

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25862027

研究課題名(和文) 矯正力による知覚過敏発生のメカニズム解明

研究課題名(英文) Investigation of Hyperalgesia caused by 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯科矯正治療中に経験的に知られている痛みの中でも、何もしなくても感じる痛みではなく、咬んだときにのみ感じる痛み(咬合痛)の発生機序について調査した。痛みは細胞のエネルギー通貨として良く知られているATPが伝達することが分かっているため、ATPに着目して調査した。

研究の結果、ラットの抜歯後に痛みを受容する三叉神経節内で、ATPが離れた部位へ情報を伝達し、痛みを増強させている可能性が示唆された。歯の痛みの伝達にもATPが関与している可能性が示唆された。これらの結果は矯正中に患者が感じる「痛み」の発生機序を明らかにし、痛みを克服する一助となると期待される。

研究成果の概要(英文)：Of the different kinds of pain that are empirically known during orthodontic treatment, there is the kind of pain which is felt only when chewing (occlusal pain), which is not the kind of pain that is felt without doing anything. In this study, we investigated the pathogenesis of occlusal pain. As we knew that pain was transmitted by ATP which was well known as the currency of cellular energy, we carried out our investigation by focusing on ATP. The results of our study suggested the possibility that within the trigeminal ganglion that had received the pain after the tooth extraction of the rats, ATP transmitted information to the separated site and increased the pain. They suggested the possibility that ATP was involved in the transmission of tooth pain as well.

By revealing the pathogenesis of "pain" that the patient feels during orthodontic treatment, these results can be expected to contribute to our efforts to overcome pain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯科矯正学 三叉神経節 ATP VNUT

## 1. 研究開始当初の背景

歯科矯正治療中には、多くの患者が歯の自発痛と咬合痛を訴える。自発痛が起こる原因は、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考えられる。自発痛は歯に矯正力を加えた直後から 48 時間後に強く感じ、その後減少するのに対して、矯正治療中の咬合痛は、自発痛より長い期間持続して生じるので、炎症が原因とは考えがたい。咬合痛は矯正力を加えていない正常状態下では起こらないため、この痛みは異痛症（アロディニア）または痛覚過敏といった知覚過敏であると言える。しかし、矯正的歯の移動中の咬合痛については殆ど研究されていない。

口腔顔面領域の知覚は三叉神経によって伝達され、三叉神経節はニューロンと 2 種類のグリア細胞（シュワン細胞とサテライト細胞）で構成されている。サテライト細胞はニューロンの周囲を薄く鞘状に取り囲み、ニューロン間を隔たっている細胞である（図 1）。

研究代表者はこれまで、口腔領域の末梢神経が損傷した後の三叉神経節内の細胞間コミュニケーションについて興味を持ち研究を進めてきた。末梢刺激としてラットの臼歯を抜歯後に、三叉神経節内の抜歯部位に対応するニューロンだけでなく、その周囲のニューロンでも神経ペプチドの発現が連動して変化し、抜歯部位に対応する三叉神経節内領域でも、そこから離れた領域でもニューロンの周囲に隣接するサテライト細胞が活性化していた。これら得られた知見から、離れた部位のニューロン間の情報伝達にはサテライト細胞が関与しているのではないかと考え注目してきた。さらに実験的歯の移動時にニューロンとサテライト細胞内で NGF が協調的に発現変化したことから、ニューロンとサテライト細胞間で伝達物質を介したコミュニケーションがあると考えられる。

サテライト細胞について近年研究が急速に進み、ニューロン周囲の微小環境コントロールや、シナプス伝達調整などの役割を持つことがわかっている。過去の報告で、知覚過敏を実験的に誘導したとき、知覚神経節のサテライト細胞が活性化していたことから、知覚過敏はサテライト細胞が関与する機構によって起こることが示唆されたが、詳細は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

上記の背景から、矯正治療中の咬合痛の原因は、歯の移動による三叉神経節ニューロンへの侵害刺激がサテライト細胞へ伝わり、サテライト細胞が活性化して、咬合力に対して知覚過敏が起こることであると仮説を立て、以下の項目を調べることを目的とした。

- (1) 咬合痛発症とサテライト細胞活性化の関系の検討
- (2) 実験的歯の移動によるニューロンへの影響と、ニューロンからサテライト細胞への侵害情報伝達経路の検索
- (3) ニューロン - サテライト細胞間の侵害情報伝達経路遮断による、疼痛コントロールの可能性の検討

## 3. 研究の方法

### (1) 動物

6週齢のオスSDラットの上顎臼歯を麻酔下で抜歯し、その後経時的に安楽死させ、三叉神経節を採取した。後固定の後、急速に凍結させ、厚さ 6 μm の凍結切片を作製した。また、抜歯した歯の歯髄を採取した。

