

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20397

研究課題名(和文) 歯髄炎に伴うニューロン - グリア連関のシグナルネットワークの解析と臨床への展開

研究課題名(英文) Analysis of the Neuron-glia cell Interactions following dental pulp inflammation, and clinical research

研究代表者

河村 隼(KAWAMURA, Jun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20634083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：SD系ラットを用いて、マスタードオイルを歯髄に適用させ実験的歯髄炎を誘発し、以下について検索した。

1) 歯髄神経の興奮に伴い中枢性感作が生ずる可能性を詳細に検索するため、興奮性アミノ酸Glutamateの受容体NMDARサブユニットのmRNA発現動態を解析した。

2) 同時に、アストロサイトに特異的に発現するGFAPのmRNA発現、ミクログリアの活性化については中枢性疼痛処理機構と特に関係があるとされているp38MAPK、P2X4受容体、IBA-1等のmRNA発現を検索し、グリア細胞の活性化を解析した。さらに各種修飾因子の影響や細胞機能の活性化状態を免疫組織化学的手法を用いて行った。

研究成果の概要(英文)：Dynamics of mRNA expression of the NMDAR subunit which excitatory amino acid Glutamate were analyzed to search the possibility in the sensitized thalamus induced by mustard oil application to SD rat molar pulp.

At the same time, mRNA expression of GFAP which specifically developed in astrocyte, p38MAPK called to be connected with a central pain treatment mechanism about the microglial activation in particular, P2X4 receptor, IBA-1 was searched and analyzed the activation of glia cells.

Furthermore, immunohistochemical technique was used with an activated state of effect and the cell function of various modifying factors.

研究分野：歯内療法

キーワード：グリア細胞 疼痛 ニューロン

1. 研究開始当初の背景

歯の硬組織の切削に伴い歯髓細胞や歯髓神経にさまざまな組織学的、免疫組織化学的、機能学的変化が生じていることが報告されている (Westenbroek et al. J Neurosci Res 75(3):371-383, 2004)。また、正常なヒトの三叉神経領域の痛みに関する最近の研究では、侵害性熱刺激に対する中枢神経の活動について fMRI を使用した投射経路の解析報告がなされ (DaSilva et al., J Neurosci 22(18): 8183- 92, 2002.)。痛み情報処理の中枢機構に関する“痛みの弁別の様相”の研究と、“痛みの情動的様相”の解析が行われてきた (Treede et al., Pain 79:105-111 1999)。特に米国においては「痛み研究 10 年」計画により、多数の新知見が発表された。

しかし、歯髓炎の病態と関係させた痛みの中枢機構を主題とした研究は少ない。本研究で計画している起炎性細神経興奮性物質マスタードオイル(MO)による実験的歯髓炎を誘発する研究手法は、申請者のグループで行われている独創的なものである (Sessle Bj., Minerva Anesthesiol, 2005 ; Kaneko et al., J Oral Biosci, 2005; Hikiji et al., Arch oral Biol, 2000; Matsui et al., Jpn J Oral Biol, 2000; Sunakawa et al., Pain, 1999)。実験的歯髓炎に伴う中枢神経系内の歯髓駆動ニューロン及びミクログリアやアストロサイトの相互作用を遺伝子発現解析で行ったものは、最近の申請者のグループの報告以外に無く (Kaneko M et al., Brain Res ; 2011, Kawamura et al., J Dent Res, 2010; Chokechanachaisakul et al., J Endod, 2010; Kaneko et al., J Endod, 2010; Sunakawa M et al., J Dent Res, 2008 等)。歯髓疾患に伴う痛みの中枢細胞間の相互作用については十分に解明されていない。また、歯髓炎の治療法として行われている抜髄処置後に生じてくる神経障害性疼痛と考えられる痛み臨床で遭遇することがあるが、実際に歯原性の慢性疼痛に苦しんでいる患者の中枢神経系内に生じている中枢細胞間の相互作用を捉えた研究報告は見当たらない。本研究で計画した歯髓疾患に伴う侵害受容性及び神経障害性と考えられる難治性疼痛に関する“基礎歯科医学的研究”は、臨床歯科医学的研究と統合することにより、「難治性歯痛」の発症機構をより精密なレベルで解明し、その結果を臨床の現場に反映させようとする他に類を見ないものである。“臨床歯科医学的研究”として臨床検査医学的方法、心理学的研究を統合させて、広義の歯髓疾患に関する難治性の痛みについて行う総合的な研究は、他の研究施設では行われていないものである。また、患者にインフォームドコンセントが得られた場合には、保存不可能として抜去した歯の歯根に付着している細胞における疼痛関連物質受容体の遺伝子発現解析を行う予定にした。この方法も本申請研究以外には試みられていなかった。

