパクの動態について、*in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫染色を用いて観察し、定性的解析を行う。

①実験的歯の移動モデルおよび切片作成。6週齢雄性Wister系ラットをネブタール全身麻酔下で、左側上顎第一、第二臼歯間に矯正用ゴムを挿入し実験的歯の移動を行う。実験開始12時間、24時間、3日、5日、7日、14日、28日後に、ジエチルエーテル全身麻酔下で4%パラホルムアルデヒド(PFA)を用いてそれぞれ灌流固定を行う。その後、通法に従い、パラフィン包埋する。ミクロトーム(Leica, Germany)を用い、厚さ7 μ mの連続切片を作成する。

②実験的歯の移動時における P2X4mRNA およびタンパク発現の定性的解析。延髄およびよりの中枢神経系における P2X4 遺伝子の発現および分布を、連続切片を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法により検索する。プローブはDigoxigeninで標識し、ハイブリダイゼーション後の反応物の可視化はNBT/BCIPにより行う。それぞれの遺伝子発現パターンおよびそれらの分布の違いを経時的に比較検討し、実験的歯の移動時の痛み刺激における P2X4 遺伝子の役割を検討する。P2X4 タンパクに対しては免疫染色を行い、同様に観察する。

(3) 中枢神経系において、各実験的歯の移動時における歯の痛みに関連する領域の組織から回収・抽出したP2X4 受容体のmRNAおよびタンパクの時間経過における変化量を、定量PCR法およびWestern blot法を用いて定量的に解析する。

①実験的歯の移動時に、レーザーマイクロダイゼクションを用いて、中枢神経系における

歯の痛みに関連する領域の組織を特異的に回収する。対照群として、その周囲に存在する歯の痛み刺激に関連のない組織領域を用いる。その後、各組織から抽出した mRNA を用いて Reverse Transcription を行い、Real Time PCR 法にてその発現量を詳細に比較検討し、実験的歯の移動時の経時の変化に伴う P2X4 遺伝子の発現動態を明らかにする。さらに、アストロサイトおよび P2X4 遺伝子を発現するマイクログリアの活性化に対する影響も検索する。P2X4 タンパクに対しては、Western blot 法を用いて、同様にその経時の変化を詳細に比較検討する。

②本研究の成果を国際学会、歯科基礎学会、日本矯正歯科学会などの国内学会において発表し、それらをふまえた上で学術雑誌に投稿する予定である。

4. 研究成果

本研究の目的は、実験的歯の移動時におけるアストロサイトおよびマイクログリアの痛み刺激に関する役割を解明し、グリア細胞と歯の移動による痛みの発生との関連を示すことであった。

(1) 矯正治療に伴う痛みの発現機序を明らかにすることを目的として、実験的歯の移動による神経の活性化とグリア細胞の動態の関連性を調べるため、延髄におけるマイクログリアマーカーならびにアストロサイトマーカーと神経活性化マーカー(抗 c-Fos 抗体)の蛍光二重染色を行った。得られた共焦点顕微鏡像により、3次元立体構築を行い、形態計測用ソフトを用いてマイクログリアならびにアストロサイトと c-Fos との共存関係を調べた。その結果、Waldo 側では Control 側と比較し c-Fos の増加がみられた。さらに Waldo 側では c-Fos 陽性の神経線維周囲にマイクロ

グリア、アストロサイトの集積が認められた。実験的歯の移動により発現した c-Fos 陽性細胞の周囲に、グリア細胞の集積が認められたことにより、グリア細胞が疼痛の伝達に関与している可能性が示された。

