

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20466

研究課題名(和文) 歯髄炎に起因した異所性異常疼痛に対する三叉神経節細胞間機能連関の分子機構解明

研究課題名(英文) The molecular mechanisms of intra-cellular interaction in the trigeminal ganglion underlying ectopic pain associated with tooth pulp inflammation

研究代表者

大原 絹代(OHARA, Kinuyo)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：10731606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：申請者のこれまでの研究により、歯髄炎が発症するとHsp70が歯髄組織に発現し、三叉神経節細胞体に軸索輸送され、歯髄を支配しているTG神経細胞体から細胞外分泌され、舌を支配しているTG神経細胞のTLR4と結合し、このTG神経細胞の興奮性を増強することを報告してきた。今回の結果から、1) 興奮性を増したTG神経細胞では、NFkB及びMAPK経路を介してTRPV1受容体合成が亢進する可能性が明らかになった。また、2) M1歯髄と舌を二重支配するTG細胞の存在も確認されており、この細胞が歯髄炎によって興奮することによっても、舌に痛覚過敏が引き起こされると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have already reported that Hsp70 is expressed in the tooth pulp and transported to the trigeminal ganglion (TG)-cell bodies, extracellularly secreted from TG-cell bodies, and binds to TLR4 of TG neurons, which causes the enhancement of the excitability of TG neurons innervating the tongue. Based on the present study, following new findings were obtained: 1) TRPV1 expression was enhanced in the activated TG neurons via intracellular NFkB and MAPK cascades. 2) Also, some TG cells innervating both M1 and tongue were activated by tooth pulp inflammation, causing persistent pain in the tongue.

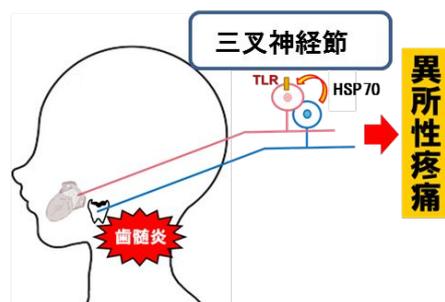
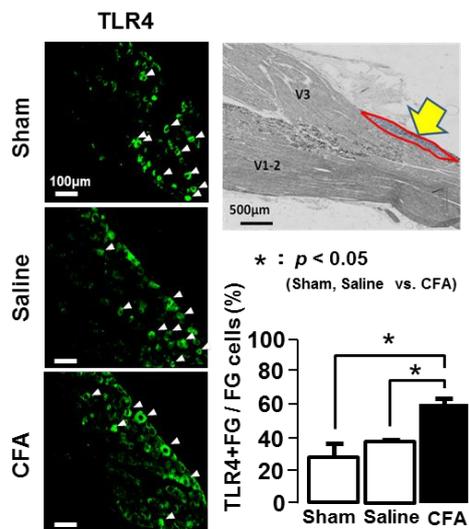
研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄炎 異所性異常疼痛 三叉神経節細胞 TLR4 NFkB MAPキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

歯髄に慢性炎症が引き起こされると、三叉神経節細胞は強く活性化され、高頻度の持続的な活動電位を誘発することが知られている。三叉神経節神経細胞におけるこのような活動性の増加は、炎症歯髄痛だけでなく顔面や舌の痛みを増強する可能性があると考えられている。このような長期間に及び三叉神経節細胞活動の増強は、さらにグリア細胞の活性化を導き、神経細胞活動をより強く増強させ、末梢神経系の感作が誘導される。しかしながら、歯髄炎に起因する口腔顔面の異所性疼痛がどのようなメカニズムで引き起こされるかについては不明な点が多く残されている。これまで、歯髄炎が引き起こされると、炎症歯髄を支配する三叉神経節細胞活動が著しく亢進することにより三叉神経節細胞に Toll-like Receptor (TLR) が発現し、舌に異所性異常疼痛が発症することを報告した(図1)。それだけでなく、申請者らは三叉神経節細胞からは HSP70 だけでなく、種々の神経ペプチドや一酸化窒素なども放出され、周辺部に存在する三叉神経節細胞の活動性を増強させることも明らかにした。

