

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09911

研究課題名（和文）歯内療法対象疾患に伴う疼痛制御因子の解明とその疼痛緩和に向けた実験モデルの構築

研究課題名（英文）Elucidation of pain control factors associated with endodontic diseases and construction of an experimental model for pain relief

研究代表者

砂川 光宏（Sunakawa, Mitsuhiro）

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30179288

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯髄炎により惹起される中枢感作およびそれに対する生体の疼痛制御システムについて明らかにする目的で、allyl-isothiocyanate (mustard oil)をラット上顎臼歯に貼付することで歯髄炎を惹起した後、視床における遺伝子発現をアレイにて網羅的に解析した。その結果、MO貼付群では視床内におけるKcna1およびSostdc1遺伝子発現が有意に低下する事が明らかになった。カリウムチャネル減少に伴う機能喪失およびBMPシグナルの亢進が歯髄炎により惹起される中枢感作に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性歯髄炎の痛みは、我々が感じる痛みの中でもかなり激烈なものであり、中枢感作に関与すると報告されている。しかし、実際にどのように中枢感作を引き起こしているのかについてはいまだ不明な点が多い。今回、ラット上顎臼歯にマスタードオイルを貼付することで、歯髄炎に伴う激しい痛みを誘発した結果、侵害刺激の受容野の一つである視床において、カリウムチャネルに関与する遺伝子およびBMPのアンタゴニストの発現が低下した。これらのシグナルが歯髄炎の痛みに伴う中枢感作の誘導に関与している可能性が推察されるとともに、これらが中枢性の痛みを制御するターゲットとなりうる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the central sensitization induced by pulpal inflammation and the systemic pain control system, we induced pulpal inflammation by applying allyl-isothiocyanate (mustard oil) to the maxillary molars of rats and comprehensively analyzed gene expression in the thalamus with a DNA array. We revealed that Kcna1 and Sostdc1 gene expression in the thalamus was significantly decreased in the MO-applied group. These findings suggest that loss of function associated with decreased potassium channels and increased BMP signaling may be involved in the central sensitization induced by pulpal inflammation.

研究分野：歯内療法

キーワード：歯髄炎 中枢感作 Kcna1 Sostdc1 視床 DNAアレイ

1. 研究開始当初の背景

未分化間葉系の結合組織である歯髄には神経線維が豊富に分布しているが、象牙細管経由の細菌および細菌産物の侵入に対する生体防御反応である歯髄炎の発症および進行に伴い、侵害受容器としての感覚ニューロンが活性化され、中枢へ痛みシグナルが伝達される。さらに、炎症の増悪に伴い感覚ニューロンの活性化が持続することにより、中枢神経系の二次ニューロン内で中枢性感作が誘導され、自発痛、痛覚過敏、アロディニアといった様々な臨床症状を呈する。これらの症状は歯髄炎から回復した後も持続すると報告されている¹。しかし、中枢性感作の発症メカニズムについていまだ不明な点が多い。そこで本課題においては、実験的に歯髄炎を惹起するモデルをまず確立することを検討した。

アリルイソチオシアネート(マスタードオイル、MO)は炎症性刺激物質でありかつ神経線維興奮物質である。これを歯髄に適用することにより、実験的に歯髄炎および歯髄炎に伴う疼痛を誘発することができる²。また、ラット臼歯に炎症を惹起することにより、視床においてグリア細胞の増加と、炎症性メディエーター産生の増加が確認されている³。すなわち、歯髄局所の炎症に伴い中枢において神経免疫相互作用が誘導された結果、中枢感作が誘発された可能性が高いと考えられる。

2. 研究の目的

ラット臼歯に MO を貼付することで実験的歯髄炎を惹起し、視床内にて発現が変動する遺伝子について解析し、歯内療法対象疾患に伴う疼痛制御因子について明らかにするとともに、その制御方法を検討する。

