

令和 4 年 5 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10391

研究課題名（和文）矯正治療時の痛みにおける歯髄を介した新規伝達機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of a new transmission mechanism via pulp in pain during orthodontic treatment.

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は矯正歯科治療によって歯が移動するときの痛みの発生に、歯の中にある歯髄が関係しているのではないかと考え研究を行った。過去の我々の研究で歯の根の周囲にある歯根膜細胞がATPを放出して痛みを起していることが明らかとなったため、矯正歯科治療を想定した酸素濃度で培養した歯髄幹細胞から放出されるATP濃度を調べたが、増加していなかった。しかし低酸素状態での培養は、細胞増殖には影響せず、歯髄幹細胞が象牙芽細胞へと変化（分化）させるような傾向を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

矯正歯科治療時によって歯が移動するときの痛みは、ほぼ全ての患者が感じ、この痛みのために矯正治療を中断する患者もいることから重要な問題である。本研究で、矯正歯科治療によって歯髄の細胞（歯髄幹細胞）が象牙芽細胞に変化（分化）している可能性が示唆された。象牙芽細胞は過去の我々の研究で歯の痛みに関係していることが示されているため、この結果は矯正歯科治療時の痛みへの歯髄幹細胞の関与を示唆しており、歯髄幹細胞の分化をコントロールすることによって、様々な歯の痛みをコントロールできる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We considered and studied that the pulp may be related to the pain during orthodontic treatment. Since our previous reports revealed that periodontal ligament cells release ATP and cause pain, the extracellular ATP concentration when pulp stem cells were cultured at the oxygen concentration during orthodontic treatment was determined. Examined. However, the ATP concentration did not increase. On the other hand, low oxygen did not affect the cell proliferation of dental pulp stem cells, and it was observed that dental pulp stem cells tended to differentiate into odontoblasts.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯髄幹細胞 象牙芽細胞

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

矯正歯科治療中には、多くの患者が自発痛や咬合痛といった歯の痛みを訴える。これらの歯の痛みが起こる原因は、歯根膜に軽度の炎症が起こり、種々の起炎物質が放出されるためとされている。一方、歯の痛みについては動水力学説など象牙質 歯髄による痛みについて古くから議論されており、臨床的に矯正歯科治療中の痛みと歯髄の痛み閾値の低下の関連性が示されている〔文献1〕にもかかわらず、矯正歯科治療中の歯髄による痛みの発生機序については全く報告がない。

矯正歯科治療によって歯が移動する影響は歯周組織のみならず、歯髄にも及ぶ。矯正力が与えられた歯の歯髄では、歯髄組織の血流障害が起こり〔文献2〕、象牙芽細胞の空胞化、歯髄組織の線維化などの組織変化が矯正歯科治療開始後3日から3週間に持続して認められたと報告されている〔文献3〕。近年では成人の矯正歯科治療患者が増加している傾向にあるが、成人の歯髄中の血流量は若年者と比較して高齢であるほど減少し、矯正歯科治療中ではさらに減少することから〔文献3〕、矯正歯科治療による歯髄への影響はより大きい。

アデノシン三リン酸(ATP)は、細胞代謝に必須のエネルギー源として良く知られているが、近年では神経伝達物質として注目されている。これまでに歯髄細胞に侵害性機械刺激を加えると細胞内に存在するカリウムイオンやATPが組織内に放出されて炎症や疼痛を引き起こすこと、歯髄内は神経線維が豊富で神経終末にはATP受容体であるP2X3レセプターが存在すること〔文献4〕、ATP分解酵素であるNTPDaseが歯髄内の神経線維で発現していること〔文献5〕が示されており、ATPが象牙芽細胞または歯髄細胞から放出され、矯正歯科治療中の痛み発症に関与していることが予測されるが、どの細胞が、どのようにATPを放出し、痛みが発症しているかは明らかではない。

