

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名	大倉麻里子
学位	博士(歯学)
学位記番号	新大院博(歯)第348号
学位授与の日付	平成28年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
博士論文名	Immunohistochemical and gene expression analysis of Prostaglandin I <sub>2</sub> synthase IP receptor and TRPV1 following orthodontic force application in rat molars (矯正力を付与されたラット臼歯における Prostaglandin I <sub>2</sub> 合成酵素、IP 受容体および TRPV1 の発現の変動：免疫組織化学的検索および遺伝子発現解析)
論文審査委員	主査 教授 齋藤 功 副査 教授 大島勇人 副査 准教授 吉羽邦彦

### 博士論文の要旨

#### 【背景と目的】

矯正歯の移動に伴い多岐にわたる歯髄反応が生じるとされている。すなわち、象牙芽細胞の空胞変性やアポトーシス、浮腫、細胞増殖、血管新生、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性の上昇、および神経ペプチド・炎症性サイトカインの産生などが報告されている。一方、矯正臨床においては、患者の多くが矯正治療期間中一時的に疼痛を訴える。この疼痛は主に歯根膜で生じる虚血や炎症などの病理学的変化に起因するが、これに加え神経ペプチドの放出や神経原性炎症などの歯髄変化も疼痛に関与すると考えられている。

PGI<sub>2</sub> は歯髄における主要なアラキドン酸代謝産物で、炎症や疼痛に関与する代表的生理活性物質の1つと考えられている。また、PGI<sub>2</sub> は特異的受容体である IP 受容体と結合したのち、transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)の感作を介して末梢痛覚受容に関与することが報告されている。さらに、Prostaglandin I<sub>2</sub> 合成酵素 (PGIS)は歯髄組織において象牙芽細胞や線維芽細胞で発現しており、急性炎症時に PGI<sub>2</sub> 産生が亢進することも確認されている。以上のことから、PGI<sub>2</sub> は歯髄組織において炎症の調節や疼痛の認識に対して重要な役割を演じていると思われる。

そこで本研究では、矯正歯の移動によって歯髄内で PGIS の作用により PGI<sub>2</sub> が産生され、これが IP 受容体と結合し TRPV1 の感作を引き起こすという一連の反応が歯髄組織で誘起されるとの仮説のもと、その検証を目的として、ラット臼歯歯髄における PGIS, IP 受容体および TRPV1 のタンパク局在、および PGIS、PTGIR (IP 受容体遺伝子)、TRPV1 mRNA 発現に対する矯正力付与の影響を解析した。

#### 【方法】

8 週齢 Wistar 系雄性ラット(n=10)を使用し、Waldo 法に準じて上顎右側第一、第二臼歯間にエラスティック片を挿入し、実験的な歯の移動を 24 時間行った。反対側同名歯を未処置歯として使用した。

組織学的解析として、灌流固定後、被験歯および未処置歯を上顎骨ごと摘出し 4 週間脱灰後、厚さ 4 μm のパラフィン切片を作製し、H-E 染色と免疫組織化学的解析を行った(n=5)。第一臼

歯および第二臼歯歯冠歯髄に着目し、PGIS 局在については酵素抗体法を、IP 受容体と TRPV1 の局在解析は、neurofilament(神経マーカー)および nestin(象牙芽細胞マーカー)抗体を併用した免疫蛍光二重染色法を行った。

遺伝子発現解析では、矯正力付与 24 時間後に第一および第二臼歯を摘出後(n=5)、mRNA 抽出と cDNA 作製を行ったのち、PGIS、IP、および TRPV1 mRNA の発現変化をリアルタイム PCR 法で解析した。

#### 【結果および考察】

正常歯髄の象牙芽細胞で PGIS の弱い陽性反応を認めた一方で、被験歯髄ではより強い陽性反応を認めた。さらに、被験歯髄では線維芽細胞の一部にも陽性反応を認めた。PGIS mRNA 発現量解析では、被験歯髄は正常歯髄と比較し有意に高値を示した。以上の結果から、矯正力の刺激による歯髄での PGIS 発現亢進に伴う PGI<sub>2</sub> 産生亢進が、矯正力の刺激による歯髄組織の病態生理学的変化の誘発に関与することが示唆された。

IP 受容体および TRPV1 は、正常歯髄と被験歯髄において neurofilament 陽性神経線維の一部、および nestin 陽性象牙芽細胞に発現を認めた。PTGIR mRNA および TRPV1 mRNA は正常歯髄と比較し被験歯髄において有意に高値を示した。

PGI<sub>2</sub> は感覚神経線維の IP 受容体と結合後、TRPV1 を感作し疼痛伝達に関与することから、矯正力の刺激による疼痛にこの種の経路が関与することが示唆された。また、シクロオキシゲナーゼ阻害薬による象牙質石灰化度の低下や矯正力による象牙質石灰化の亢進が報告されていることから、矯正力付与後の PGIS と IP 受容体の mRNA 発現上昇が石灰化亢進に関与することが推定された。さらに、象牙芽細胞が TRPV1 を介して象牙質の感覚受容を司る可能性が指摘されており、この種の機序が矯正力付与後の痛覚感受性亢進に関与することが示唆された。

