

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17080

研究課題名(和文) 歯髄疾患における炎症性および疼痛性物質の動態と抑制

研究課題名(英文) Distribution and function of inflammation- and nociception-related substances after tooth pulp exposure

研究代表者

矢島 健大 (YAJIMA, takehiro)

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40779550

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)：歯髄疾患における神経ペプチドやイオンチャネルの役割を明らかにするために、ラット臼歯に露髄処置を施し、歯髄疾患モデルラットを作成した。露髄処置後の時間経過とともに、歯髄内から根尖孔外へ炎症性細胞が浸潤することがわかった。免疫組織学的評価から、歯髄において、露髄処置後にPACAPを含む神経線維がCGRPによる神経原性炎症を抑制している可能性が示唆された。また、中枢においてPACAPが歯髄疾患に伴う痛み感覚を抑制している可能性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯髄疾患は痛みを伴うことが多く、時には歯の喪失の一因となる。この病態に対して、痛み感覚やその抑制に関わる神経ペプチドやイオンチャネルのうち、PACAPが神経原性炎症や痛み感覚を抑制している可能性を示唆した。このことはこれまでに知られていなかった、学術的意義の大きな成果である。今後は病態の把握だけでなく、PACAPを用いた疾患の治療方法の探索へと発展が期待できるため、社会的意義も大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In the tooth pulp, many neuropeptides or ion channels are present, and thought to act as neurotransmitters or sensors to various stimuli. This study demonstrates the role of these components in endodontic disease. PACAP is one member of the neuropeptide family, and localized in the tooth pulp. After pulp exposure, inflammatory cells were scattered throughout the coronal to root pulp. At 28 days after pulp exposure, these cells are also detected in the periapical region. By immunohistochemical staining, PACAP-immunoreactive (IR) nerve fibers increased in the tooth pulp after pulp exposure. These fibers may suppress the neurological inflammation caused by CGRP. In the central nerves system, PACAP-IR nerve fibers and its receptors detected in the brainstem. This result suggests that PACAP suppress pain transmission and/or inflammation in the tooth pulp.

研究分野：歯学

キーワード：歯髄 神経ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

## 1. 研究開始当初の背景

口腔領域に生じる痛みには、歯髄、歯周組織、顎関節等の末梢組織にみられるもの、また、三叉神経の枝や三叉神経節等より中枢側に由来する場合など、その発症部位は様々である。鋭い痛みから鈍い痛みなど、痛みの種類や強さも多岐にわたる。歯髄疾患は疼痛との関連が深く、特に不可逆性歯髄炎の場合、自発痛や温熱痛等の鋭い痛みを生じるようになる。治療法としては抜髄処置が選択され、無髄歯はやがて抜歯となるリスクが上昇する。歯髄疾患由来の痛みや残存歯数の減少により、咀嚼にも大きく影響が出るため、口腔機能の低下につながる。

口腔顔面及び咽頭領域に存在する感覚神経には、神経伝達物質やイオンチャネルなど、痛みの伝達や炎症に関与する様々な物質が含まれている。これらのひとつに **Transient receptor potential (TRP)**チャネルが知られている (Clapham, *Nature*, 2003)。本申請者はこれまでに、温熱刺激や炎症、カプサイシンに反応する **TRP vanilloid (TRPV)-1** および、温熱刺激や機械的的刺激に反応する **TRPV2** が咽頭粘膜の感覚神経に豊富に存在することを明らかにし、これらが嚥下反射に重要であることを示唆した。また、冷刺激に反応する **TRP melastatin-8 (TRPM8)** が歯肉などの外部受容器に多いことも明らかにした。

また代表者は、痛み感覚との関わりが大きく、多くのペプチドやチャネルの存在が知られている歯髄神経にも着目し、ナトリウムチャネルの subunit であり、慢性疼痛に関与すると言われる **SCN2B** が歯髄神経等の侵害受容器に豊富に存在することを報告した。正常な歯髄神経には、**TRPV1,2** (Ichikawa et al., *Brain Research*, 2001; Gibbs et al., *Journal of Dental Research*, 2011) や **TRPM8** (Alvarad et al., *Journal of Endodontics*, 2007) が分布している。また、痛みの伝達や炎症を助長する **Calcitonin gene-related peptide (CGRP)**、それらを抑制する **Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP)** が存在することも知られている。

ところが、歯髄炎や根尖性歯周炎において詳細に検討したのは **CGRP** だけである。ラット臼歯に窩洞形成や露髄処置を施すと、歯髄腔内の膿瘍や根尖病巣周囲で **CGRP** を含む神経線維が増加することが報告されている (Kimberly et al., *Anatomical Record*, 1988)。しかし、前述した物質については、歯髄疾患や根尖性歯周炎との関連が疑われるにもかかわらず、十分な検討はなされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、歯髄炎あるいは根尖性歯周炎モデルラットを作製して、痛みや炎症に関連する神経ペプチドやイオンチャネルの発現を検討する。また、それらイオンチャネルのアンタゴニストやアゴニストを適用することで、歯髄の組織変化や侵害刺激マーカーの発現にどのような違いがみられるか調べる。侵害刺激や炎症の拡大に対して、抑制的に働く物質を探索することで、疾患の治癒や疼痛緩和につなげることが可能であると考えている。上記の観点から歯科臨床の場に新たな治療法を提供することにより、国民の **QOL** 向上に寄与することを目指している。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット臼歯における露髄処置後の組織変化

