

令和元年5月7日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11793

研究課題名(和文)ATPによる歯の痛みの伝達機構の解析

研究課題名(英文)Investigation of tooth pain transmission mechanism via ATP

研究代表者

郡司掛 香織 (GUNJIGAKE, Kaori)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90448811

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：矯正歯科治療は痛みを伴うが、その発生機序の全容は未だ明らかになっていない。本研究では矯正歯科治療によって歯根膜細胞がアデノシン三リン酸(ATP)を小胞によって細胞外に放出して痛みが発生すると考え調査した。その結果、培養細胞へ圧迫力をかけたときにATPの小胞性放出に関係するVNUTの遺伝子発現が上昇し、ATPの放出が増加した。またラットの歯に矯正力をかけたときの痛み痛み行動が、VNUT阻害薬によって減少した。これらの結果から矯正学的歯の移動時の疼痛発症に、ATPの小胞性の放出が重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、矯正学的歯の移動における疼痛発症に、HPDL細胞からのVNUTを介した小胞性ATP放出が重要な役割を果たしていることが示された。低用量のクロドロネートは、骨代謝への影響が少なく、既存の鎮痛薬と比較して、強力な鎮痛効果を有し、矯正学的歯の移動への影響が少ない新規の鎮痛薬として役立つ可能性があり、矯正治療において、患者の不快な出来事である歯の移動に伴う痛みの機序解明につながる可能性があり、これまで痛みのために治療を断念していた患者をなくし、さらに患者のQOLや治療に対するモチベーションも大いに向上することが期待され、社会にも大きな影響を与えると予想される。

研究成果の概要(英文)：The mechanism pain during orthodontic treatment has not been clarified. In this study, we investigated whether periodontal ligament cells extracellularly release adenosine triphosphate (ATP) by vesicles via VNUT and cause pain during orthodontic treatment. We found that mechanical stimulation by centrifugation to HPDL cells induced ATP release. By real-time PCR, we also demonstrated that the expression of VNUT increased by centrifugation for HPDL cells, depending on CF. We further demonstrated that clodronate, that is a VNUT inhibitor, reduced ATP release from HPDL cells by centrifugation. Face-grooming behaviors were decreased significantly after administered a low concentration of clodronate as well as TNP-ATP. Our results indicated that the released ATP via VNUT from HPDL cells plays an important role in pain transmission on orthodontic treatment. Clodronate might serve well as a novel analgesic drug with few side effects in orthodontic treatment.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯科矯正学 歯の移動 痛み ATP

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正治療時の歯の移動に伴う痛みはほぼ全ての患者が感じるため重要な問題である。痛みの軽減方法は非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) の服用が一般的だが、NSAIDs の服用によって歯の移動が妨げられることから、新たな痛みの軽減方法が望まれる。本研究では、近年神経伝達物質として注目されているアデノシン三リン酸(ATP)に焦点をあて、ATP を介した矯正歯科治療に伴う疼痛発生メカニズムを解明することを目的とする。痛みにおける ATP の役割を解明することにより、矯正治療時に生じる痛みの新たな制御機構が展開され、また疼痛を伴う他の全身性の疾患における痛みの予防法や治療法開発を目指す。

2. 研究の目的

矯正力は、ヒト歯根膜 (HPDL) において、圧迫側および牽引側を形成し、血流の変化を引き起こす炎症反応の一部であり、その結果、骨の吸収および形成を経て骨リモデリングが起こり、歯の位置が変化する。これらの過程で、HPDL 細胞から放出される種々の生化学的メディエーターの1つであるアデノシン三リン酸 (ATP) は、生命活動のエネルギー源として知られているが、細胞間の情報伝達を担う重要な物質でもある。本研究では、ATP トランスポーターである小胞性ヌクレオチドトランスポーター (vesicular nucleotide transporter; VNUT) に注目し、HPDL 細胞での ATP を介した痛みの情報伝達における VNUT の関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 培養ヒト歯根膜 (HPDL) 細胞への遠心力によるメカニカルストレスの適用

購入した HPDL 細胞へ矯正装置による歯の移動中の圧迫側を想定して、インキュベータ内に設置した遠心分離機を用いて、遠心力による重力負荷のメカニカルストレス (CF) を HPDL 細胞に 40, 90, 135g で加えた。また、CF による細胞傷害の評価のため、細胞から放出された乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性を定量した。

(2) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 分析と免疫組織化学分析

HPDL 細胞から RNA を単離し GAPDH、VNUT、コネキシン (Cx)43、パネキシン (Px)1、P2X3 のプライマーを用いて RT-PCR 分析を行った。さらに、カバーガラス上で培養した HPDL 細胞、一次抗体に抗 VNUT ウサギポリクローナル抗体、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ IgG 抗体を使用してタンパク発現を調べた。

