

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：16101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670810

研究課題名(和文) 気圧変動および模擬無重力環境下での歯髄細胞の痛覚受容体発現に関する研究

研究課題名(英文) Effect of pressure change and simulated microgravity on the expression of pain receptors in cultured dental pulp cells

研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：10127847

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄が気圧変動から受ける影響を明らかにするため、ラット歯髄細胞由来細胞株RPC-C2Aが減圧条件下で示す細胞状態の変化や痛覚受容体関連遺伝子の発現変化を検索した。その結果、減圧(0.5気圧)下でも増殖速度には大きな影響がなかった。マイクロアレイ分析では、歯髄の痛覚機構に関連する温度受容体や慢性疼痛ATP受容体の発現量は減圧下でほとんど変化しなかった。さらに0.1気圧の条件下では、多くの遺伝子発現に変化がみられたが、痛覚受容体関連の遺伝子の発現変化は少なかった。すなわち、気圧変化が歯髄の痛覚発症メカニズムを直接的に変化させるとは考えにくいと推察された。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the effect of low-pressure atmosphere on the gene expression of pain-sensing mechanism of dental pulp cells. RPC-C2A cells derived from rat dental pulp were used to observe their changes under low-pressure atmosphere. The cells could grow under a 0.5 atmosphere pressure in a same growth rate as under a 1.0 atmosphere pressure. Microarray analyses showed that the cells had a same gene expression profile even under the low atmosphere environment for 8 days. Gene expressions of pain-sensing receptors were also unchanged under the environment. Similar pattern was observed even under 0.1 atmosphere pressure, whereas the change of other gene expression was observed. These results suggest that low atmosphere pressure is not directly affect on the pain-sensing mechanism of dental pulp cells.

研究分野：歯内治療学、歯周治療学

キーワード：歯髄細胞 気圧変動 痛覚受容体 マイクロアレイ分析

### 1. 研究開始当初の背景

激しい自発痛を伴う急性化膿性歯髄炎では、炎症によって誘導された組織内圧の上昇が疼痛をさらに増悪させる。パイロットや潜水ダイバーでは、歯髄が健常であっても気圧変化によって歯痛を起こしやすく、これらは barodontalgia (航空性歯痛、潜水性歯痛) と言われている。Barodontalgia は「気圧の変動が原因となって生じる歯痛」と定義されるが、口腔組織の構造や機能に及ぼす気圧の影響については未知の部分が多い。

一方、歯髄の痛覚受容体に関しては、主に温度刺激に反応する侵害刺激受容体 TRP (transient receptor potential) チャンネルファミリーのうち、TRPV1、TRPV2、TRPA1、TRPM8 などの存在が報告され、圧刺激については慢性疼痛や異常痛覚に関与する ATP 受容体のうち、G 蛋白質共役型受容体の一つである P2Y6 受容体の発現を介して interleukin-6 (IL-6) が誘導されることが報告されている。一般に、種々の刺激を受け疼痛が誘発される際には、刺激後の象牙細管内の組織液の動きがとくに重要である (Hydrodynamic concept)。しかし冷刺激後の疼痛発現と組織液の動きとは関係しないという報告もあり、barodontalgia を含めた異次元環境における種々の歯の痛みを理解するためには hydrodynamic concept とは別の視点からの検索、とくに分子レベルでの研究推進の必要性がある。さらに、圧力刺激を受けた歯髄細胞では細胞分化が進み硬組織形成能が亢進するという報告もあり、歯髄細胞は気圧変動や無重力環境下でも硬組織形成など多様な機能を発揮する可能性が考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、気圧変動に伴う歯痛に注目し、歯髄細胞が気圧変動で受ける影響を分子レベルで追求することによって、異次元環境での歯痛発症メカニズムの一端を明らかにしようとする研究である。すなわち、気圧変化を受けた培養歯髄細胞において歯痛関連の痛覚受容体や炎症性サイトカイン分子の発現がどのように変化するのか、また同様の環境下で齶蝕由来の炎症性刺激 (内毒素刺激) が加わったときに上記遺伝子がどのように変動するのかについて追求した。さらに、硬組織形成関連分子と痛覚受容体発現との関連についても検討した。