### (2) 象牙芽細胞様細胞の培養

象牙芽細胞様細胞 NK-3 を用い、43 45 分間の熱刺激を行った。

### (3) 免疫染色

用いた抗体は以下の通り。

- ・ウサギ抗 VNUT 抗体...小胞型ヌクレオチドトランスポーター
- ・マウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) 抗体...活性化したサテライト細胞のマーカー
- ・モルモット抗 glutamine synthetase (GS) 抗体...サテライト細胞のマーカー
- ・ウサギ抗 ATF3 抗体...傷害を受けた細胞のマーカー
- ・モルモット抗 P2X3 レセプター抗体...ATP レセプター
- ・マウス抗 Nestin 抗体...象牙芽細胞のマーカー
- ・ウサギ抗 SNAP25 抗体...膜融合関連タンパク

### (4) in situ hybridization 法

VNUT mRNA の発現を確認するために、in situ hybridization 法を行った。

### (5) RT-PCR 法

ラット臼歯歯髄細胞と象牙芽細胞様細胞 NK-3 について、VNUT、Heat shock protein (HSP) 25、GAPDH mRNA の発現を RT-PCR 法で分析を行った。

### (6) si-RNA

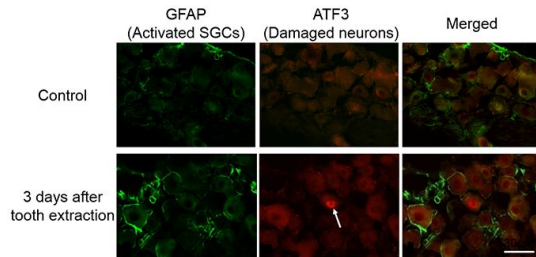
VNUT-siRNA を実験前に 24 時間作用させ、VNUT 遺伝子の発現を抑制した影響を調べた。

### (7) ATP 放出量の計測

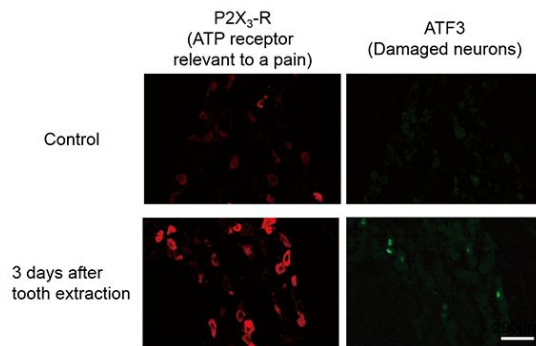
象牙芽細胞からのATPの放出をルシフェラーゼによるATP計測法を用いて調べた。

#### 4. 研究成果

(1)末梢神経の傷害後、三叉神経節内の傷害を受けたニューロン(ATF-3陽性細胞)の周囲だけでなく、傷害を受けていないニューロン周囲のサテライト細胞も活性化した。

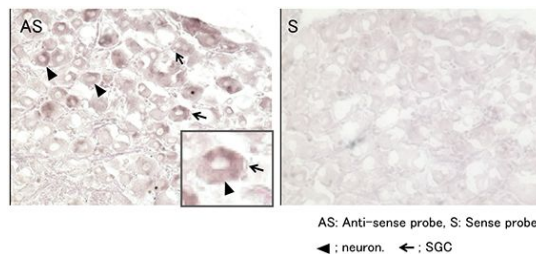


(2)抜歯後、疼痛伝達物質ATPのレセプターであるP2X<sub>3</sub>レセプターの発現がATF3陽性ニューロンだけでなく、陰性のニューロンでも認められたことから、サテライト細胞間の情報伝達にはATPが関与している可能性が示唆された。

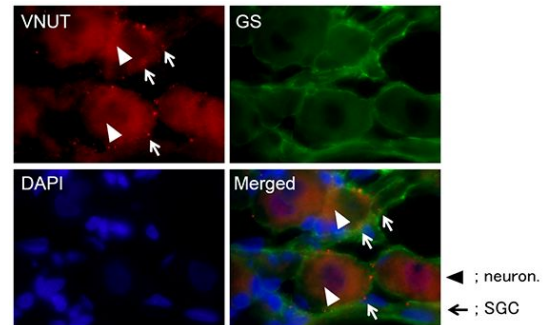


(3)三叉神経節ニューロン細胞とサテライト細胞に、小胞型ヌクレオチドトランスポーターであるVNUT mRNAとタンパクの発現が認められた。

#### In situ hybridization



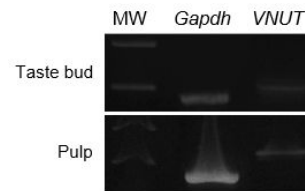
#### 免疫染色



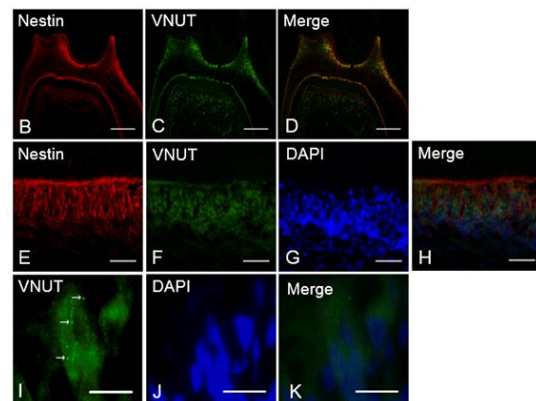
(1)~(3)の所見から、末梢神経傷害によってニューロンへの刺激が伝達され、その周囲のサテライト細胞が活性化してATPがVNUTより開口放出されることによって、傷害を受けたニューロンから傷害を受けていないニューロンへ情報が伝達されることが示唆された。