2. 研究の目的

歯内治療の臨床では、X線画像診断学的に問題ないと判断されたにも拘らず、患歯周囲の強い痛みや顎顔面領域や頭頸部の広範な放散痛等が消退しない症例に遭遇することがある。これらには侵害受容性疼痛、神経障害性疼痛及びその中間型が存在するとされている。本研究では、臨床において通常の歯科治療では完治しない歯髓疾患に伴うこれらの「難治性の痛み」に着目して、病態神経科学的機構を解明する「実験的歯髓炎に伴う末梢組織内および中枢神経系内の動態に対する生理学的・免疫組織学的・遺伝子発現解析による基礎医学的研究」と「歯髓疾患に伴う難治性疼痛の臨床歯科医学的研究」を有機的に融合させて、双方を包括的に実施することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 基礎歯科医学的研究：「実験的歯髓炎に伴う末梢組織内および中枢神経系内の動態に対する免疫組織学的・遺伝子発現解析による基礎的研究」について

実験動物として pentobarbital sodium にて麻酔した SD 系ラットを用いて、マスタードオイルを歯髓に適用させ実験的歯髓炎を誘発し、以下について検索した。

歯髓神経の興奮に伴い中枢性感作が生ずる可能性を詳細に検索するため、興奮性アミノ酸 Glutamate の受容体 NMDAR サブユニットの mRNA 発現動態を解析した。

同時に、アストロサイトに特異的に発現する GFAP の mRNA 発現、ミクログリアの活性化については中枢性疼痛処理機構と特に関係があるとされている p38MAPK、P2X4 受容体、IBA-1 等の mRNA 発現を検索し、グリア細胞の活性化を解析する。さらに各種修飾因子の影響や細胞機能の活性化状態を免疫組織化学的手法などを用いて行った。

歯髓内外での神経性炎症において、ブラジキニン等の生理活性物質と主要組織適合性抗原(MHC)クラス 分子、Toll 様受容体等の特異的に発現する免疫担当細胞の関係を免疫組織学的・遺伝子発現解析を行い、神経性炎症の動態を解析した。

(2) 臨床歯科医学的研究：「歯髓疾患に伴う難治性疼痛の臨床的研究」について

東京医科歯科大学歯学部付属病院・むし歯外来を受診した患者で、広義の歯髓疾患を有する者を研究対象とする。本研究の主旨を理解してインフォームドコンセントの得られた患者に対して、以下の方法を用いて原因疾患の臨床検査医学的並びに疼痛について定量的解析を行った。

歯髓疾患の治療前に Visual Analog Scale(VAS)により疼痛程度を調査し、その疼痛について Short Form McGill 疼痛質問表(SF-MPQ)の回答を求め、患者が訴えている痛みの性状をその言語による表現形として捕

らえる。同時にその疼痛に対する患者自身の心理学的な苦悩の程度を臨床心理学的に捕らえる。

患歯について歯内治療学的鑑別診断を行い、患者の主訴の病態を確定し、歯科臨床上考えられる最良の治療法により疼痛の緩和を最優先させた原因疾患の症状改善を目的とした加療を行った。診療期間中の痛みの変化を記録し、治療終了後予後調査を行い歯科臨床的病態の治癒の確認と疼痛の変化についてVAS等を用いて定量化した。

