

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23062

研究課題名(和文) TRPV4を介した矯正歯科治療時の疼痛発症機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of TRPV4-induced orthodontic pain

研究代表者

森井 葵 (Aoi, Morii)

九州歯科大学・歯学部・医員

研究者番号：20882046

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)： 歯科矯正時の痛みは、歯根膜への機械刺激が原因と考えられている。本研究は、機械受容分子の1つであるTRPV4に着目し、歯科矯正時の疼痛発症への関与について検討した。ラット歯根膜において、線維芽細胞と自由神経終末にTRPV4は発現していた。ラット歯科矯正モデルにおいて、侵害応答指標であるラビング時間延長はTRPV4拮抗薬の投与により有意に抑制された。培養ヒト歯根膜線維芽細胞に対する圧刺激はATP分泌を促進させたが、TRPV4拮抗薬は何ら影響を示さなかった。これらのことより、歯科矯正時の疼痛は、歯根膜中のTRPV4発現神経終末が直接的に機械刺激を受けて発症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

歯科矯正時の痛みは患者に苦痛を与える負の要素である。日々患者と向き合っている中で、この痛みをなんとか除去できないかと思うことは多い。本研究により、TRPV4という機械受容イオンチャンネルが歯の移動時に引き起こされる痛みに関与することを動物実験にて明らかにした。将来的に、このTRPV4を標的とした製薬に発展すれば、歯科矯正患者の治療時の痛みを軽減できるかもしれない。本研究では歯根膜線維芽細胞に発現しているTRPV4の機能を明らかにすることができていないので、今後の課題としたい。

研究成果の概要(英文)： Orthodontic pain has been understood to be caused by mechanical stimulation to the periodontal ligaments. In this study, we investigated involvement of the mechanosensitive channel TRPV4 in orthodontic pain. In the periodontal ligament of rats, TRPV4-immunoreactivity was observed in fibroblasts and free nerve endings. In a rat orthodontic model, prolonged rubbing period, an indicator of nociceptive behavioral response, was significantly suppressed by administration of a TRPV4 antagonist. In cultured human periodontal ligament fibroblasts, extracellular ATP release following pressure stimulation was not changed by a TRPV4 antagonist. These results suggest that orthodontic pain is caused by direct mechanical stimulation of TRPV4-expressing free nerve endings in the periodontal ligament.

研究分野：口腔生理学

キーワード：歯科矯正 痛み TRPV4 歯根膜 線維芽細胞 自由神経終末

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染性炎症反応が生じ、さまざまな炎症性メディエーターや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。矯正力は、歯根膜を圧迫あるいは牽引することで、歯根膜内の血流を大きく変化させる。近年、in vitro において機械刺激あるいは低酸素刺激を加えることでヒト歯根膜線維芽細胞から ROS が産生されることが報告された。そこで申請者は、高い酸化感受性を持ち侵害受容に参与する TRPA1 チャンネルに着目し、行動学的、免疫組織学的および分子生物学的手法を用いて検討した。その結果、矯正力によって誘発される歯根膜および歯髄における酸化ストレスが、TRPA1 の活性化および機械感受性感作を介して侵害受容を誘発することを明らかにした(引用)。

非選択性陽イオンチャンネルである TRPV4 は細胞膜への伸展刺激のセンサーとして機能している。浸透圧刺激や血流の変化による shear stress などの機械刺激を感知して活性化し、TRPV4 を介した Ca²⁺流入に伴う細胞外 ATP 放出が引き起こされることが知られている。TRPV4 は血管内皮細胞や食道上皮細胞での発現も知られており、申請者は本研究課題申請前にヒト歯根膜線維芽細胞においても TRPV4 が発現していることを確認していた。これらのことから、矯正力が加わることで歯根膜線維芽細胞上の機械感受性 TRPV4 を介して ATP が放出されることで疼痛が誘発されるのではないかと考え、本研究課題を遂行した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、機械刺激感受性 TRPV4 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であった。侵害受容の主要分子である TRP チャンネルの中でも TRPV4 は特に機械刺激に対する感受性が強いにもかかわらず、これまで全く注目されていなかった。矯正治療時に歯周組織で生じるさまざまな変化は、すべて矯正力という機械刺激に起因するものである。本研究により歯周組織での機械刺激受容が明らかになれば、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。