図1 歯髄炎により三叉神経節に発現したTLRと異所性疼痛異常の関係を示した模式図



このような結果から、TLR4 を介した三叉神経節細胞どうしの機能的な相互作用が異所性異常疼痛の発症に対して重要な役割を成している可能性が示された。またスタートアップ研究費によるパイロットスタディーでは、舌に引き起こされる非炎症性の痛覚異常はカプサイシン投与に対する反応性の増

強を示したことから、この異所性の痛覚異常にはトリップチャンネルの関与が考えられる。

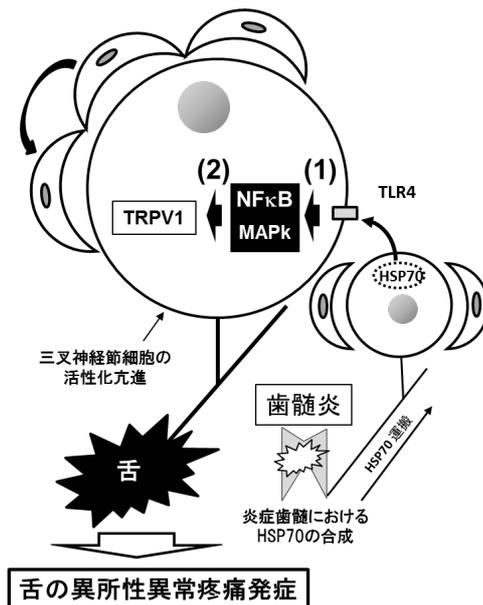
最近の報告では、TLR4 を介する情報伝達系には NFκB を介する系とマップキナーゼ (MAPk) を介する系が存在することが報告され、申請者らが解明した TLR4 を介した三叉神経節内における情報伝達に対してこれらの系が関係する可能性が強いと考えられる。

臨床では歯髄に慢性的な炎症が引き起こされると、歯髄以外の部位(顔面皮膚、顎関節、歯根膜、舌あるいは口腔粘膜)に異所性異常疼痛として症状が生じる場合があるが、口腔顔面痛を熟知していない歯科医師は、このような異常疼痛を口腔や顔面痛による疾患と誤認し、誤った治療を行ってしまうことがある。歯髄炎に起因する口腔顔面領域の異所性異常痛覚は症状が多岐にわたるため、疾患箇所以外に異所性異常疼痛という形で全く異なる部位に慢性的痛みを引き起こす。そのため、正確な審査・診断を困難にし、临床上非常に大きな問題を引き起こすことがある。歯髄炎に伴う異所性異常疼痛を解明することは、原因不明の口腔顔面痛により苦しんでいる患者に適切な治療を施し、不適切な歯科治療から患者を救うことに役立つと考えられる。

2. 研究の目的

本プロジェクトでは、歯髄炎によって誘導される異所性異常疼痛に対する三叉神経節細胞間における機能連関の分子メカニズムを明らかにする(図2)。

図2 HSP70がTLRに結合することによってNFκBおよびMAPkを介する系が活性化してTRPV1が合成される可能性を示す模式図



2014年に Journal of Neuroinflammation (Ohara et al.) で報告したモデル動物を用い、舌に引き起こされる異所性異常疼痛の発症機構を解明する。本研究プロジェクトでは、同モデルラットを用いて、図2(1)に示した経路について、形態学的および生化学的手法

