

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09893

研究課題名(和文) 口腔内疾患における神経軸索逆行性ペプチド発現の神経免疫学的メカニズム

研究課題名(英文) Neuro-immunological mechanism of retrogradely-transported peptides in oral diseases

研究代表者

小野 堅太郎 (Kentaro, Ono)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：40316154

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、口内炎や歯周炎、下歯槽神経障害などの口腔疾患において神経特異的に誘導される抗菌性ペプチドの作用を明らかにすることである。口内炎モデルラットでのステロイドの効果検証では、治癒速度に変化はないものの疼痛を抑制した。本モデル三叉神経節からの網羅的遺伝子解析にて、抗菌性ペプチドであるヘプシジンの遺伝子が最も上昇していた。この遺伝子は特異的に疾患部位と支配神経節内で上昇し、歯周炎や下歯槽神経障害モデルでも同様であった。電気生理学的解析にてヘプシジンは口腔粘膜への侵害機械刺激による神経応答を増強した。本研究結果から、口腔神経免疫学的メカニズムにヘプシジンが関与することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔内には常在細菌がいるため、疾患発生には感染が付きものである。本研究にて抗菌ペプチドのヘプシジンが発現上昇する反応は種々の口腔内疾患モデルで共通して観察されており、口腔内疾患の成立機序を考えると理にかなった生体防御機構であると考えられる。また、ヘプシジンは疼痛を増強する作用を持っており、疼痛発生にて疾患部位を個体に認知・警告している可能性がある。本研究にて明らかにしたヘプシジン作用機構は種々の口腔疾患で共通しているため、口腔疾患の包括的治療を計画する際に非常に有用な情報を提供し、ヘプシジンは治療標的の1つとなり得る。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the effects of antimicrobial peptides induced in a nerve-specific manner in oral diseases such as oral ulcer, periodontitis, and inferior alveolar nerve injury. In a validation of the effect of steroid drug in a rat model of oral ulcer, the drug suppressed pain although the rate of healing was not changed. In a comprehensive genetic analysis from the trigeminal ganglion of the model, the gene for hepcidin, an antimicrobial peptide, was most elevated. The gene was specifically elevated at the site of disease and in the innervating ganglion, as was the case in the periodontitis and nerve injury models. Electrophysiological analysis showed that hepcidin enhanced the neural response to nociceptive mechanical stimulation in the oral mucosa. The present study demonstrate the involvement of hepcidin in oral neuroimmunological mechanisms.

研究分野：口腔病態生理学

キーワード：ヘプシジン 三叉神経節ニューロン 口内炎 歯周炎 下歯槽神経障害 抗菌ペプチド 疼痛

1. 研究開始当初の背景

我々の口内炎疼痛発症の細胞・分子メカニズムに関する一連の研究結果から、細菌感染を主体とする口内炎においては TRPA1 チャネル(化学・機械受容分子)が疼痛発症の主要なキー分子であることを突き止めていた。TRPA1 はグラム陰性菌のリポポリサッカライドを直接受容して神経を活性化し、FPR1 を介して間接的に機械感作され、機械過敏症を引き起こす。ゆえに、口内炎疼痛研究からの結果は近年台頭してきた神経免疫学に相当すると考えられた。本研究計画のきっかけは、口内炎モデルラットの三叉神経節に対するマイクロアレイ解析を事前に行ったことにある。Hamp、Reg3b および Serpina3n が発現増加したトップ 3 遺伝子であった。Reg3b と Serpina3n は疼痛研究で既に報告される遺伝子であったものの Hamp および翻訳タンパク質であるヘプシジンに関しては全く報告がなかった。ヘプシジンは抗菌ペプチドとして知られている。口腔疾患は口腔内常在細菌による感染を免れにくいいため、神経由来のヘプシジンが免疫機能や疼痛発生に関与しているかもしれないと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、Hamp (および Reg3b と Serpina3n) の遺伝子発現上昇が、他の口腔疾患でも引き起こされるのか、局所的な反応なのかを調べ、病態や疼痛発生にどのような寄与をするのかを明らかにすることである。口腔疾患における神経免疫学的メカニズムの解明は治療戦略に重要な情報を提供し、歯科医療の大きな発展に繋がる。

