

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659916

研究課題名(和文)酸感受性イオンチャネルをターゲットとした歯の移動時の疼痛制御への画期的アプローチ

研究課題名(英文)Epochal approach triggered to acid-sensitive ion-channel to regulate pain during tooth movement

研究代表者

須田 直人(Suda, Naoto)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90302885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯の移動に伴って誘発される侵害受容機構や口腔内の組織変性が定量可能な実験モデルを、ラットの歯を移動し刺激用電極を用いて開口反射を評価することにより構築した。

このモデルにおいて歯の移動後に起こった歯の移動測の開口反射閾値の低下は、数日間継続し、7日後には非移動測と同程度になった。一方、圧迫測における破骨細胞による歯槽骨吸収は、移動開始数日後より活発になり移動距離も増加した。これらの変化は、矯正歯科における歯の移動に伴う症状や所見と近似していた。このように本動物モデルは、臨床的な歯の移動に伴う疼痛を再現し、発痛メカニズムの解明や分子制御を考える上で有用な評価系と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Morphological and physiological alterations evoked by orthodontic force was examined in this study. Under general anaesthesia with isoflurane, rats were applied to orthodontic brace and Ti-Ni coil spring between right maxillary first molar and bilateral incisors to load the continuous orthodontic force. After applying orthodontic brace, pairs of electromyographic electrodes were implanted into bilateral anterior digastric muscles to evaluate jaw-opening reflex (JOR) excitability. The expression of activated satellite glial cells (SGC) in the trigeminal ganglion (TRG) were identified. At Day 1, the expression of activated SGC was observed in right side TRG, and then expanded to bilateral TRG at Days 3 and 7. Loading of the continuous orthodontic force induced the medial movement of the first molar, which was increased with the progression of postoperative days. Interestingly, moving distance of the first molar was negatively related with JOR threshold alteration.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：矯正歯科治療 疼痛 実験モデル 歯の移動

## 1. 研究の背景

顎顔面における痛覚を含む感覚神経は、多くが三叉神経の感覚ニューロンの支配であり、その刺激は三叉神経脊髄路核で二次ニューロンに投射し、視床を経て大脳皮質で認識される。このうち痛覚刺激は、尾側で二次ニューロンを介して伝えられる。

これまで、歯の移動に伴う疼痛の緩和や軽減には、柔らかいバイトプレートを咬合させたり、レーザーやパルス照射などが行われてきたものの、十分な効果は得られていない。また、非ステロイド系抗炎症薬の投与も行われてきたが、作用時間が短いことや、小児のライ症候群のリスクから躊躇されることも多かった。ところで、炎症性骨破壊、関節炎、腫瘍の骨転移などに伴う骨吸収病変で骨痛が大きな問題となっている。このような骨吸収病変の病巣は著しい酸性環境下にある。そして神経細胞の細胞膜上の Transient receptor potential vanilloid receptor1 (TRPV1)、Acid-sensing ion channels (ASICs)などの酸感受性受容体が発現され、骨痛の発症メカニズムに関与することが知られている。

歯の移動と上記のような骨病変は同じではないが、酸性環境下で短期間に急速な骨吸収が進行する点では共通点も多い。歯の移動に伴う発痛制御では、速やかな歯の移動を阻害しないことが重要となる。このため創薬ターゲットとして、非ステロイド系抗炎症薬ではなく、疼痛の消退や緩和に対して選択性が高く、骨吸収を抑制しないことが求められる。

## 2. 目的

現在、TRPV1 や ASICs などの酸感受性受容体に対する阻害剤やチャンネルブロッカーが次々に開発されている。そこで本研究では、

これらのブロッカーが、動物実験において発痛を抑制するか、歯の移動モデルや *in vitro* において破骨細胞の出現や骨吸収を抑制しないかを明らかにする。

## 3. 研究方法

(1) 10 - 11 週齢の Wister 系雄性ラットの上顎右側切歯と右側第一臼歯 (M1) 間に 50g のコイルスプリングを装着し、矯正力を付与した。装着 1、3、7 日後に全身麻酔下で電気刺激用麻酔を上顎右側第一臼歯 (M1) 付近に留置し、同部の刺激誘発開口反射の閾値を経日的に測定した。

(2) 実験終了後、組織切片を作製し、TRAP (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ) 染色と Glial fibrillary acidic protein (グリア細胞線維性酸性タンパク質: GFAP) 染色により、多核の破骨細胞とサテライトグリア細胞を各々同定した。