保存が不可能な歯については、歯周組織局所での疼痛関連遺伝子発現について解析した。

歯科的治療法によっても痛みが消退しないと訴える患者が歯髄疾患に伴う神経障害性疼痛に罹患している可能性について探索・検査を行い、歯科治療以外に有効な治療方法が考えられる場合には、該当診療科に紹介し患者の利益を図る。

口腔顔面領域の難治性の痛みについての鑑別診断方法を確立し、臨床応用を検討した。

4. 研究成果

本研究では、ラットの視床内に歯髄への電気刺激に応答する歯髄駆動ニューロン(TPDNs)を確認し、歯髄へのマスタードオイル(MO)適用による化学的条件刺激により、これらのTPDNsの応答性が有意に増強されることを再確認した。

また、視床へのN-methyl-D-aspartate型受容体(NMDAR)拮抗薬の微小投与により、視床内のTPDNsの応答性は有意に減弱した。さらに、歯髄へのMO適用により、視床内にNMDAR-2AおよびNMDAR-2DのmRNAの発現増強が認められ、また、視床内へのMK-801微小投与によりこれらNMDAR2AおよびNMDAR2D mRNAの発現の減弱が認められた。この事実から、視床内に存在するTPDNsは、神経伝達物質としてグルタミン酸を介した歯髄入力の情報処理に関与していることが示唆された。また、これらのTPDNsは歯髄炎に陥った際に、NMDARを介する機構により中枢性感作が生じ、応答性が増強され、歯痛に伴ってみられる情動的な痛みに重要な役割を持つ可能性が示唆された。

また、MK-801適用は、ラット臼歯の実験的矯正移動を行うことにより三叉神経核複合体に出現するc-Fos発現を減少させるが、中脳中心灰白質の腹側外側、大縫線核ではc-Fos発現を増大させることが報告されている。さらに、Hamdyらは、MK-801がモルフィンの作用と競合することで、モルフィン依存症の発達を減弱させる働きがあると報告している。このことは、NMDA拮抗薬がナロキソン同様に働き、グルタミン酸もまた痛覚過敏の発生抑制に関与することにはほかならない。ナロキソンとMK-801の役割の相互関係については依然不明な点が多く、今後の研究に負うところが大きい。このように、視床

を始めとした中枢神経系内におけるNMDARの機能、それぞれの構成単位である中枢神経系ニューロンの異なる活動性は、歯髄炎に関連した痛みを中心とした複雑な臨床的症状の発症に重要な役割を担っている可能性がある。

また、本研究では、神経障害性疼痛の慢性化前におけるニューロンとミクログリアに関連する遺伝子発現の動態解析を行うことで、ニューロンとミクログリアとの関連性を検討した。

ヒトの脳において、ニューロンとほぼ同数がニューロンと同じ場所に分布していると言われているミクログリアについて、中枢性感作における視床内での動態観察に焦点を置き、関連する遺伝子の発現解析を行った。活性化されたミクログリアは、神経傷害性(炎症性)および神経保護性(抗炎症性)に機能する二面性を持ち、近年、CNS内の活性化型ミクログリアは、この二面性について多く議論されており、傷害性のミクログリアと保護性のミクログリアは、細胞外の刺激に応じてフェノタイプがシフトすることが報告されている。また、神経障害性疼痛を発症させた神経結紮損傷モデルなどでは、通常、傷害性マーカーであるCD86やCCL5などのmRNA発現は亢進すると報告されている。

今回、最終的に神経傷害性のミクログリアに対して抑制作用のある抑制剤を用いることで、ニューロンとミクログリアの活性が神経障害性疼痛に関与していること、また、その際に、ミクログリアのフェノタイプシフトが認められることを遺伝子学的に示唆した。しかし、ニューロンとミクログリアのフェノタイプシフトを促すシグナル経路の詳細については、今後、さらに検討する必要がある。

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 1件)

河村隼、実験的歯髄炎はラット視床におけるグリア細胞を活性化させる、日本歯科保存学会(平成27年度秋季学術大会)、2015年〔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

河村 隼 (KAWAMURA, Jun)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究
科・助教

研究者番号：20634083

(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

興地 隆史 (OKIJI, Takashi)

金子 友厚 (KANEKO, Tomoatsu)