(3) ATP 放出の測定

CF による HPDL 細胞からの ATP 放出をルシフェリンルシフェラーゼ法にて調べた。

また、ATP 放出経路を検討するため、CF 適応の 30 分前に、ATP 放出経路の阻害剤であるクロドロネート (VNUT 阻害薬)、メクロフェナム酸ナトリウム塩 (Cx43 阻害薬)、プロベネシド (Px1 阻害薬) を添加し、ATP 放出量を調べた。

(4) 定量的リアルタイム PCR (q-PCR) による遺伝子発現解析

CF を適用した HPDL 細胞における VNUT, Cx43, Px1 の発現を q-PCR によって評価を行った。

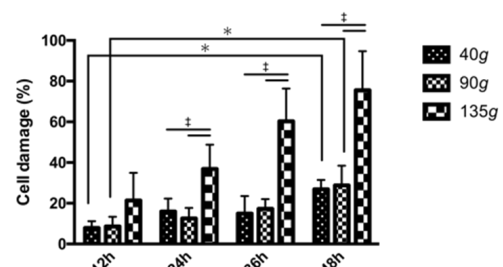
(5) ラットに対して実験的な歯の移動を行った際の痛みの評価

雄性 Wistar 系ラットの右側上顎第一臼歯をニッケルチタン合金のクローズドコイルスプリングを用いて近心移動させた。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) を測定した。また生理食塩水、クロドロネート (VNUT 阻害薬) または TNP-ATP (P2X3 阻害薬) を疼痛行動評価の 60 分前に静脈内投与した際の疼痛行動も測定した。

4. 研究成果

(1) CF による細胞傷害性

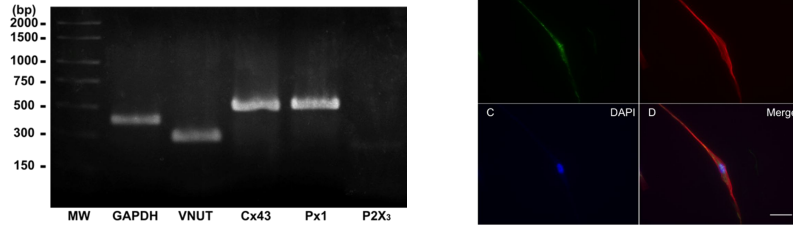
HPDL 細胞において 40g, 90g の CF により 48 時間で有意な LDH の増加を認めた。また 135g の CF では 24 時間以降で有意な増加を認めた。この結果からその後の全ての実験は 40g, 90g の大きさの CF で、12, 24, 36 時間適用した。



(2)HPDL 細胞における半定量的 RT-PCR による VNUT 遺伝子の発現と、免疫組織化学による VNUT タンパク質の発現および局在

RT-PCR 分析によって HPDL 細胞における VNUT 遺伝子の発現を確認した。また、ATP 放出に関するヘミチャネルである Cx43, Px1 遺伝子の発現も確認した。

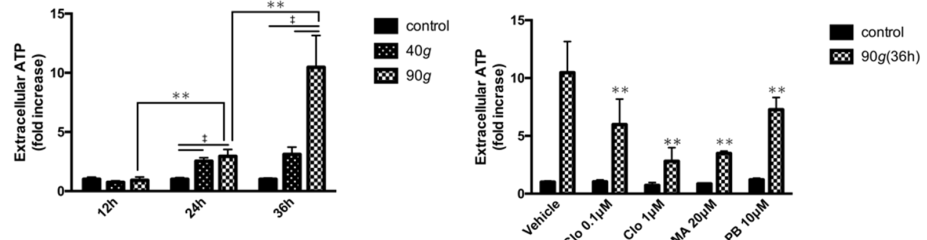
また免疫組織化学的分析より、HPDL 細胞において VNUT 免疫反応性が、HPDL 細胞の全体に広く分布していた。



(3)CF による HPDL 細胞からの ATP 放出の評価

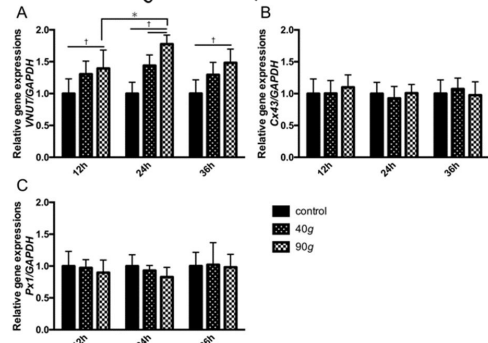
CF 適用後、24 時間で ATP 放出量が増加し、CF の大きさの増加、また時間の増加に依存して培養液中の ATP 濃度は増加した。