(3) 歯の移動距離は、シリコーン印象後に上顎模型を作製し、2/100 mm まで計測可能なキャリパーで計測した。

(4) マウスの骨髄細胞培養系に、M-CSF と RANKL を添加して、*in vitro* において破骨細胞の分化を誘導した。

(5) 上記 (4) において *in vitro* で誘導された成熟破骨細胞の機能発現として、アクチンリング形成を検討した。

## 4. 研究成果

(1) 移動側の開口反射誘発閾値は、非移動側に比較して装着 1 - 3 日後に有意に低下

し、装着7日に両側ほぼ同程度となった。

(2) 上顎右側第一臼歯 (M1) の近心移動量は、装着1日後:  $0.12 \pm 0.14$  mm、装着3日後:  $0.19 \pm 0.05$  mm、装着7日後:  $0.42 \pm 0.02$  mm と増加し、装着3日以降に大きな移動量があった。

(3) TRAP (酒石酸抵抗性酸フォスファターゼ) 染色に陽性な多核の破骨細胞は、装着1日後にはほとんど観察されず、その数は装着3日以降に増加した。

(4) 移動側でみられた歯の移動初期の開口反射の低下は、同側の三叉神経節におけるGFAP活性を伴っていた。

以上のように、歯の移動後に起こった歯の移動測の開口反射閾値の低下は数日間継続し、7日後には非移動測と同程度になった。一方、圧迫測における破骨細胞による歯槽骨吸収は、移動開始数日後より活発になり移動距離も増加した。これらの変化は、矯正歯科における歯の移動に伴う症状や所見と近似していた。

このように本動物モデルは、臨床的な歯の移動に伴う疼痛を再現し、発痛メカニズムの解明や分子制御を考える上で有用な評価系と考えられる。

(5) 破骨細胞の分化過程において、TRPV1チャンネルの選択的アゴニスト・選択的アンタゴニストをRANKLと同時に3日間添加した。その結果、in vitro で多核の成熟破骨細胞の形成に影響はなかった。

(6) 形成された成熟破骨細胞に、TRPV1チ

ャネルの選択的アゴニスト・選択的アンタゴニストをRANKLと同時にin vitroで24時間添加した。その結果、アクチンリングに大きな変化はなかった。

以上のように、introにおける破骨細胞形成と、成熟破骨細胞の機能発現に対して、TRPV1チャンネルの選択的アゴニスト・選択的アンタゴニストの添加は影響がなかった。このことから、少なくともRANKLで形成されたマウスの破骨細胞の分化形成には、TRPV1チャンネルは関与しない可能性がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計15件)

須田直人. 先天性疾患や遺伝性疾患の早期発見における歯科医の役割. 日歯医師会誌 66, 340-347, 2013.

富塚慶徳, 梅崎栄作, 松井成幸, 駒澤大悟, 須田直人. アンカースクリューを利用した下顎歯列の遠心移動のデジタル画像相関解析. 日本機械学会講演論文集, 130-131, 2013.

成田亜希子, 大塚雄一郎, 久保迪, 遠藤則和, 佐々木会, 龍田恒靖, 重松久夫, 松井成幸, 嶋田淳, 坂下英明, 須田直人. 明海大学病院矯正歯科における過去10年間の顎変形症に関する統計的検討. 日本顎変形症学会雑誌, 23:181-190, 2013.

Suda N, Moriyama K, Ganburged G. Dental and maxillofacial characteristics. Infect Immun, 81:182-188, 2013.

Okamura E, Suda N, Baba Y, Fukuoka H, Ogawa T, Ohkuma M, Ahiko N, Yasue A, Shiga M, Moriyama K. Dental and maxillofacial characteristics of six

Japanese individuals with ectrodactyly-ectodermal dysplasia-clefting syndrome. *Cleft Palate Craniofac J* 50:192-200, 2013.

土井孝資、山田亨、佐々木会、坂東康彦、崎山浩司、鐘ヶ江晴秀、須田直人、天野修. マウスメッセル軟骨の発生過程におけるアポトーシスの役割, *明海歯学* 42, 75-86, 2013.

永山英恵, 吉川正芳, 吉川紀之, 平池正人, 藤田昌樹, 江川里沙, 西野広人, 鐘ヶ江晴秀, 須田直人. 明海大学病院矯正歯科における過去 10 年間の来院患者の統計調査. *Orthodontic Wave* 72, 2013.

Tomizuka Y, Umezaki E, Matsui S, Komazawa D, Suda N. Evaluation of effect of cross-sectional shape of orthodontic wires on molar movement using digital image correlation. *Journal of JSEM*, 13, 222-227.

松本美樹, 真野樹子, 中谷地舞, 三條恵介, 藤本舞, 時岡一幸, 中岡貴志, 鐘ヶ江晴秀, 須田直人. 術前顎矯正後に歯肉骨膜形成術と口唇形成術及び Furlow 変法による口蓋形成術を施行した片側性唇顎口蓋裂 5 例の顎態と歯列に関する短期的評価. *日本口蓋裂学会雑誌* .38 : 277-284, 2013.