### 3. 研究の方法

気圧を変えて細胞培養が行える特殊な培養器は販売されていないため、業者と協力してオリジナルな培養器を作製した。各種高温炉や培養器を製造している SK メディカル社 (滋賀) に依頼し、培養器内部を温度  $37.0 \pm 0.5$  度、 $1.0 \sim 0.1$  気圧に設定出来る培養器を設計してもらい試行錯誤の後、完成した (図 1)。炭酸ガスは導入出来ないので培地

の pH 緩衝には HEPES を用いることとした。

ラット歯髄由来細胞株 RPC-C2A を用い、低気圧条件下での細胞増殖について検証した。すなわち、10% ウシ胎児血清、20mM HEPES を含む 変法最小必須培地 (-MEM) を用いて同細胞を 35mm 培養ディッシュに播種し、1.0、0.5 気圧下でそれぞれ最長 20 日間培養し、2 日おきにディッシュ内の細胞数を計測した。

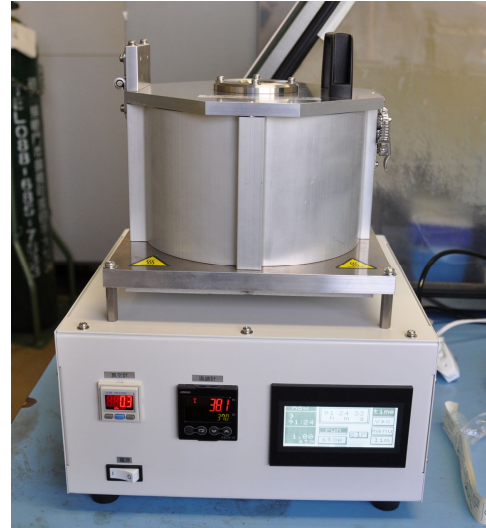


図 1 気圧変動可能培養器

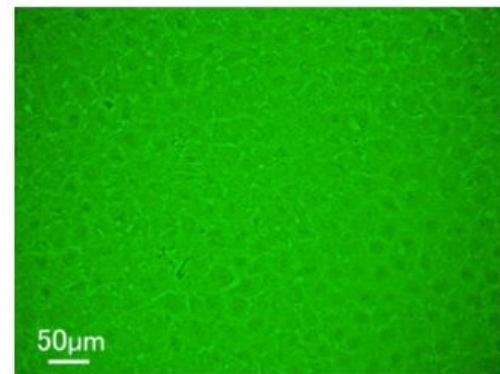


図 2 10 日間 1 気圧で培養した RPC-C2A 歯髄細胞

細胞形態の変化については、位相差顕微鏡下で観察を行い、写真撮影を行った (図 2)。

次に、気圧による歯髄由来細胞の形質変化を調べるため、細胞がディッシュ上でコンフルエントに達するまで通常の条件下で培養した後、1.0、0.5 気圧下でそれぞれ最長 9 日間培養した。また、6 時間、24 時間のみ異なる気圧条件下で培養する群も用意した。さらに、1.0、0.1 気圧条件下での比較も行った。

細胞の発現遺伝子を網羅的に解析するため、培養後の細胞より RNA を抽出し (RNeasy

Plus mini kit, Qiagen 社), マイクロアレイ発現解析 (GeneChip Rat Gene 2.0ST array, Affymetrix 社) を行った。比較する実験群間で遺伝子発現を比較し、2 倍以上の差 (増加もしくは減少) が見られた遺伝子を抽出した。また、痛覚受容体や石灰化基質蛋白など注目している遺伝子の発現変化を検査した。