(参考文献)〔1〕Leavitt AH1 et al., Orthod Craniofac Res. 5:29-37 2002、〔2〕Seyda Ersahan1 et al, J Oral Science, 60:446-452, 2018、〔3〕Barat AR et al, J Oral Science, 51: 109-115, 2009、〔4〕Alavi AM et al, J Dent Res. 80:476-83, 2001、〔5〕Liu X et al, J Dent Res. 91:261-7, 2012

2. 研究の目的

歯髄組織は、硬組織に囲まれているため、歯髄組織の酸素濃度は空気中の酸素濃度に比べて低く、酸素濃度は約3%となることが知られている。また、矯正力による血管の圧迫や炎症などでさらに低酸素状態となる。しかし、低酸素が間葉系幹細胞であるヒト歯髄幹細胞(HDPSC)に及ぼす影響は分かっておらず、歯髄細胞の痛みへの関与も分かっていない。本研究の目的は、生理的酸素濃度(21% O₂)、平常時の酸素濃度(3% O₂)および矯正治療時の酸素濃度(0.5% O₂)におけるVNUTによるATP放出についてを調べ、HDPSCの特性および細胞増殖や分化への影響を明らかにすることとした。

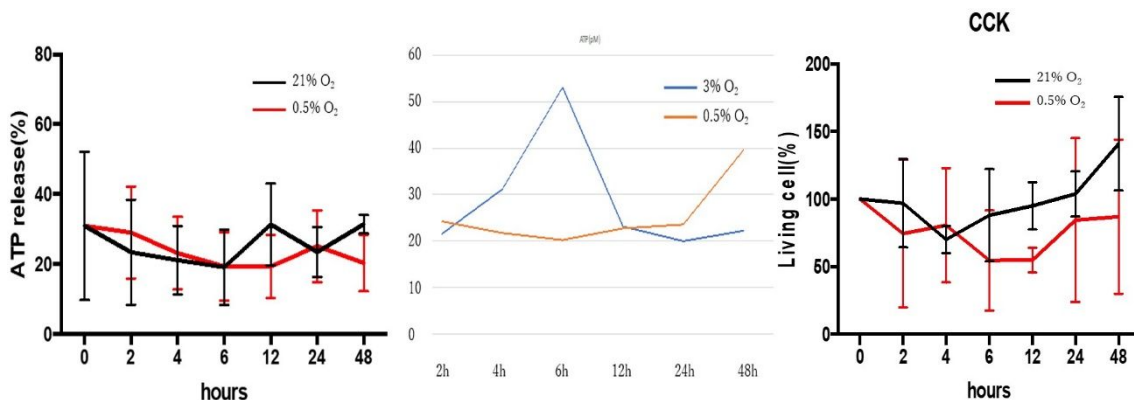
3. 研究の方法

HDPSCは矯正歯科治療のために抜去された健全な小臼歯と第三大臼歯より得た。抜歯直後に歯髄組織を取り出し培養した。矯正力により生じる低酸素状態を再現するため、脱酸素剤を用い嫌気環境にてHDPSCを2, 4, 6, 12, 24, 48時間培養した。各時点における間葉系幹細胞マーカー(CD90, CD105, CD44, CD73) 象牙芽細胞マーカー(ALP, DSPP, DMP-1)および骨芽細胞マーカー(Runx2, OCN)のmRNA発現をqPCR法にて調べた。また、低酸素によるHDPSCの細胞増殖および細胞分化への影響を調べるため、各時点における細胞増殖率はWST法、細胞増殖や細胞分化などを調整する細胞外シグナル分子として機能するATPの放出量の変化をルシフェリン・ルシフェラーゼ反応にて調べた(九州歯科大学倫理委員会承認番号20-43)。