#### 【結論】

ラット臼歯歯髄においては、IP 受容体が TRPV1 陽性神経と象牙芽細胞に共発現することが明らかとなった。PGIS、PTGIR、TRPV1 mRNA 発現は矯正力付与後に有意に上昇した。これらの所見から、矯正力付与により末梢神経および象牙芽細胞が関与する歯髄変化が生じ、これに PGI<sub>2</sub> -IP -TRPV1 経路が寄与していることが示唆された。

#### 審査結果の要旨

矯正力による歯の移動は、歯に物理的的刺激が加わることで歯周組織に様々な生物学的変化が生じて引き起こされる。歯根膜あるいは歯槽骨の改造現象については、多くの実験的研究により様々な手法を駆使して明らかにされつつあるが、矯正歯の移動にともなってみられる一過性の疼痛発現メカニズムについての研究は未だ発展途上にある。これまでの研究では、疼痛はおもに歯根膜で生じる虚血や炎症などの病理学的変化によりもたらされると考えられてきたが、神経ペプチドの放出や神経原性炎症などの歯髄変化も関与していることが推測される。一方、歯髄における主要なアラキドン酸代謝産物 PGI<sub>2</sub> は炎症や疼痛に関連した代表的生理活性物質の 1 つで、特異的受容体である IP 受容体と結合し transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1) の感作を介して末梢痛覚受容に関与するとされ、急性炎症時には PGI<sub>2</sub> 産生が亢進することも確認されている。また、PGI<sub>2</sub> 合成酵素である PGIS は象牙芽細胞や歯髄内線維芽細胞で発現することが報告され、PGI<sub>2</sub> が歯髄組織における疼痛認識に重要な役割を演じている可能性が考えられている。

このような背景から、本研究では矯正歯の移動によって歯髄内において PGIS の作用により PGI<sub>2</sub> が産生され、これが IP 受容体と結合し TRPV1 の感作を引き起こすという一連の反応が歯髄

組織で誘起されるとの仮説を設定し、矯正力適用後のラット臼歯歯髄における *PGIS*, *IP* 受容体および *TRPV1* のタンパク局在、および *PGIS*、*PTGIR* (*IP* 受容体遺伝子)、*TRPV1* mRNA の発現様相の変化について解析を試みた。

実験的歯の移動は *Waldo* 法に準じ、8 週齢 *Wistar* 系雄性ラット上顎右側第一、第二臼歯間にエラスティック片を挿入して 24 時間行い、反対側同名歯を対照として利用した。灌流固定後、被験歯および未処置歯を上顎骨ごと摘出し 4 週間脱灰後、厚さ 4  $\mu$ m のパラフィン切片を作製し H-E 染色ならびに免疫組織化学的に検索し、また、*PGIS* の局在については酵素抗体法を、*IP* 受容体と *TRPV1* の局在解析については *neurofilament* と *nestin* 抗体を併用した免疫蛍光二重染色法により観察した。遺伝子発現解析は、矯正力適用 24 時間後に第一および第二臼歯を摘出し、mRNA 抽出と cDNA 作製を行った後、*PGIS*、*IP*、および *TRPV1* mRNA の発現変化をリアルタイム PCR 法で解析した。

その結果、正常歯髄の象牙芽細胞でも *PGIS* の弱い陽性反応を認めたが、矯正力を適用した被験歯髄ではより強い陽性反応が観察され、線維芽細胞の一部にも陽性反応を認めた。*PGIS* mRNA 発現量解析では、被験歯髄は正常歯髄と比較し有意に高値を示したことから、矯正力が加わった歯髄では *PGIS* 発現亢進に伴う  $\text{PGI}_2$  産生亢進が矯正力適用時における歯髄組織の病態生理学的変化の誘発に関与することが示唆された。

一方、*IP* 受容体および *TRPV1* は、正常歯髄と被験歯髄において *neurofilament* 陽性神経線維の一部と *nestin* 陽性象牙芽細胞に発現を認め、*PTGIR* mRNA および *TRPV1* mRNA は正常歯髄と比較し被験歯髄において有意に高値を示した。 $\text{PGI}_2$  は感覚神経線維の *IP* 受容体と結合後、*TRPV1* を感作し疼痛伝達に関与することから、矯正力付与にともなう疼痛にこの種の経路が関与することを示唆した。また、象牙芽細胞が *TRPV1* を介し象牙質の感覚受容を司る可能性が指摘されており、この種の機序が矯正力適用後の痛覚感受性亢進に関わると考察した。

以上のことから、ラット臼歯歯髄を用いた実験的研究により、*IP* 受容体が *TRPV1* 陽性神経と象牙芽細胞に共発現することを示すとともに、矯正力を付与することで歯髄における *PGIS*、*PTGIR*、*TRPV1* mRNA の発現が有意に上昇するという矯正装置装着後にみられる一過性の疼痛発現メカニズムを解明する上での有用な基礎的データを提供した点、および矯正力が加わった歯髄では末梢神経および象牙芽細胞が関与した変化が引き起こされ、この変化に  $\text{PGI}_2$ -*IP*-*TRPV1* 経路が寄与している可能性を示唆した点に学位論文としての価値を認める。