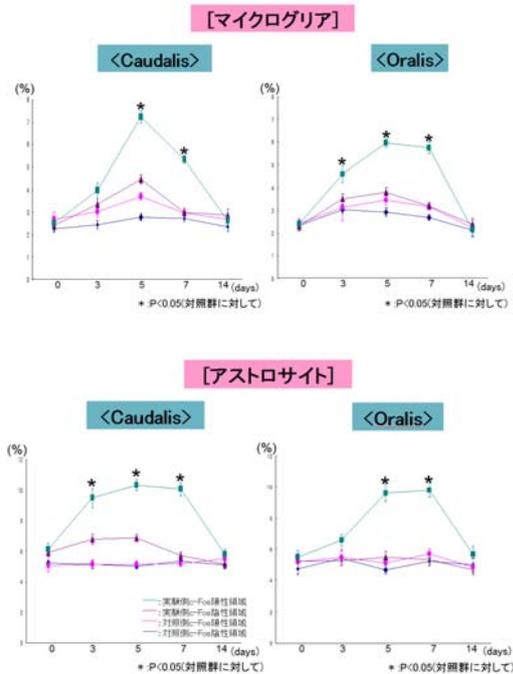


図 1 マイクログリアおよびアストロサイトの c-Fos 陽性領域における経時的発現動態

(2) 一方、実験的歯の移動時における痛みの発生機序に関する他の因子の関係性についても明らかにすることを目的に、痛み刺激の神経伝達への関与が示唆されている受容体である VR1 および神経ペプチドである CGRP の三叉神経節における活性化についても検討した。その結果、VR1 陽性三叉神経節ニューロンはその大きさに変化を認めた。正常ラットでは $400 \mu\text{m}^2$ 未満の小型のニューロンが $75.7 \pm 5.6\%$ を占め、 $400 \mu\text{m}^2$ 以上のものは $24.3 \pm 5.6\%$ であった。しかしながら、歯の移動 5, 7 日後では、 $400 \mu\text{m}^2$ 以上の VR1 陽性ニューロンの割合が増加し、 $400 \mu\text{m}^2$ 未満の VR-1 陽性ニューロンの割合が減少した(図 2)。

三叉神経節での大型細胞に VR1 の発現が増加したことは、神経の知覚過敏が、VR1 を介する神経の活性化に関連して引き起こされている可能性が示唆された。

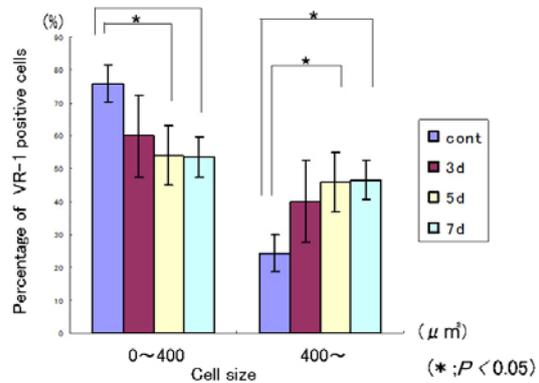


図 2 VR1 陽性細胞体の大きさの経時的変化

(3) さらに、CGRP 陽性細胞との二重染色から、歯の移動後に出現した多くの VR1 陽性ニューロンにおいて CGRP が発現していた。正常ラットの三叉神経節尾側 1/3 における VR1 陽性ニューロン中の CGRP 陽性ニューロンの割合は $73.9 \pm 7.9\%$ であった。この値は実験的歯の移動を行っても、大きな変化を示さなかった。つまり、CGRP についても VR1 同様の増減傾向を示したが、有意差は認められなかった。このことから、VR1 および CGRP が実験的歯の移動に伴う侵害刺激の受容および侵害情報の伝達に関与している可能性が示唆された。

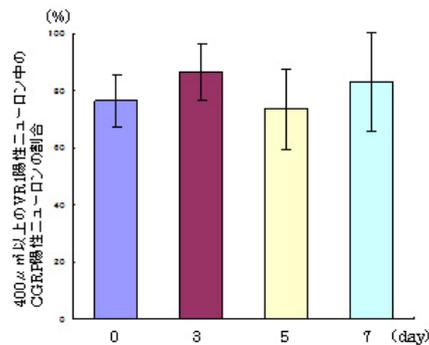


図 3 大型細胞の VR1 陽性細胞中における CGRP 陽性細胞の割合

当初予定していた研究方針から修正はあったが、本研究により、中枢神経系におけるマイクログリアならびにアストロサイトの、歯の移動における痛みの伝達における経時的な役割を探索することができた。さらに、関連因子として CGRP および VR1 の歯の移動における痛みの関係性を明らかにできたことは、同分野における研究をさらに推進させるためにも非常に有用であったと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

①足立理恵、実験的歯の移動における vanilloid receptor subtype1を発現する三叉神経節ニューロンの経時的变化、岡山歯学会雑誌、査読有、30巻、2011、1-11

[学会発表] (計2件)

①足立理恵、実験的歯の移動時の三叉神経節における VR-1 陽性神経線維の経時的变化、日本矯正歯科学会大会、2010年9月27日、パシフィコ横浜 (神奈川県)

②足立理絵、実験的歯の移動における c-fos の発現とグリア細胞の動態との関連性について、日本矯正歯科学会大会、2009年11月17日、マリンメッセ福岡 (福岡県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 隆 (MURAKAMI TAKASHI)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：00534786
(H21～H23)

藤井 昭仁 (Fuji AKIHITO)
岡山大学・岡山大学病院・助教
研究者番号：10452583
(H21)

(2) 研究分担者

上岡 寛 (KAMIOKA HIROSHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：80253219

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：70294428

(3) 連携研究者