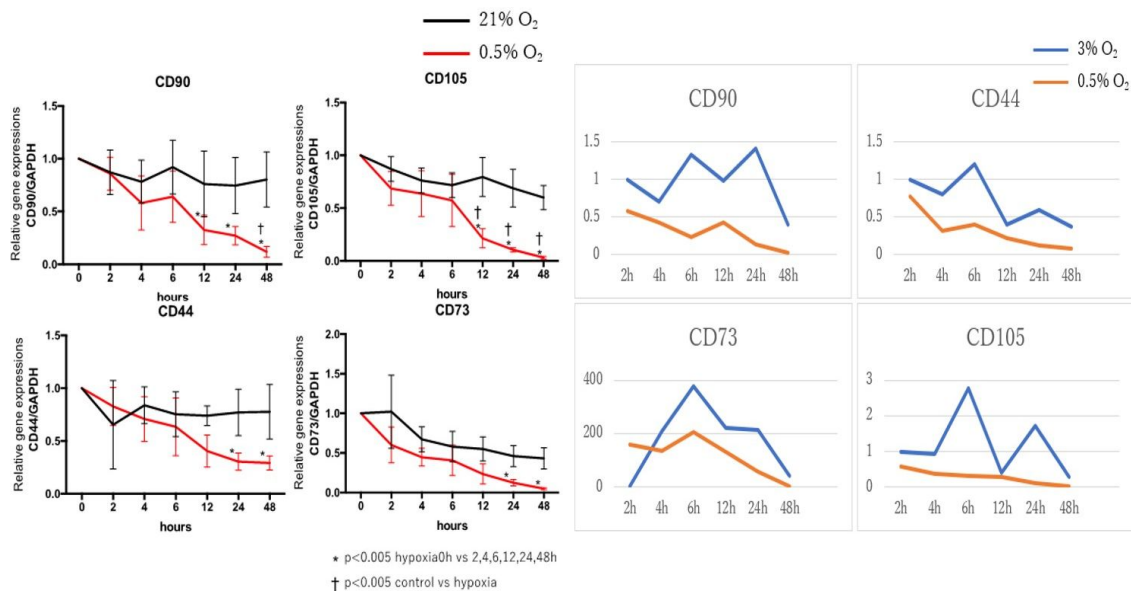
4. 研究成果

〔研究の主な成果〕

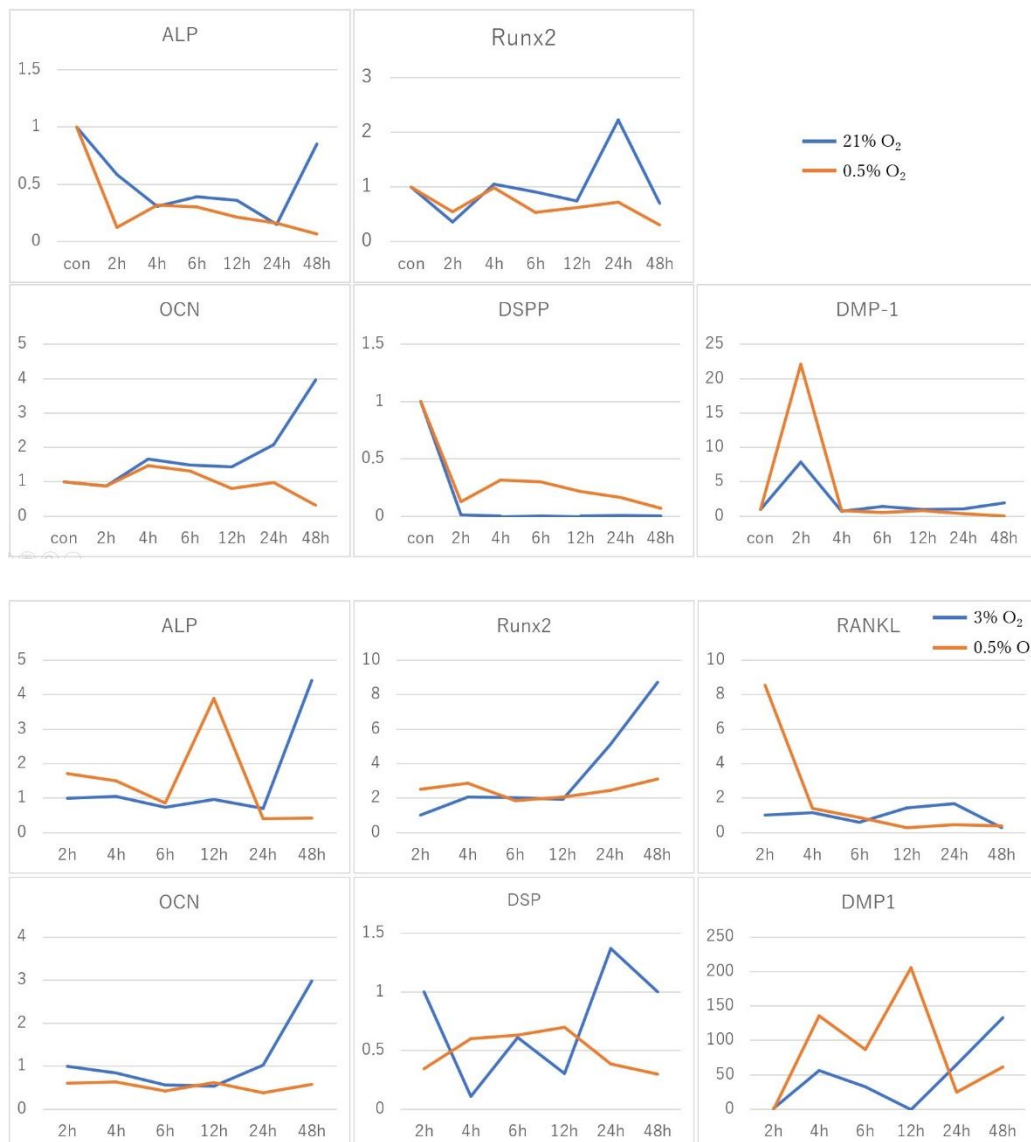
ATP発現は21% O₂と0.5% O₂培養下において比較すると有意差は認めなかった。3% O₂と0.5% O₂培養下においても明らかな違いはなかった。また、細胞増殖率は21% O₂と0.5% O₂培養下において比較すると低酸素培養12時間後までは減少傾向であったが、24時間以降は増加傾向が認められた。



間葉系幹細胞マーカーの発現は21%O₂と0.5%O₂培養下において比較すると0.5%O₂培養直後から徐々に低下し、48時間後には発現が最も低かった。3%O₂と0.5%O₂培養下では0.5%O₂培養は3%O₂よりも常に低い値であった。



象牙芽細胞マーカーおよび骨芽細胞マーカーの発現は21%O₂と0.5%O₂培養下において比較すると、明らかな変化は認められなかった。3%O₂と0.5%O₂培養下において比較すると、象牙芽細胞マーカー（ALP, DSPP, DMP-1）は、0.5%O₂培養開始4～12時間で3%O₂培養よりも多く発現した。



以上の結果をまとめると、歯髄幹細胞を低酸素下で培養したとき、ATP の細胞外放出量に影響はなかったが、培養 24 時間以降は細胞増殖率に大きな差が認められなかった。また 3%O₂ 培養下と比較して 0.5%O₂ 培養下において HDPSC の幹細胞性は低下し、象牙芽細胞マーカー (ALP, DSPP, DMP-1) の発現は増加した。これらのことから、HDPSC は 0.5%O₂ 培養下において象牙芽細胞に分化し生存することが示唆された。