3. 研究の方法

- 1) 口内炎病態の解明: 口内炎モデルラットにおける口内炎部位へのステロイド作用を検討することで口内炎の病態を明らかにする。さらに、マイクロアレイ解析からのデータを Gene Ontology 解析することで、遺伝子発現面からの口内炎病理を明らかにする。
- 2) 多疾患モデルでの特異的遺伝子発現の確認: Hamp、Reg3b および Serpina3n の 3 遺伝子について、PubMed にオンライン公開されるマイクロアレイデータ(GDS)を利用して、その他の疼痛モデルにおける末梢神経節での発現変化について調査する。加えて、歯周炎モデルと下歯槽神経障害モデルを作製し、口内炎モデルと同じように Hamp の発現増加があるのかどうかを調べる。また、口内炎モデルにおいて Hamp の発現が疾患部位と支配神経に特異的な現象であるかを明らかにする。
- 3) ヘプシジンの疼痛発生における役割の解明: ラット口腔内(前庭部粘膜)にヘプシジンを投与し、疼痛中継核である三叉神経尾側亜核の 2 次ニューロンより神経活動を記録する。ヘプシジン投与自体に関する放電頻度、機械刺激に対する放電頻度の変化について調べる。

4. 研究成果

口内炎モデルラットのモデル妥当性と口内炎病態解明を行うため、一般的な口内炎治療薬ステロイド軟膏の作用について検討した。ラットにも適用可能な長期残存性を持った軟膏基剤の選定に時間を要したが、共同研究をする第一三共ヘルスケアから提供されたトラフル軟膏基剤を使用することで、ラットモデルでも薬効を発揮することのできる実験条件を得ることができた。ステロイド(トリアムシノロンアセトニド)は、予想に反して本モデルの口内炎治癒を促進する結果は示さなかったが、グルココルチコイド受容体の下流にある抗炎症関連遺伝子の発現を促進し、COX 遺伝子発現、炎症性細胞の浸潤、マスト細胞の脱顆粒およびプロスタグランジン E2 産生といった一般的炎症所見を有意に抑制していた。以前の我々の研究によれば、口内炎による自発痛は COX 依存性経路によって引き起こされており、触ったときの痛み(接触痛)は COX 非依存性経路であることを明らかにしていた。この報告に一致して、自発痛の指標として用いた顔面ラビング時間の延長はトリアムシノロンアセトニドにより有意に抑制された。しかし、接触痛も有意に抑制されていたため、分子レベルでのメカニズム解析を行った。結果として、口内炎接触痛の発症を担う TRPA1 チャネルの機械感受性が長期トリアムシノロンアセトニド作用によって抑制されるという観察結果を得た。これら広範な解析により、口内炎モデルラットが臨床的に観察される口内炎と同様の病態を示し、一般的治療薬により疼痛緩和を引き起こすことが明らかとなった。この結果に関しては、ヘプシジン作用の研究に先んじて論文としてまとめ、International Journal of Molecular Science に 2021 年に掲載された。

口内炎モデルラットの三叉神経節をサンプルとしたマイクロアレイ解析での結果は膨大であり、どのようなバイオインフォマティクス分析を適用するかが苦慮された。最終的に、発現量が 1.5 倍より増加・減少している 32 遺伝子だけに注目し、Gene Ontology 解析を行った。結果は「防御反応」「創傷反応」「炎症反応」の 3 つが E スコアで 2.74 を示した。これは口内炎の病態を適切に反映した遺伝子変化が起きていることを示唆している。

最も発現増加を示している Hamp (3.65 倍)、Reg3b (3.33 倍)、Serpina3n (2.49 倍)といった 3 遺伝子に注目した。マイクロアレイでは三叉神経全体を使用した。三叉神経は下顎を支配する枝と上顎・前額部を支配する枝の領域に二分することが可能である。モデルでは口内

炎を下顎の 枝領域に作製している。定量性 RT-PCR により、 枝領域では Hamp は 90 倍、Reg3b は 12 倍、Serpina3n は 7 倍まで増加していた。一方、 枝領域では何ら有意な変化は起きていなかった。これらの結果より、この 3 遺伝子の発現増加は、病巣の支配神経領域に特異的に引き起こされた生体応答であるといえる。次に、他の疼痛モデルでも 3 遺伝子はどうかかどうかを調べるため、PubMed で公開されるマイクロアレイデータ(GDS)を利用した。解析可能であった 3 つのデータベースを基に再解析したところ、足底部各種疼痛モデルにおいても後根神経節にて発現増加していることを確認した。さらに、通法に従って歯周炎モデルと下歯槽神経障害モデルを用意し Hamp が増加していた。これらの結果より、Hamp は疼痛を発生する病態モデルにおいて共通して発現増加する遺伝子であることが示された。Hamp がコードするヘプチジンは肝臓での高発現と鉄代謝機能がよく研究されている。抗菌ペプチドとも知られているため、数々の抗菌ペプチドを口腔内に提供する唾液・唾液腺での発現も予想された。しかし、口内炎モデルにおいて肝臓や唾液腺での Hamp 上昇はなく、血漿や唾液中でのヘプチジン増加もなかった。実験計画時に我々はヘプチジンの口内炎部位への軸索輸送を考えていたが、口内炎部位の定量性 RT-PCR により Hamp が増加しており、ウエスタンブロッティングと ELISA 法によるヘプチジン定量にて明らかな上昇を示していたため、軸索輸送への注目を中断し、口腔粘膜でのヘプチジン作用についての実験に方向転換を行った。