を用いて、それぞれの分子の発現変化について定量解析を行い、各分子が炎症のない正常な舌を支配する三叉神経節細胞において発現増加があるかを明らかにする。さらに、これらの発現に対する TLR4 ブロックの効果についても、同様の手法を用いて定量的な解析を加え、TLR4 を介する経路が NFkB および MAPk の経路の活性化に關与するか否かを明らかにする。また、本研究では TLR4 を介する経路が実際に舌を支配する三叉神経節細胞活動の増強に關与するか否かについても電気生理学的手法を用いて解析を行い、機能面からも TLR4 を介した NFkB および MAPk の経路がニューロン活動の亢進に關与するかどうかを解明する。さらに、図 2(2) に示した TLR4 を介した NFkB および MAPk の経路が舌を支配する三叉神経節細胞において、TRPV1 合成の亢進に關与するか否かについて形態学的および生化学的に解析を行う。

以上、本プロジェクトでは TLR4 の発現から TRPV1 合成に至る一連の情報伝達経路を形態学的、生化学的および電気生理学的手法を用いて、総合的に解明することによって、歯髄炎に起因する舌の異所性異常疼痛発症に關して、三叉神経節細胞内における分子メカニズムの解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1)モデルラットの作製

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、左側下顎の第一大臼歯 (M1) 歯髄を露髄させ、デンタルペーパーポイントに起炎物質である complete Freund's adjuvant (CFA) を投与し、ガラスアイオノマーにて仮封を行った歯髄炎モデルラット作製した。

(2)行動薬理的解析

歯髄炎モデルラットの三叉神経節内に NFkB および MAPk の拮抗薬である Triptolide および SB203580 を 3 日間単回投与し、熱刺激用プローブおよび機械刺激用ホーセップスを使って舌の機械的および熱刺激に対する逃避閾値を計測した。覚醒下での舌痛覚テストは不可能なため、浅麻酔下にて行う。本教室では顎顔面領域における機械的および熱刺激に対する逃避閾値の計測に關して、浅麻酔下にて頭板状筋の EMG の変化を指標とした計測法を確立している (Honda et al., Mol Pain, 2008)。

(3)免疫組織学的解析

舌に FG を投与し、TG 細胞における TLR4 および NFkB, リン酸化 ERK、リン酸化 p38、リン酸化 JNK の発現を歯髄炎モデル群および Sham 群において免疫組織化学的に検討した。

4. 研究成果

(1) NFkB の拮抗薬 (Triptolide) および MAPk

の拮抗薬 (SB203580) 投与による行動薬理的解析

歯髄炎モデルラットの三叉神経節内に NFkB および MAPk の拮抗薬である Triptolide および SB203580 を 3 日間単回投与し、行動学的観察を行った結果、Triptolide 投与群および SB203580 投与群では、DMSO 群と比較して機械および熱刺激に対する HWT の低下が有意に抑制された。

(2) NFkB, リン酸化 ERK、リン酸化 p38、リン酸化 JNK の免疫組織学的解析

M1 歯髄炎後、舌の外側部に FG を注入により標識された TG 細胞において NFkB および TLR4 発現について解析を行った結果、歯髄炎ラットにおいて、FG で標識された TG 細胞を比較すると、歯髄炎ラット群の方が Sham ラット群よりも有意に多くの TG 細胞が TRPV1 および TRPV1 + TLR4 の陽性を示した。ゆえに、歯髄炎が発症したラットの舌を支配する TG 細胞では Sham 群に比べ歯髄炎群の方が TRPV1 の合成が亢進したと考えることができる。これは、TG 細胞に検出された TRPV1 が末梢の終末部および中枢ターミナルへと運ばれ、機能を発揮するものと推察される。おそらく、歯髄炎モデルでは、舌を支配する細径神経線維の神経終末部により多くの TRPV1 が集積して機能を発揮することによって舌に痛覚異常が引き起こされる可能性があると考えられる。

(3)総括

歯髄炎発症後、Hsp70 が歯髄組織に発現し、三叉神経節細胞体に軸索輸送され、歯髄を支配している TG 神経細胞体から細胞外分泌され、舌を支配している TG 神経細胞の TLR4 と結合し、舌を支配している TG 神経細胞の興奮性を増強する可能性が考えられている。この研究結果と今回の結果を勘案すると、興奮性を増した TG 神経細胞では、興奮性の亢進により NFkB および MAPk 経路を介して TRPV1 受容体の合成に關与している可能性が明らかになった。また、少数ではあるが、M1 歯髄および舌を二重支配する TG 細胞の存在も確認されており、この細胞が歯髄炎によって興奮性が増加すると、舌の感覚も担っていることから、舌の痛覚亢進にも直接的に關与する可能性が考えられる。