(4)象牙芽細胞にVNUT mRNAとタンパクの発現が認められ、VNUTと膜融合タンパクであるSNAP25は共発現していた。

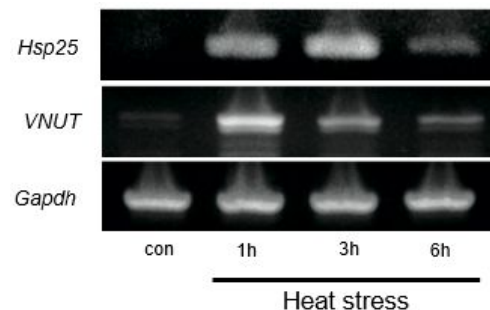
#### RT-PCR

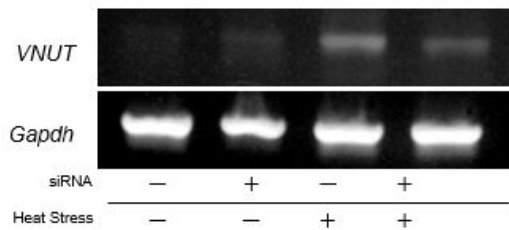


#### 免疫染色

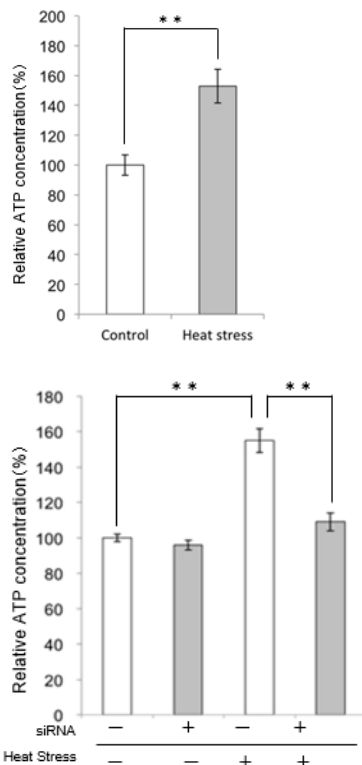


(5)in vitroで象牙芽細胞様細胞に熱刺激を与えると、VNUT mRNAの発現は増加し、その発現はVNUT siRNAによって抑制された。





(6) 象牙芽細胞様細胞へ熱刺激を与えたとき、細胞外 ATP 量が増加し、その量は VNUT siRNA によって抑制された。



(4)~(7)の所見から、痛み刺激によって、象牙芽細胞に存在する ATP が VNUT を介して小胞に取り込まれた後、SNAP25 によって象牙芽細胞より歯髄中へ放出され、歯髄神経線維に存在する ATP レセプターに結合し、痛みを伝達していることが示唆された。

## 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 2 件)

- (1) Goto T., Oh S. B., Takeda M., Shinoda M., Sato T., Gunjikake K. K., Iwata K. Recent advances in the basic research on trigeminal ganglion. The Journal of Physiological Sciences. in press 2016. 査読有, DOI 10.1007
- (2) Ikeda E., Goto T., Gunjigake K.,

Kuroishi K., Ueda M., Kataoka S., Toyono T., Nakatomi M., Seta Y., Kitamura C., Nishihara T and Kawamoto T. Expression of vesicular nucleotide transporter in rat odontoblasts. Acta Histochemica et Cytochemica. 49:21-28, 2016 査読有 DOI 10.1267

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) Ikeda E. The expression of VNUT in rat odontoblasts. Interdisciplinary Medical, Dental and Soft-material Researches on the move-Showcase Review at Kitakyushu. 2016年1月22-23日, 北九州国際会議場(北九州市)
- (2) Gunjigake K.K. Vesicular Nucleotide Transporter (VNUT) in Trigeminal Ganglion. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2015年3月21-23日, 神戸国際会議場(神戸市)
- (3) 池田恵理奈, ラット象牙芽細胞における小胞性ヌクレオチドトランスポーターの発現と機能について, 第51回日本口腔組織培養学会2014年11月15日, 九州歯科大学講堂(北九州市)
- (4) 郡司掛香織, ラット三叉神経節細胞における VNUT の発現について, 第73回日本矯正歯科学会大会, 2014年10月20~22日, 幕張メッセ(千葉市)
- (5) 池田恵理奈, ラット象牙芽細胞での疼痛伝達における小胞性ヌクレオチドトランスポーターの役割について, 第73回日本矯正歯科学会大会, 2014年10月20~22日, 幕張メッセ(千葉市)
- (6) 郡司掛香織, 三叉神経節における VNUT の発見, 第73回九州歯科学会総会学術大会, 2013年5月18~19日, 九州歯科大学講堂(北九州市)

## 6. 研究組織

(1)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