#### 4. 研究成果

減圧培養器での細胞培養は、予備実験の結果、収納できる培養ディッシュ数に制限があるものの、通常通り行えることが分かった (図3)。

この装置を用いて以下の実験を行った。

(1) 気圧が細胞の増殖に及ぼす影響を調べるため、1.0 気圧群と 0.5 気圧群の細胞増殖曲線を比較したところ、有意な差は見られなかった。すなわち 0.5 気圧下でも細胞はほぼ通常通り増殖し、コンフルエントに到達した (図3)。一般的に、飛行機内は約 0.8 気圧富士山頂約 0.6 気圧、エベレスト山頂約 0.3 気圧であることから、通常、人間が生活している環境では、気圧が細胞増殖に直接及ぼす影響は小さいと推察された。

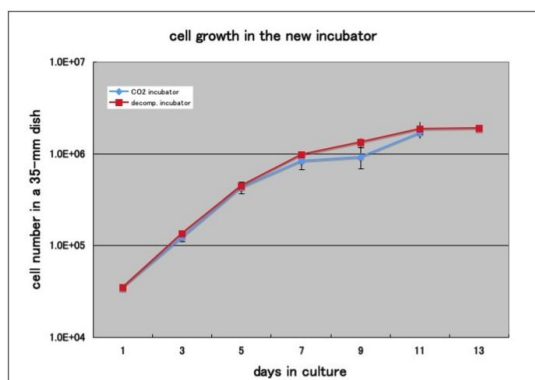


図3 細胞増殖に及ぼす気圧変化の影響

(2) 気圧が細胞の形質変化・遺伝子発現に及ぼす影響を調べるため、細胞増殖がプラトーに達したのち 1.0 気圧と 0.5 気圧の条件下でそれぞれ 6 時間、24 時間、そして 9 日間培養した。各培養時点での両者の発現遺伝子をマイクロアレイ解析によって比較した (図4-1&2)。その結果、どの時点においても、発現量が大きく変わった遺伝子は少なく、ほぼ同じ発現パターンを示した。