〔得られた成果の国内外における位置づけとインパクト〕

歯科矯正治療時の歯髄細胞を想定した *in vitro* での研究は既に報告されているものの、多くはコントロール群として酸素濃度を 21%に設定している。しかし、現実的には歯髄の生理的状態の酸素濃度は 3%と低く、矯正治療中はさらに低酸素状態となる。本研究はその酸素濃度を再現して研究を行っていることが他の研究と比較して優れている。また、生理的低酸素状態と比較して、歯科矯正治療時の低酸素状態で歯髄幹細胞が矯正歯科治療中に象牙芽細胞へ分化する可能性が初めて示唆され、象牙芽細胞は以前の我々の研究から歯の痛覚に関係していることから、広く歯の痛みのコントロールを行う足がかりとなるかもしれない。

〔今後の展望〕

歯根膜を介した痛みの発生について、*in vitro* の実験でメカニカルストレスによって、VNUT (小胞型ヌクレオチドトランスポーター) を介した細胞外への ATP の放出が増加し、*in vivo* で矯正力により増加した疼痛行動が、VNUT の阻害によってコントロールレベルと同程度になったことから、矯正歯科治療による歯根膜を介した痛みの発現には VNUT を介した ATP の細胞外への放出が関係していることが示された。しかし、歯髄を介した痛みの発生については、矯正歯科治療時を想定して培養ヒト歯髄細胞を低酸素状態で培養したところ、VNUT の発現が減少し、ATP の細胞外への放出は通常培養と低酸素培養との間に有意差を認めなかったことから、VNUT を介した矯正治療時の歯の痛みについて、歯髄の関連は少ないことが示唆された。これは当初予想していないことであったため、低酸素によるヒト歯髄幹細胞の特性および細胞増殖への影響を明らかにすることを目的として研究を行った。その結果、歯髄幹細胞が象牙芽細胞へ分化する可能性は示されたものの、まだ研究途中であり、機序や機能等について明らかではないため、今後さらに調査を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2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 104607 ~ 104607
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Inoue Asako, Nakao Kuroishi Kayoko, Kometani Gunjigake Kaori, Mizuhara Masahiro, Shirakawa Tomohiko, Ito Sago Misa, Yasuda Kazuma, Nakatomi Mitsushiro, Matsubara Takuma, Tada Shigeyama Yukiyo, Morikawa Kazumasa, Kokabu Shoichiro, Kawamoto Tatsuo	4. 巻 10
2. 論文標題 VNUT/SLC17A9, a vesicular nucleotide transporter, regulates osteoblast differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 1612 ~ 1623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/2211-5463.12918	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mizuhara M, Gunjigake KK, Kuroishi KN, Toyono T, Hitomi S, Morii A, Shiga M, Seta Y, Ono K, Kawamoto T
2. 発表標題 Vesicular Nucleotide Transporter Mediates Pain during Orthodontic Tooth Movement.
3. 学会等名 第7回アジア太平洋国際カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上愛沙子、黒石加代子、郡司掛香織、水原正博、真鍋義一、志賀百年、古株彰一郎、川元龍夫
2. 発表標題 骨芽細胞における小胞型ヌクレオチドトランスポーター (Vnut) の発現と圧迫力付与による細胞傷害
3. 学会等名 第79回九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mizuhara M, Gunjigake KK, Kuroishi KN, Toyono T, Hitomi S, Morii A, Shiga M, Seta Y, Ono K, Kawamoto T
2. 発表標題 ATP Release via VNUT Mediates Pain during Orthodontic Tooth Movement
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 郡司掛 香織、黒石 加代子、水原 正博、白川 智彦、川元 龍夫
2. 発表標題 マルチブラケット装置による矯正歯科治療時の痛みについて
3. 学会等名 第80回 九州歯科学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梶原優那、郡司掛香織、黒石加代子、水原正博、豊野孝、瀬田祐司、川元龍夫
2. 発表標題 低酸素下でのヒト歯髄幹細胞の性質の変化
3. 学会等名 第17回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔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)	

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	志賀 百年 (Shiga Momotoshi) (20596134)	九州歯科大学・歯学部・准教授 (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)	
研究分担者	左合 美紗 (Sago Misa) (40815825)	九州歯科大学・歯学部・助教 (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