クロドロネートの添加により、CF を適応した HPDL 細胞からの ATP 放出はおよそ 1/2 程度まで有意に減少し、濃度依存的に ATP 放出量は減少した。また、メクロフェナム酸ナトリウム塩およびプロベネシドもクロドロネートと同様に、ATP 放出量を有意に減少させた。



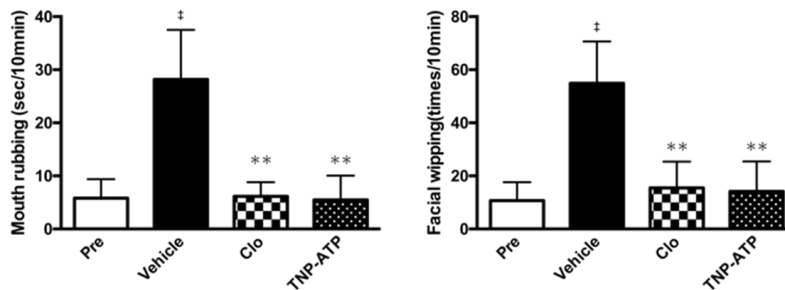
(4)CF による HPDL 細胞における VNUT, Cx43, Px1 の発現変化の評価

CF により HPDL 細胞における VNUT 遺伝子の発現は増加し、遠心力 90g, 24 時間で最も発現が増加した。一方で、Cx43 と Px1 遺伝子の発現に変化を認めなかった。



(5)ラットの疼痛行動に対するクロドロネートの疼痛抑制効果の評価

生理食塩水の投与を行ったラットでは、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した。一方 VNUT アンタゴニストであるクロドロネートの静脈内投与を行ったラットでは、vehicle 処置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、P2X3 受容体アンタゴニストである 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。



以上の結果から、矯正学的歯の移動における疼痛発症に、VNUT を介した HPDL 細胞からの ATP 放出が重要な役割を果たしていることが示された。低用量のクロドロネートは、骨代謝への影響が少なく、既存の鎮痛薬と比較して、強力な鎮痛効果を有し、矯正学的歯の移動への影響が少ない、新規の鎮痛薬として役立つ可能性があり、矯正治療において、患者の不快感な出来事である歯の移動に伴う痛みの機序解明につながる可能性があり、これまで痛みのために治療を断念していた患者をなくし、さらに患者の QOL や治療に対するモチベーションも大いに向上することが期待され、社会にも大きな影響を与えると予想される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)
(投稿中)

〔学会発表〕(計 5 件)

(1)水原正博、郡司掛香織、黒石加代子、森井 葵、井上愛沙子、真鍋義一、志賀百年、瀬田祐司、小野堅太郎、川元龍夫. : ATP による矯正学的歯の移動における疼痛発症機構の解明. 第 14 回九州矯正歯科学会学術大会 2019 年 2 月 16-17 日(福岡市)

(2)水原正博、郡司掛香織、黒石加代子、豊野孝、井上愛沙子、真鍋義一、志賀百年、瀬田祐司、川元龍夫. : ヒト歯根膜細胞の ATP 放出における小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)の役割. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会 2018 年 10 月 30-11 月 1 日(横浜市)

(3)水原正博、郡司掛香織、黒石加代子、豊野孝、井上愛沙子、真鍋義一、瀬田祐司、川元龍夫: 機械的刺激によるヒト歯根膜細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)の発現について. 第 78 回九州歯科学会総会学術大会 2018 年 5 月 12-13 日(北九州市)

(4)Mizuhara M, Gunjigake K, Kuroishi K, Toyono T, Inoue A, Manabe Y, Shiga M, Seta Y, Kawamoto T.: Expression of vesicular nucleotide transporter in compressed human periodontal ligament cells. 第 6 回アジア太平洋国際カンファレンス 2018 年 5 月 11 日(北九州市)

(5)水原正博、郡司掛香織、黒石加代子、豊野孝、井上愛沙子、真鍋義一、瀬田祐司、川元龍夫 : ヒト歯根膜細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーター(VNUT)の発現、第 13 回九州矯正歯科学会学術大会 2018 年 2 月 17-18 日(鹿児島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：川元 龍夫

ローマ字氏名：(KAWAMOTO, Tatsuo)

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 50323704

研究分担者氏名：黒石 加代子

ローマ字氏名：(KUROISHI, Kayoko)

所属研究機関名：九州歯科大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 60468303

(2)研究協力者

研究協力者氏名：水原 正博

ローマ字氏名：(MIZUHARA, Masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。