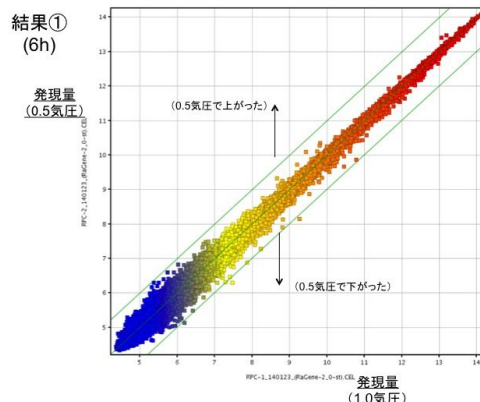


図4-1 0.5 気圧・培養 6 時間後の遺伝子発現変化プロファイル

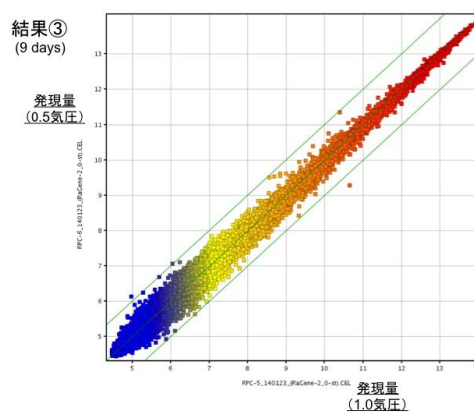


図4-2 0.5 気圧・培養 9 日後の遺伝子発現変化プロファイル

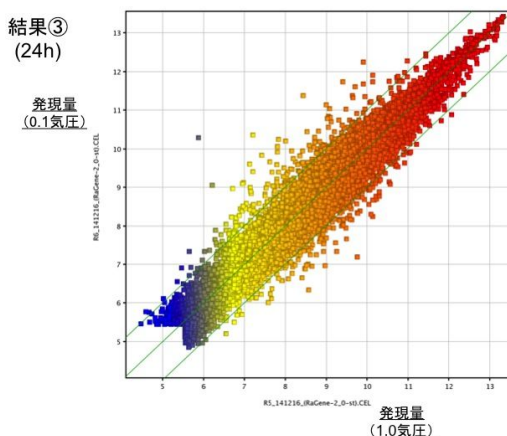
次に、侵害刺激受容体や石灰化基質蛋白の発現について検索してみた (表1) が、やはりほぼ同様の発現量を示した。これらの結果は、低気圧環境下でも、気圧の変動が痛覚受容体や石灰化関連遺伝子発現に直接的に影響を及ぼすわけではないことを示唆しているものと考えられた。

表1 各種遺伝子 (侵害刺激受容体、石灰化基質蛋白) の遺伝子発現変化

FC (abs)	Regulation	1.0 atm	0.5 atm	genesymbol
1.55	down	7.07	6.44	Il6
1.10	up	6.59	6.74	P2rx1
1.07	down	6.71	6.61	P2rx3
1.24	down	6.91	6.60	P2ry6
1.03	up	5.95	5.99	Trpa1
1.04	up	8.75	8.81	Trpm3
1.03	up	6.26	6.30	Trpm8
1.02	up	6.76	6.79	Trpv3
1.12	down	7.71	7.55	Trpv4

(3) さらに低い気圧の影響を調べるため、0.1 気圧の環境下で先と同様の実験を行った。この環境下では培地がわずかに変色し、pH が十分緩衝されてないと推察された。RNA を抽出しマイクロアレイ解析を行ったところ、全体に遺伝子の発現に差が出てはいたが( 図 5 ) 侵害刺激受容体や石灰化基質蛋白の発現量はほぼ一定だった。これらの結果より、気圧変化によって生じる歯髄の痛みは気圧変化によって直接的に生じるのではなく、歯髄腔という硬組織に囲まれた空間に存在することと関連しているのではないかと推察された。

ちなみに、本実験で著しい遺伝子発現の増加を示した分子は、carbonic anhydrase-12 (Car12: 21.4 倍) adenylylase kinase-4( Ak4: 9.0 倍) aldolase C, fructose-bisphosphate (Aldoc: 7.7 倍) laminin, beta3 Lamb3: 7.2 倍) などであり、著しく発現が減少した分子は、chemokine C ligand2 (Ccl2: 17%まで低下) matrix Gla protein (Mgp: 25%まで低下)、asporin (Aspn:29%まで低下)、calmodulin-like 4 (Calml4: 33%まで減少) osteomodulin (Omd: 35%まで減少)、toll-like receptor 3 (Tlr3: 36%まで減少) などであった。発現減弱遺伝子の中に総組織形成に関連する Mgp や Omd が含まれていたことは興味ある発見である。



**図5**  
0.1 気圧・培養 24 時間後の遺伝子発現  
変化プロファイル

以上の結果から、気圧変動は歯髄細胞の痛覚関連遺伝子発現に直接的に影響を及ぼさないという当初の仮説とは違う結果が得られた。当初、本研究では、気圧変動によって遺伝子発現に大きな変化が認められた場合には、無重力環境での歯髄細胞の遺伝子発現の変動も調べる予定であったが、残念ながらその段階には至らず、barodontalgia(航空性歯痛、潜水性歯痛)の原因究明研究の発展に十分に貢献できなかった。しかしながら、0.1

気圧で歯髄細胞を培養した場合には硬組織に関連する分子の現弱も認められたことから、今後の課題としては、気圧変動を受けた場合の他の遺伝子変動に着目し、それらの遺伝子の変化に由来する間接的な面からの痛覚受容体の発現変動についてさらに追求し、barodontalgia との関連を見出すことが重要であると考えられた。

## 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)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田 俊彦 (NAGATA, Toshihiko)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号：10127847

### (2) 研究分担者

大石 慶二 (OISHI, Keiji)  
徳島大学・病院・講師  
研究者番号：00253211