- ① 歯髄炎あるいは根尖性歯周炎モデルラットを作成した。雄性7週令 **Wistar** ラットを用い、三種混合麻酔の腹腔内投与による全身麻酔下で処置を行った。ラットを静置し、開口状態で歯科用切削器具を用いて、露髄処置を上顎左側第一臼歯近心髄角付近に行った。処置後は露髄面を口腔内環境に暴露させたまま動物実験施設内で飼育を行った。対照として、未処置ラット群を設定した。
- ② 露髄処置から1, 3, 7, 14, 28日後に過量麻酔ののち、ザンボニ固定液を用いた灌流固定を行った。上顎骨、三叉神経節、脳を取り出し、上顎骨については **EDTA** 溶液内で脱灰処置を行った。
- ③ 上記の試料について、クライオスタットを用いて凍結組織切片を作成した。
- ④ 上顎骨の組織切片について **Hematoxylin-Eosin (H-E)** 染色を行い、光学顕微鏡下で組織学的な構造変化の観察と評価を行った。

### (2) 露髄処置に伴う神経ペプチド等の動態

- ① (1) で作成した組織切片について、疼痛や炎症に関連する神経ペプチドやそのレセプター、イオンチャネルに関して免疫染色を行った。

- ② 染色を施した切片について、光学顕微鏡または蛍光顕微鏡やレーザー顕微鏡を用いて観察を行い、未処置群と比較した。
- ③ 神経ペプチド等の発現に差が認められる場合、それらを有する神経線維の長さや、細胞の数を計測し、比較検討した。
- ④ 侵害刺激のマーカーである CGRP との蛍光二重染色を実施した。蛍光顕微鏡とレーザー顕微鏡による観察を行い、侵害応答との関連を調べた。

### (3) 延髄における神経ペプチド等の動態

- ① (1) と同様に雄性 7 週令 Wistar ラットに露髄処置を施した。各種刺激により発現する c-fos を露髄処置に伴う刺激の指標とするため、処置 2 時間後と 7 日後に過量麻酔ののち灌流固定を行い、延髄を取り出した。
- ② クライオスタットを用いて延髄の凍結組織切片を作成した。
- ③ c-fos とイオンチャネル、神経ペプチドやレセプターとの蛍光二重免疫染色を行い、蛍光顕微鏡とレーザー顕微鏡による観察を行った。

なお、本研究ではラットを用いる動物実験を主としたため、日本国ならびに国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程に基づいて行われた。動物実験計画書を作成し、承認を得た。実施に際し、最小限の個体数の確保に努め、麻酔方法、手術手技等を慎重に検討し、動物にできる限り苦痛を与えないように行い、適切な飼育環境の下で術後の経過観察や飼育を行った。

## 4. 研究成果

### (1) ラット臼歯における露髄処置後の組織変化

腹腔内麻酔による全身麻酔下で処置を行うことで、ラット上顎左側第一臼歯咬合面に安定的に露髄処置を施すことが出来た。H-E 染色を行った組織切片を光学顕微鏡下で観察したところ、歯髄腔内で炎症性細胞が経時的に根尖側や遠心方向へと浸潤していくことが分かった。これより、露髄処置後に口腔内環境に暴露させることにより、歯髄炎モデルラットとして使用することが出来ることがわかった。また、露髄処置 28 日後では炎症性細胞浸潤は根尖孔外に認められた。これより、露髄処置 28 日後のラットは根尖性歯周炎モデルラットとして用いることが出来ることがわかった。

### (2) 露髄処置に伴う神経ペプチド等の動態

(1) で作成した組織切片に対して各種抗体を用いて免疫染色を行い光学顕微鏡で観察したところ、神経ペプチドの一つである PACAP を含む神経線維が、未処置群と比較して露髄処置後に増加することが分かった。また、露髄 28 日後の根尖部周囲には PACAP を含む神経線維がわずかに存在していた。また、CGRP を含む神経線維も多く認められた。

蛍光二重免疫染色を行い蛍光顕微鏡とレーザー顕微鏡で観察したところ、PACAP を含む神経線維は、CGRP も有していることが分かった。

### (3) 延髄における神経ペプチドの動態

露髄処置 2 時間後と 7 日後の組織切片を蛍光顕微鏡下で観察したところ、ともに c-fos の発現が延髄に認められた。これらを比較したところ、2 時間後と 7 日後で c-fos の発現領域が変化することが分かった。また、c-fos 発現ニューロン周囲には PACAP を含む神経線維が存在した。更に、PACAP を含む神経線維の周囲には PACAP レセプターが存在することが分かった。

以上の結果から、歯髄疾患モデルラットにおいて、PACAP を含む神経線維が CGRP による神経原性炎症を抑制している可能性が示唆された。また、延髄においては、PACAP が痛み感覚を抑制している可能性も示唆された。

現在までのところ、歯髄疾患モデルラットを用いて、組織変化に伴う PACAP 陽性神経線維の動態を詳細に解析出来た。今後は、PACAP が炎症の拡大を抑制する可能性に着目して、アゴニストの適応により PACAP 分布や歯髄の組織変化、また延髄における c-fos の分布に変化が生じるか詳細に検討する予定である。将来的には、PACAP を標的とした歯髄疾患の新規治療方法の確立へと発展させたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計0件）

〔学会発表〕（計1件）

① 矢島健大、佐藤匡、齋藤正寛、市川博之

ラット露髄歯における Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide の分布

日本歯科保存学会2018年度秋季学術大会（第149回）

2018年11月1日～2日

京都市勧業館みやこめっせ（京都府京都市）

〔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：

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：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：市川 博之

ローマ字氏名：(ICHIKAWA, hiroyuki)

研究協力者氏名：佐藤 匡

ローマ字氏名：(SATO, tadasu)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。