3. 研究の方法

1. 実験的歯の移動モデルラットにおける疼痛関連行動に対する TRPV4 拮抗薬の影響

7 週齢雄性 Wistar ラットの上顎右側第一臼歯と同側切歯間に Ni-Ti コイルスプリングを装着し 50 gf の矯正力を付与する(実験群、右写真)。矯正力を加えていない群を sham 群とした。コイル装着から 1 日目に TRPV4 拮抗薬 RN-1734 (10 mg/kg、腹腔内投与)を投与し、30 分後に疼痛関連行動の指標とされているマウスラビング時間およびワイピング回数を 10 分間測定した。

TRPV4 拮抗薬の影響

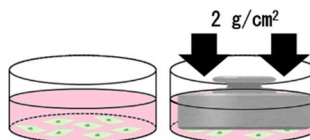


2. ラット歯根膜および三叉神経節における TRPV4 発現

歯根膜細胞における TRPV4 の発現変化を調べるために、上顎骨組織切片を作製し、抗 TRPV4 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。神経線維マーカーとして、PGP9.5 を用いた。さらに、逆行性神経トレーサーフルオロゴールド (FG) を歯根膜に微量注入し、数日後三叉神経節を採取して、凍結切片を作製した。FG 陽性のニューロンにおける TRPV4 抗体による免疫陽性細胞を調べた。

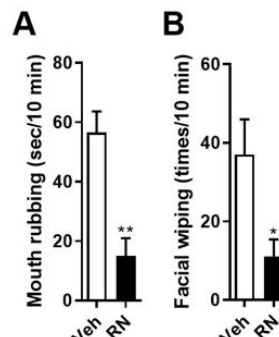
3. ヒト歯根膜線維芽細胞への圧刺激による ATP 放出に対する TRPV4 の影響

ヒト歯根膜線維芽細胞 (HPdLF) に対して簡単に圧刺激を付与できる実験系を新規に作製した(右図)。圧刺激後、培養液中の ATP 濃度を測定し、TRPV4 拮抗薬 RN-1734 添加に対する影響を調べた。また、HPdLF に TRPV4 作動薬 GSK 1016790A を作用させた場合の細胞内カルシウム濃度変化と細胞生存率を評価した。

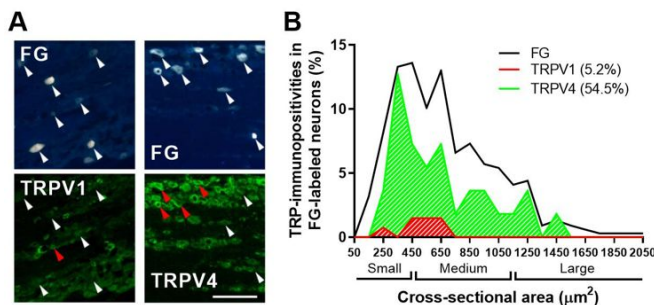


4. 研究成果

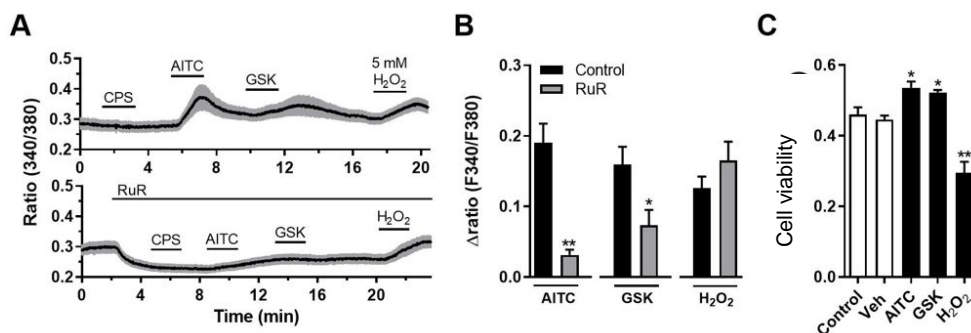
7 週齢雄性 Wistar ラットの上顎右側第一臼歯と同側切歯間に Ni-Ti コイルスプリングを装着し 50 gf の矯正力を付与した実験群と矯正力を加えていない sham 群を用意した。コイル装着から 1 日目に TRPV4 拮抗薬 RN-1734 を腹腔内または歯根膜腔内に投与し、30 分後に疼痛関連行動の指標とされているラビング時間およびワイピング回数を 10 分間測定した。その結果、歯の移動に伴い増加した疼痛関連行動が、TRPV4 拮抗薬 RN-1734 の投与により有意に抑制された。(右図: A ラビング、B ワイピング; *, **, P<0.05, 0.01)



