

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06647

研究課題名(和文) 口腔粘膜損傷により発症する機械痛覚過敏に対する免疫応答系の関与の解明

研究課題名(英文) Involvement of immune response in intra oral mechanical hypersensitivity associated with oral mucosa incisions

研究代表者

浦田 健太郎 (URATA, Kentaro)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：60754398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜損傷により機械痛覚過敏が発症する。以前代表者は頬粘膜切開による機械痛覚過敏の発症にTRPA1が関与することを明らかにした。しかし、機械刺激を受容するTRPV2やTRPA1のmRNAの発現に関与するとされるIL-6の関与は明らかでない。そこで、頬粘膜切開ラットを用いた行動実験、免疫組織化学実験を行った。実験結果として、頬粘膜切開により発症する熱および機械痛覚過敏には、頬粘膜を支配しているペプチダージックな三叉神経節(TG)ニューロンにおけるTRPV2の発現増加の関与が明らかとなった。また、頬粘膜切開部組織から放出されるIL-6量は、切開処置後1日目に有意な増加を示すことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Intra oral injury causes mechanical allodynia. We have reported that increased expression of TRPA1 are involved in mechanical allodynia following buccal mucosa incision. But, it is still not unclear the involvement of TRPV2 which accepts a mechanical stimulus and IL-6 which participates in expression of mRNA of TRPA1. So, we performed behavioral testing and immunohistochemistry using a buccal mucosa incision rat. Present findings suggest that increased expressions of TRPV2 in peptidergic TG neurons innervating incisional buccal mucosa are involved in buccal mucosal heat hypersensitivity and mechanical allodynia following the buccal mucosa incision. And, the amount of IL-6 protein released from incisional site was significantly increased on day 1 after buccal mucosa incision.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：TRPV2 TRPA1 IL-6 Pain

1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において義歯不適合による潰瘍形成や、さまざまな歯科手術による口腔粘膜の損傷による疼痛は接触痛や擦過痛または圧痛を招き、患者の苦痛となる要因であることから、この疼痛発現メカニズムの解明は重要な課題となっている。しかしながら、口腔粘膜の損傷に起因した熱痛覚過敏や機械的アロディニアの発症機構に関する報告は皮膚における研究と比較して明らかに少ない現状にある。

現在、さまざまな侵害刺激を受容するレセプターとして transient receptor potential (TRP) channel family が広く知られている。中でもカプサイシンや 43 以上の熱刺激を受容する TRP vanilloid 1 (TRPV1) (Voets et al., Cell 112: 819-829, 2003)、マスタードオイルや 15 以下の冷刺激や機械刺激を受容する TRP ankyrin 1 (TRPA1) (Story et al., Cell 112: 819-829, 2003) および 52 以上の熱刺激や機械刺激を受容する TRP vanilloid 2 (TRPV2) (Petitjean et al., Eur J Neurosci: 3189-201 2014) (Tominaga et al., J Neurobiol: 3-12 2004) が知られている。

代表者らは、これまでの実験で頬粘膜を切開したラットを用い、頬粘膜に温度刺激と機械刺激を与えた際の疼痛反応を観察したところ、熱、冷および機械痛覚過敏の発症を確認した。その際、切開部を支配する三叉神経節 (TG) 細胞中における TRPV1、TRPA1 の発現の増加を確認した。また、各痛覚過敏が発症したラットに対し切開部に TRPV1 のアンタゴニストを投与したところ熱痛覚過敏が、TRPA1 のアンタゴニストを投与したところ機械痛覚過敏と冷痛覚過敏が抑制されたことから、口腔粘膜の熱痛覚過敏の発症には TRPV1 が、冷痛覚過敏と機械痛覚過敏ではその発症に TRPA1 が関与していることを明らかにした (Urata et al., J Dent Res 446-454 2015)。