種々の実験系において疼痛関連行動を観察したが、ヘプシジン投与時の麻酔の影響があるため、信頼性のある結果を得ることができなかった。そこで、口腔顔面領域の痛覚中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核の二次ニューロンを *in vivo* で細胞外記録する実験系へと移った。まず、口内炎を作製していた口腔粘膜領域の投射領域を確定するため、カプサイシン投与後のリン酸化 ERK1/2 の染色と口内炎モデルでの c-Fos 染色を行った。Obex を中心とした三叉神経脊髄路核尾側亜核に陽性細胞が一致して得られたため、麻酔下ラットのこの脳領域に電極を刺入して神経活動記録を行った。ヘプシジン投与により若干の神経活動の亢進があったが統計学的な有意差は得られなかった。非侵害機械刺激であるブラシ刺激(筆でなでる)刺激に関して、ヘプシジンは何の影響を与えなかったものの、10g 以上の侵害機械刺激に対する応答がヘプシジン投与後に有意に増強していた。これらの研究内容を論文としてまとめ、PLos One 誌に 2023 年に掲載された。

本研究は、ヘプシジンが口腔内疾患発症により神経系や疾患部位に特異的に発現上昇することによって病態を調節している可能性を示している。歯科・医科臨床において病態を理解することは診断や治療計画に必須の情報である。本研究結果は、疼痛を有する口腔疾患の治療に有用であり、ヘプシジンが治療標的の 1 つになり得ることを示している。一方で、ヘプシジンの軸索輸送の可能性や疼痛発生機序については多くの不明な点が残されている。今後の研究にて明らかにしていく必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hitomi Suzuro, Nodai Tomotaka, Kokabu Shoichiro, Shikayama Takemi, Sago-Ito Misa, Nakatomi Chihiro, Terawaki Kiyoshi, Omiya Yuji, Shinoda Masamichi, Ono Kentaro	4. 巻 18
2. 論文標題 Hepcidin expression in the trigeminal ganglion and the oral mucosa in an oral ulcerative mucositis rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0284617
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0284617	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Naniwa Mako, Nakatomi Chihiro, Hitomi Suzuro, Matsuda Kazunari, Tabuchi Takuya, Sugiyama Daijiro, Kubo Sayaka, Miyamura Yuichi, Yoshino Kenichi, Akifusa Sumio, Ono Kentaro	4. 巻 22
2. 論文標題 Analgesic Mechanisms of Steroid Ointment against Oral Ulcerative Mucositis in a Rat Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12600 ~ 12600
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212600	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Suzuro Hitomi, Masamichi Shinoda and Kentaro Ono
2. 発表標題 Expression and functional analysis of hamp/hepcidin in the trigeminal ganglion of the oral ulcerative mucositis rat model
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mako Naniwa, Chihiro Nakatomi, Takuya Tabuchi, Sumio Akifusa, Kentaro Ono
2. 発表標題 Analgesic mechanisms of long residual steroid ointment for oral mucositis
3. 学会等名 Asia-Pacific Conference（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浪花 真子, 人見 涼露, 氏原 泉, 鹿山 武海, 松田 一成, 小野 堅太郎
2. 発表標題 Effect of steroid-containing ointment in a rat oral ulcerative mucositis model
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浪花 真子, 中富 千尋, 人見 涼露, 松田 一成, 小野 堅太郎
2. 発表標題 口内炎モデルラットにおけるステロイド軟膏の効果
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浪花 真子, 中富 千尋, 人見 涼露, 田淵 拓也, 秋房 住郎, 小野 堅太郎
2. 発表標題 ステロイド軟膏による口内炎疼痛抑制機序
3. 学会等名 第80回九州歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浪花 真子, 中富 千尋, 人見 涼露, 松田 一成, 秋房 住郎, 小野 堅太郎
2. 発表標題 ステロイド軟膏による口内炎疼痛抑制機序の解明
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浪花 真子, 中富 千尋, 人見 涼露, 田淵 拓也, 秋房 住郎, 小野 堅太郎
2. 発表標題 ステロイド軟膏による口内炎疼痛抑制メカニズムの解明
3. 学会等名 第72回西日本生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	人見 涼露 (Hitomi Suzuro) (70548924)	日本大学・歯学部・講師 (32665)	

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浪花 真子 (Naniwa Mako)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------