3. 研究の方法

(1) 歯髄への MO の適用

すべての実験は、東京医科歯科大学動物実験委員会の承認を得て実施した (A2017-009A、A2018-189A、A2019-053A)。5 週齢の雄 Wistar ラット (n = 144) を次の 6 群に分けた。(i) MO+LA [局所麻酔薬 (LA) 注射後の MO 塗布; n = 36]、(ii) MO+生理食塩水 [生理食塩水注射後の MO 塗布; n = 36]、(iii) MI+LA [LA 注射後のミネラルオイル (MI) 塗布; n = 24]、(iv) MI+生理食塩水 [生理食塩水注射後の MI 塗布、n = 24]、(v) 無処置+LA [歯髄処理なしの LA 注射、n = 12]、および (vi) 無処置+生理食塩水 [歯髄処理なしの生理食塩水注射、n = 12]。上顎左側第一臼歯を No. 1/2 ラウンドバーにて露髄させ、0.5 μ l の MO または MI を塗布し、仮充填材 (Cavit、3 M ESPE) にて封鎖した。処置後、0.5、1、2、24 時間に視床を摘出した。

(2) マイクロアレイ

摘出した視床は左右に分け、TRIzol (Thermo) にて RNA を抽出し、Nucleospin RNA Plus (Macherey-Nagel) あるいは QuickGene (クラボウ) で精製した。次に GeneChip WT Plus 試薬キット (Thermo Fisher Scientific) を使用して各時点でマイクロアレイを実施し、トラ

ンスクリプトーム解析コンソール ソフトウェア (バージョン 4.0、Thermo) を使用してデータを解析した。

(3) RT-PCR

抽出した RNA を用いて TaqMan 逆転写試薬 (Thermo) あるいは PrimeScript RTase (Takara) を使用して逆転写を行い、cDNA を合成した。さらに、特異的なプライマーおよび TaqMan gene expression assays (Thermo) あるいは GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて qPCR を行った。内部標準として glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) あるいは β actin を用い、相対遺伝子発現値は、CT 法を使用して求めた

(4) 免疫組織化学

4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定後、さらに摘出した視床は同固定液で4、8時間後固定し、OCT コンパウンドにて包埋後、厚さ 8 μ m の凍結切片を作成した。一次抗体として、Kv1.1 に対するポリクローナル抗体 (1:200、Affinity) または GFAP に対するモノクローナル抗体 (1:5,000、Novus Biological) を使用し、4 °C で 48 時間作用させた。その後、ビオチン化二次抗体 (1:100、Vector Laboratories) およびアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (Elite ABC キット、Vector) を作用させ、3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色した。定量解析には NIH イメージ (1.37v) を使用した。

(5) 統計

グループ間の比較は、Kruskal-Wallis 検定と、Bonferroni 補正による Dunn の多重比較検定を使用し、有意水準は $p < 0.05$ に設定した。

4. 研究成果

(1) Kcna1 の遺伝子発現

各時点での MO+生理食塩水群の対側視床において発現が減少した遺伝子のうち、特に potassium voltage-gated channel subfamily A member (Kcna)1 発現は処置後 1 時間で顕著に発現が抑制された (図 1)。同側視床においてはそのような変化は観察されなかった (図 1)。なお、Kcna2-7 および Kcna10 の発現レベルは、調査したどの時点でもグループ間で有意差は認められなかった。

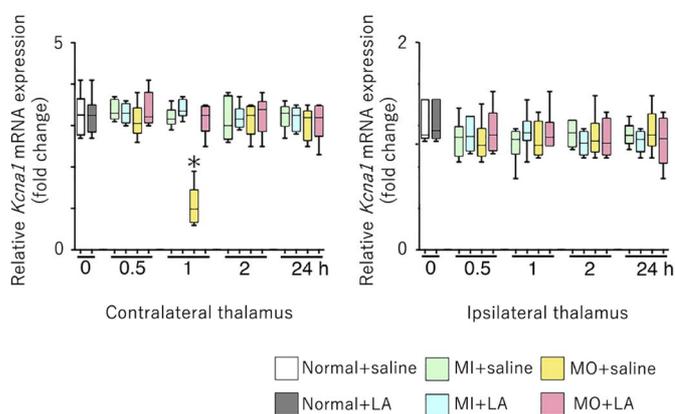


図 1 視床における Kcna1 mRNA 発現 (RT-qPCR) 対側視床において、術後 1 時間で Kcna1 発現の有意な低下が認められた (* : $p < 0.05$)