口腔粘膜損傷により、口腔内細菌の感染を伴った口内炎が発症することは容易に想像できる。近年、培養歯肉線維芽細胞に *P. gingivalis* 由来の lipopolysaccharide を投与すると、培養歯肉線維芽細胞および培養上清に interleukin - 6 (IL-6) が増加することが報告された (Morandini et al., J Periodontol 2010)。さらに、IL-6 のシグナルトランスドューサーである Glycoprotein130 (Gp130) 欠損マウスの後根神経節において、TRPA1 mRNA が有意に減少していることが分かっている (Malsch et al., J Neurosci. 2014) ことから、口腔粘膜の機械痛覚過敏に關与する TRPA1 の発現に対し、IL-6 が關与する可能性がある。また TRPV2 は機械刺激を受容するレセプターであることから口腔内の機械痛覚過敏に關与する可能性が十分に考えられる。頬粘膜損傷により発症する機械痛覚過敏の発症メカニズムを解明することにより、TRP チャネルをターゲットとした新規異常疼痛治療法の足掛かりになると考える。

2. 研究の目的

歯科臨床において、しばしば義歯不適合による口腔粘膜損傷や咬傷により口腔粘膜に接触痛 (機械的アロディニア) が発現する。しかしながら、このような口腔内の損傷に起因した機械的アロディニアの発症機構に関する研究はほとんどなく、このような痛みに対して義歯内面の削合や軟膏の塗布といった対症療法が一般的に行われているのが現状である。近年、侵害機械刺激に対する責任受容体として注目されている TRPA1 および TRPV2 に着目し、頬粘膜切開モデルラットを用いて、口腔粘膜損傷に起因した機械的アロディニアに關与する TRPA1 および TRPV2 の発現制御機構を解明し、頬粘膜損傷後の機械的アロディニアに対する積極的新規治療法の開発に向けた糸口を探ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 頬粘膜切開処置に伴う熱・冷・機械痛覚過敏発症の確認

イソフルラン(2%)吸入による浅麻酔下にてラットの層板状筋に筋電図記録用電極を刺入し、切開部に対し温熱刺激用プローブおよびデジタルフォンフライを用いて、熱・冷・機械刺激を与え spike2 を用い記録した筋電図により逃避反射閾値を計測し痛覚過敏の発症を確認する。

(2) 頬粘膜切開に伴う TG 細胞中の TRPV2 の発現変化および発現ニューロンの解析

ペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔をした 7 終齢の Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットの TG を取り出し、4%パラホルムアルデヒドにより 12 時間固定後クライオスタットにて組織切片を作成する。作成した切片において抗 TRPV2 channel および抗 IB4 抗体を用い免疫染色を行う。

(3) 頬粘膜切開処置後に発症する熱・冷・機械痛覚過敏に対する TRPV2 の関与の解析

イソフルラン(2%)吸入による浅麻酔下にてラットの層板状筋に筋電図記録用電極を刺入し、切開部に対し TRPV2 アンタゴニスト (Tranilast) 投与処置を行う。同部に温熱刺激用プローブおよびデジタルフォンフライを用いて、熱・冷・機械刺激を与え spike2 を用い記録した筋電図により逃避反射閾値を計測し TRPV2 アンタゴニストの効果を検討する。

(4) 切開部組織における IL-6 遊出量の定量解析

頬粘膜切開処置後 1 日目および 3 日目にペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔をした 7 終齢の Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットの頬粘膜切開部組織を取り出し、ELISA 法にてタンパク質定量を行い IL-6 遊出量を同定する。