本プロジェクトでは、TLR4 を介する経路が実際に舌を支配する三叉神経節細胞活動の増強に關与するか否かについても電気生理学的手法を用いて解析を行い、機能面からも TLR4 を介した NFkB および MAPk の経路がニューロン活動の亢進に關与するかどうかを解明していく予定であったが、H28 年度内に終了させるはずの成果が思うように事が運ばず H29 年度に持ち越すこととなり実験を完全に終了することはできなかった。今後の課題として、残りの実験も引き続き行うことを検討中である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Watase T, Shimizu K, Komiya H, Ohara K, Iwata K, Ogiso B, Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 channel expression in orofacial cutaneous hypersensitivity following tooth pulp inflammation, J Oral Sci. 2018, 60(1):8-13, 査読有

Watase T, Shimizu K, Ohara K, Komiya H, Kanno K, Hatori K, Noma N, Honda K, Tsuboi Y, Katagiri A, Shinoda M, Ogiso B, Iwata K, Role of medullary astroglial glutamine synthesis in tooth pulp hypersensitivity associated with frequent masseter muscle contraction, Mol Pain, 2018, 14, DOI: 10.1177/1744806918763270, 査読有

Sugawara S, Okada S, Katagiri A, Saito H, Suzuki T, Komiya H, Kanno K, Ohara K, Iinuma T, Toyofuku A, Iwata K, Interaction between calcitonin gene-related peptide-immunoreactive neurons and satellite cells via P2Y12 R in the trigeminal ganglion is involved in neuropathic tongue pain in rats, Eur J Oral Sci. 2017, 125(6), 444-452, 査読有

Mikuzuki L, Saito H, Katagiri A, Okada S, Sugawara S, Kubo A, Ohara K, Lee J, Toyofuku A, Iwata K, Phenotypic change in trigeminal ganglion neurons associated with satellite cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is involved in lingual neuropathic pain, Eur J Neurosci, 2017, 46(6), 2190-2202, 査読有

Saito H, Katagiri A, Okada S, Mikuzuki L, Kubo A, Suzuki T, Ohara K, Lee J, Gionhaku N, Iinuma T, Bereiter DA, Iwata K, Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: A population approach, Exp Neurol. 2017, 293:124-136, 査読有

清水康平、羽鳥啓介、大原絹代、篠田雅路、小木曾文内、歯内療法における打診痛を考察する、日本歯科評論、2016、76(3)巻、47-58、査読無

〔学会発表〕(計 2 件)

古宮 宏記、清水 康平、大原 絹代、高橋 なつみ、小木曾 文内、急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構、第 146 回日本歯科保存学会春季学術大会、2017 年

古宮 宏記、清水 康平、大原 絹代、小

林 寛、會田 泰代、小木曾 文内、急性歯髄炎により誘導される歯痛錯誤の末梢神経機構、第 144 回日本歯科保存学会春季学術大会、2016 年

〔図書〕(計 1 件)

木ノ本喜史、興地隆史、大島勇人、澁川義幸、田崎雅和、村松敬、五十嵐 勝、北島佳代子、新井恭子、松浦信幸、長谷川誠実、清水康平、羽鳥啓介、大原絹代、篠田雅路、小木曾文内、泉栄之、阿部修、加藤広之、澤田則宏、佐藤暢也、岩波洋一、佐藤勸哉、北村和夫、吉川剛正、田中利典、石井宏、清水花織 編著、抜髄 Initial Treatment 治療に導くための歯髄への臨床アプローチ、ヒョーロン、2016、399(139 ~ 150)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

大原 絹代 (OHARA, Kinuyo)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号： 10731606