Yamada T, Sasaki A, Band Y, Sakiyama K, Suda N, Kanegae H, Amano O. Immunolocalization of heat shock protein 25 (Hsp25) in developing secondary palate of mouse embryos. *Ped Oral Maxillof Sur*, 24; 27-37, 2014.

藤田昌樹、大塚雄一郎、西野広人、遠藤則和、三條恵介、藤本 舞、吉川秀明、

龍田恒康、松井成幸、嶋田 淳、須田直人. 顔面非対称症例に対する Short Lingual Osteotomy を用いた SSRO と IVRO の術後成績. *明海歯学誌* 43, 140-147, 2014

Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T. Establishment of a novel model of chondrogenesis using murine embryonic stem cells carrying fibrodysplasia ossificans progressive associated mutant ALK2. *Biochem Biophys Res Commun*. 12; 455:347-52, 2014.

Matsui S, Umezaki E, Komazawa D, Otsuka Y, Suda N. Evaluation of mechanical properties of esthetic brackets. *J Dent Biomech*. 2015.

Nakayachi M, Ito J, Hayashida C, Ohyama Y, Kakino A, Okayasu M, Sato T, Ogasawara T, Kaneda T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 abrogation causes resistance to inflammatory bone destruction in mice, despite promoting osteoclastogenesis in the steady state. *Bone*. 75:170-182, 2015.

Kanai Y, Umezaki E, Matsui S, Komazawa D. Suda N. Digital image correlation analysis of distal movement of mandibular teeth using anchor screws. *Journal of JSEM* 14, s272-s278, 2014.

[学会発表] (計 10 件)

Suda N, Mano M. Toward the minimum orthodontic intervention in CLP patients. The eighth World Cleft Congress of the International Cleft Lip and Palate Foundation, Hanoi, Vietnam, Nov, 2013.

三條恵介, 大塚雄一郎, 田草川徹, 嶋田淳, 須田直人. ICP Algorithm 法を用いた顎顔面頭蓋と上顎歯列模型の画像統合精度について. 第 23 回日本顎変形症学会総会・学術大会, 大阪.

Nakayachi, Ito J, Okayasu M, Hayashida Y, Sato T, Suda N, Sawamura T, Hakeda Y. Lectin-like Oxidized Low-density of Lipoprotein Receptor-1 Is Involved in RANKL-production Elevated by LPS-injection on Mouse Calvaria and thereby Contributes to Inflammatory Bone Destruction. ASBMR Annual Meeting . Baltimore, USA, October, 2013.

Otsuka Y, Egawa H, Fujita M, Sanjo K, Shimada J, Suda N. Postoperative Evaluation of Short Lingual and Obwegeser-Dal Pont Osteotomies in SSRO for Mandibular Excess Cases. The 52nd Congress of the Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. Gwangju, Korea. Oct, 2013.

Otsuka Y, Sanjo K, Suda N. Interdisciplinary treatment of a case with incontinentia pigmenti. 90th Congress of the European orthodontic

Society. Warsaw, Poland, June 2014.

Sanjo K, Otsuka Y, Suda N. Integration of craniofacial CT image and digital image of dental model using optimum CT value and ICP algorithm. 90th Congress of the European orthodontic Society. Warsaw, Poland, June 2014.

Fujimoto M, Ohte S, Shin M, Yoneyama K, Osawa K, Miyamoto A, Tsukamoto S, Mizuta T, Kokabu S, Machiya A, Okuda A, Suda N, Katagiri T. Establishment of a novel model for chondrogenic differentiation using murine embryonic stem cells carrying mutant ALK2 . FASEB Skeletal Muscle Satellite and Stem Cells. July 2014 .

須田直人. 先天性多数歯欠損患者での残存歯の形態. サテライトシンポジウム 5 「藤田恒太郎原著「歯の解剖学」の未解決問題を考える～歯と顎の形態進化に着目して～」, 第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 25 日, 福岡.

須田直人. 遺伝性疾患における歯根の異常. サテライトシンポジウム 8 「歯根と歯周組織発生の分子機構解明の新たな展開と歯科疾患へのアプローチ」第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 25 日, 福岡.

須田直人. ダウン症候群 - 歯科的ケアについて. 第 5 回遺伝カウンセリング学会アドバンスセミナー, 2014 年 1 月.

[図書] (計 1 件)

須田直人. 新・歯科衛生士教育マニュアル 歯科矯正学. クインテセンス出版 2014 年 1 月.

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

須田 直人 (SUDA, Naoto)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：90302885

### (2) 研究分担者

友村 明人 (TOMOMURA, Akito)

明海大学・歯学部・教授

研究者番号：60188810

安達 一典 (ADACHI, Kazunori)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：20349963

### ( 3 ) 研究協力者

長谷川 直哉 (Hasegawa, Naoya)