(2) Kcna1 に対する免疫組織化学染色

Kv1.1/Kcna1 は軸索において発現が認められた。MO+生理食塩水群では、MO 塗布後 1 時間で Kv1.1 発現領域の密度が 0 時間 (歯髄処理なし) または 24 時間 ($p < .05$) よりも有意に低かった。MO+LA 群では、Kv1.1 発現領域の密度が 0 時間または 1 時間よりも 24 時間で有意に高かった ($p < .05$)。GFAP 発現アストロサイトの密度は、MO+生理食塩水群と MO+LA 群の両方で MO 塗布後 24 時間まで増加したが、MO+生理食塩水群においてより高い増加度を示した。以上の結果は、Kv1.1/Kcna1 が GFAP の発現の制御に関与しており、歯髄への MO 貼付により Kv1.1/Kcna1 が抑制された結果、GFAP 発現が増強したと推察される。しかし、なぜ歯髄への MO 貼付により Kv1.1/Kcna1 が抑制されたのかはいまだ不明であり、今後そのメカニズムの解明を図りたいと考えている。以上の結果は、Oral Diseases 誌に発表した⁴。

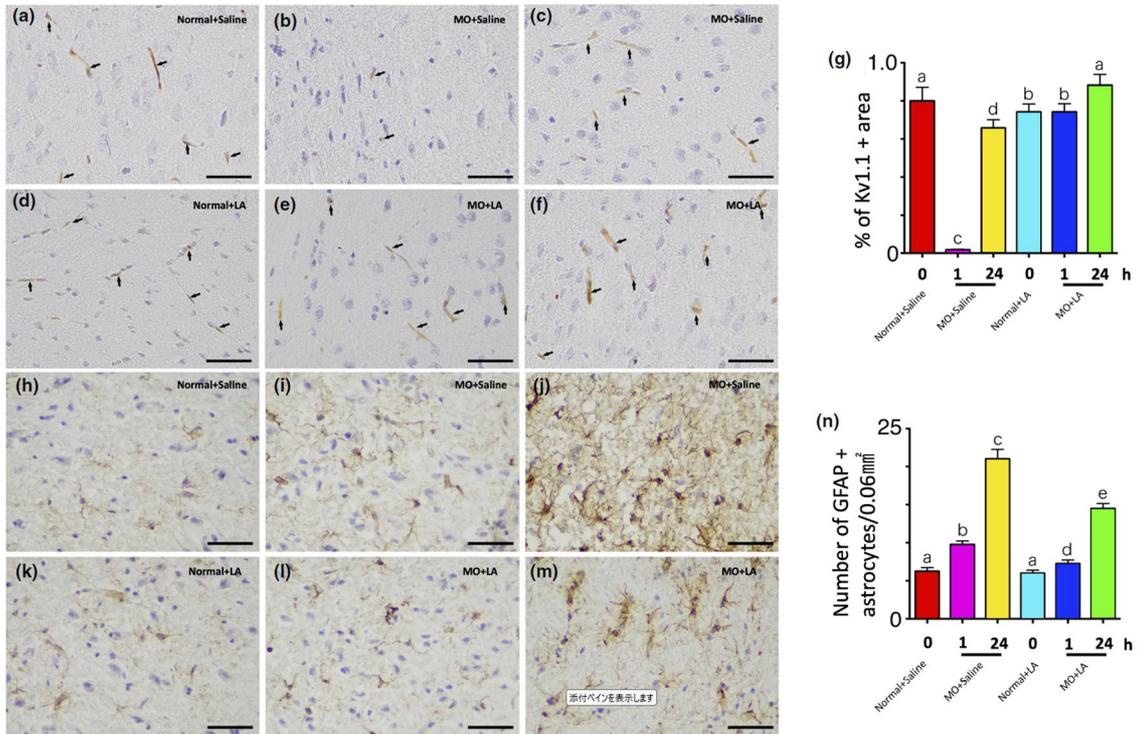


図2 MO 適用後の対側視床における Kv1.1 および GFAP の免疫組織化学的局在 (a-f) MO 適用後 1 時間 (b, e, i, l) および 24 時間 (c, f, j, m) の無処置+生理食塩水群 (a, h)、無処置+LA 群 (d, k)、MO+生理食塩水群 (b, c, i, j)、および MO+LA 群 (e, f, l, m) における Kv1.1 発現軸索。(h-m) GFAP 発現アストロサイト。矢印は Kv1.1 発現領域を示す。スケールバー:40 μ m。(g) MO 適用後 0 (歯髄処理なし)、1、および 24 時間における対側視床における Kv1.1 発現領域の密度および (n) GFAP 発現アストロサイトの数。* $p < .05$ ($n = 6$)。同じ文字を持つグループ間では有意差はなかった。