4. 研究成果

(1) 頬粘膜切開処置に伴う熱・冷・機械痛覚過敏発症の確認

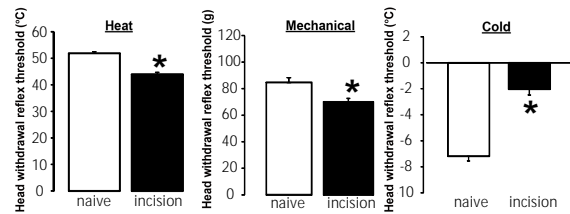


図 1 頬粘膜切開により熱・冷・機械痛覚過敏の発症を確認した。

(2) 頬粘膜切開に伴う TG 細胞中における TRPV2 の発現解析

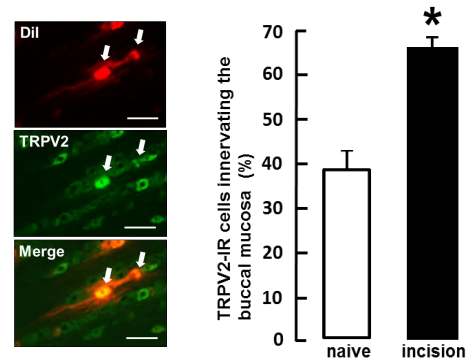


図 2 頬粘膜切開により切開部を支配している TG 細胞において TRPV2 の発現増加を認めた。

頬粘膜切開に伴う TG 細胞中における TRPV2 の発現ニューロンの解析

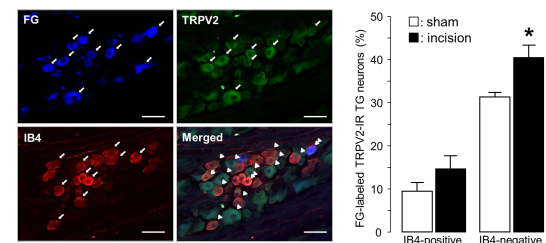


図 3 頬粘膜切開により切開部を支配している TG 細胞において TRPV2 の発現は IB4 陰性のニューロンで増加を認めた。

(3) 頬粘膜切開処置後に発症する熱・冷・機械痛覚過敏に対する TRPV2 の関与の解析

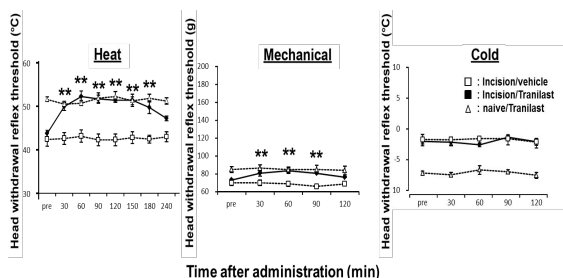


図4 TRPV2 アンタゴニストの投与により切開後の熱・冷・機械刺激に対する痛覚過敏の回復が認められた。

(4) 切開部組織における IL-6 遊出量の定量解析

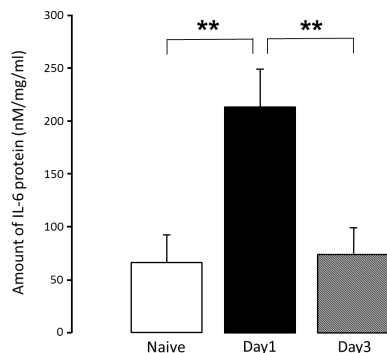


図5 頬粘膜切開により切開処置後1日目において IL-6 タンパク量の有意な増加を認められたが、3 日目では無処置ラットと比較して有意な差を認めなかった。

研究成果のまとめ

頬粘膜切開により発症する機械痛覚過敏には、これまでに代表者らが明らかにした切開部を支配している TG 細胞中の TRPA1 の発現増加の関与以外にも、本研究の結果から切開部を支配している TG 細胞中における、TRPV2 の発現増加の関与が明らかとなり、特に IB4 陰性のニューロンで TRPV2 の発現増加を認めたことからペプチダージックなニューロンにおける TRPV2 の発現増加が関与することが明らかとなった。本研究は口腔内の機械痛覚過敏の発症機構に焦点を当て

た研究であるが、付随した実験として口腔内の熱痛覚過敏と冷痛覚過敏についても実験を行ったところ頬粘膜切開処置後に発症する熱痛覚過敏にも TRPV2 が関与することが明らかとなった。また、切開処置後の創傷部から遊出される TRPA1 の発現に関与すると考えられる IL-6 タンパク量を ELISA 法により定量したところ、無処置と比較して切開処置後1日目においては IL-6 の有意な増加を認めたが、切開処置後3日目では有意な増加を認めなかった。よって切開処置後1日目のラットを用いて IL-6 と TRPA1 の共発現について免疫組織化学的に解析を試みたところ、現時点では十分な関係性を認めなかったため、創傷部より放出される炎症性ケミカルメディエーターと TRPA1 の発現変化との関連については再考が必要と考える。

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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浦田 健太郎 (URATA, Kentaro)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：

60754398

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()