上顎骨組織切片を作製して歯根膜における TRPV4 の発現を蛍光免疫染色で確認したところ、歯根膜線維芽細胞全体と PGP9.5 陽性神経線維に陽性像を認めた(図示なし)。次に上顎臼歯歯根膜内に逆行性トレーサーの FG を注入し、3 - 4 日後に三叉神経節を摘出した。FG 陽性の半数以上のニューロンが TRPV4 抗体に陽性を示し、TRPV1 抗体に陽性であったニューロンは少数であった(右図参照: A 染色像、B 細胞直径分布)。



In vitro において HPdLF への新規の圧刺激実験系を開発した(図示なし)。この方法は容易に細胞に圧刺激を与えることができ、一度に多くのサンプルを回収することができる。圧刺激により ATP 放出が引き起こされることを確認したが、TRPV4 拮抗薬 RN-1734 によって何ら影響を受けなかった。HPdLF にカルシウムイオン蛍光指示薬 fura2 を導入し、TRPV4 作動薬 GSK 1016790A を作用させたところ、TRPA1 作動薬 AITC と同じく細胞内カルシウム反応が観察された(下図 A, B)。これは HPdLF において TRPV4 が細胞膜上で機能していることを示している。さらに、細胞生存率について検討したところ、GSK 1016790A と AITC とともに値が有意に上昇していた。酸化ストレス H₂O₂ では細胞生存率は低下するため、TRPV4 と TRPA1 は HPdLF の機械受容というよりは細胞増殖を促進する方に機能しているのかもしれない。(下図 C: *, **, P<0.05, 0.01)



これらのことより、歯科矯正時の疼痛には、歯根膜中の TRPV4 発現神経終末が直接的に機械刺激を受けて発症することが示唆された。研究当初の予想とは異なり、TRPV4 の神経系機構の方が末梢の歯根膜機構よりも優位に働いている可能性がある。歯科矯正時の痛みは患者に苦痛を与える負の要素である。日々患者と向き合っている中で、この痛みをなんとか除去できないかと思うことは多い。本研究により、TRPV4 という機械受容イオンチャンネルが歯の移動時に引き起こされる痛みに関与することを動物実験にて明らかにした。将来的に、この TRPV4 を標的とした製薬に発展すれば、歯科矯正患者の治療時の痛みを軽減できるかもしれない。本研究では歯根膜線維芽細胞に発現している TRPV4 の機能を十分に明らかにすることができていないので、今後の課題としたい。

< 引用文献 >

Aoi Morii, Yuichi Miyamura, Misa I. Sago, Masahiro Mizuhara, Takemi Shikayama, Mako Naniwa, Suzuro Hitomi, Izumi Ujihara, Kayoko N. Kuroishi, Kaori K. Gunjigake, Momotoshi Shiga, Yasuhiro Morimoto, Tatsuo Kawamoto, Kentaro Ono: Orthodontic force-induced oxidative stress in the periodontal tissue and dental pulp elicits nociception via activation/sensitization of TRPA1 on nociceptive fibers, Free Radical Biology and Medicine, Volume 147, 1 February 2020, Pages 175-186、(査読有) IF 5.657

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森井 葵、宮村侑一、左合-伊藤美紗、浪花真子、人見涼露、郡司掛香織、黒石加代子、川元龍夫、小野堅太郎
2. 発表標題 歯科矯正力により歯根膜と歯髄で生じる酸化ストレスは侵害受容性神経線維上のTRPA1の活性化または機械感受性感作を介して疼痛を誘発する
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Horie, S., Nakatomi, C., Hsu, C. C., Naniwa, M., Morii, A., Kawamoto, T. and Ono, K.
2. 発表標題 Mechanically-activated PIEZO channels exert extracellular ATP release from human periodontal ligament fibroblasts.
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference in Fukuoka ((国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江成和、森井葵、中富千尋、小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 ヒト歯根膜線維芽細胞におけるPIEZ01の機能発現
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 堀江成和、森井葵、中富千尋、小野堅太郎、川元龍夫
2. 発表標題 歯科矯正力による歯根膜の圧受容に機械受容分子PIEZ0チャネルが関与する
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堀江成和, 森井葵, 徐嘉鍵, 中富千尋, 小野堅太郎, 川元龍夫
2. 発表標題 歯科矯正力の歯根膜圧受容に機械受容分子PIEZOチャネルが関与する
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

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