(3) Sostdc の遺伝子発現

各時点での MO+生理食塩水群の対側視床において発現が減少した遺伝子のうち、特に sclerostin domain containing (Sostdc) 1 発現は処置後 2 時間で顕著に発現が抑制された(図 3)。Sostdc1 は BMP のアンタゴニストだが、近年 Wnt のアンタゴニストとしての機能を有することが報告されている⁵。BMP および Wnt それぞれ痛みとの関連が示唆されており、Sostdc1 発現の低下がこれらのシグナルの亢進を誘導し、痛みを誘導している可能性が推察される^{6, 7}。

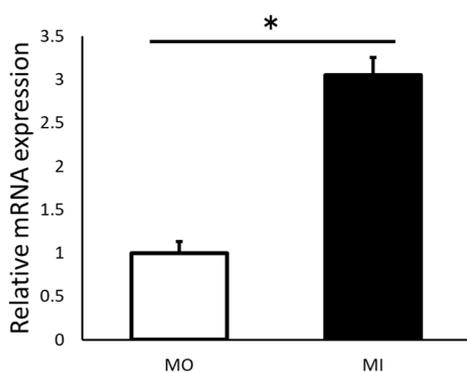


図3 Sostdc1 mRNA 発現 (RT-qPCR)
対側視床において、術後 2 時間で Sostdc1 発現の有意な低下が認められた (* $p < 0.05$)

< 引用文献 >

- 1 . Woolf, C.J. (2011). Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, 152(3 Suppl), S2–S15.
- 2 . Sessle, B.J. (2000). Acute and chronic craniofacial pain: Brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*, 11(1), 57–91.
- 3 . Kaneko, T., Chokechanachaisakul, U., Kawamura, J., Yamanaka, Y., Ito, T., Sunakawa, M., Suda, H., Okiji, T. (2013). Up-regulation of p38 mitogen-activated protein kinase during pulp injury-induced glial cell/neuronal interaction in the rat thalamus. *Journal of Endodontics*, 39(4), 488–492.
- 4 . Murano, H., Kaneko, T., Zaw, S.Y.M., Sone, P.P., Zaw, Z.C.H., Okada, Y., Sunakawa, M., Katsube, K., Okiji, T. (2022). Pulp inflammation induces Kv1.1 K⁺ channel down-regulation in rat thalamus, *Oral Diseases*, 28, 1674–1681.
- 5 . Ahn, Y., Sanderson, B.W., Klein O.D., Krumlauf, R. (2010). Inhibition of Wnt signaling by Wise (Sostdc1) and negative feedback from Shh controls tooth number and patterning. *Development*, 137(19), 3221–3231.
- 6 . Honjo, K. & Tracey, W.D.Jr. (2018). BMP signaling downstream of the Highwire E3 ligase sensitizes nociceptors. *PLoS Genetics*, 14:e1007464.
- 7 . Zhao, Y. & Yang, G. (2018). Effect of Wnt signaling pathway on pathogenesis and intervention of neuropathic pain. *Experimental & Therapeutic Medicine*, 16, 3082–3088.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Murano Hiroki, Kaneko Tomoatsu, Zaw Su Yee Myo, Sone Phyo Pyai, Zaw Zar Chi Thein, Okada Yamato, Sunakawa Mitsuhiro, Katsube Ken ichi, Okiji Takashi	4. 巻 28
2. 論文標題 Pulp inflammation induces Kv1.1 K ^{<sup>+</sup>} channel down regulation in rat thalamus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1674 ~ 1681
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.13866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡田大和, 川島伸之, 野田園子, Nyein Chan Ko, 村野浩気, 砂川光宏, 興地隆史
2. 発表標題 ラット臼歯歯髄へのMO貼付に伴う視床におけるSostdc1 mRNA発現の低下
3. 学会等名 日本歯科保存学会秋季学術大会（第159回）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 興地隆史, 川島伸之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 永末書店	5. 総ページ数 284
3. 書名 エンドドンティクス 第6版	

〔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	興地 隆史 (Okiji Takashi) (80204098)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	橋本 健太郎 (Hashimoto Kentaro) (80825662)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教 (12602)	
研究 分 担 者	岡田 大和 (Okada Yamato) (60964921)	東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・医員 (12602)	

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