

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10160

研究課題名（和文）口腔顔面痛発症機構の解明は新規治療法開発に貢献する

研究課題名（英文）Clarification of the mechanism for orofacial pain contributes to the development of new treatment

研究代表者

清水 康平（SHIMIZU, Kohei）

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10508609

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）：本研究の結果から、ラット下顎第一臼歯歯髄炎により、三叉神経節第三枝領域におけるマクロファージの集積およびマクロファージにおける IL-1 $\beta$  の産生亢進、三叉神経節ニューロンでの Hsp70-TLR4 シグナル増強による IL-1RI の増加、および IL-1 $\beta$  シグナル増強による舌を支配する TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの増加により、舌痛覚過敏が誘導されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究を推進することは顎顔面領域の慢性疼痛の神経機構解明に対する糸口をつかむことができ、さらには新たな治療方法、治療薬剤の開発にもつなげることができる。また近年、日本の財政圧迫の一因として医療費の過剰問題が挙げられるが、本研究領域を推進し、歯科医学教育の診査・診断法そのものに変革を起し発信することで、患者は不必要な治療や、ドクターショッピングを行うことなく最短期間で症状改善および治癒に至ることとなり、結果それは医療費の抑制効果につながる。本研究テーマを遂行することによる患者貢献および経済的影響は非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hsp70 is expressed in the pulpal tissue following tooth pulp exposure. Hsp70 is axonally transported from the inflamed tooth pulp of the lower first molar to the trigeminal ganglion. The transported Hsp70 is released into the intercellular space in the trigeminal ganglion. The Hsp70 binds to the toll-like receptor 4 of trigeminal ganglion neurons innervating the tongue and promotes IL-1RI expression. Simultaneously, the accumulated macrophages following tooth pulp inflammation generate and release IL-1 $\beta$  in the extracellular space in the trigeminal ganglion. Larger amounts of IL-1 $\beta$  bind to the larger number of IL-1RI of trigeminal ganglion neurons innervating the tongue. The IL-1 $\beta$ /IL-1RI signaling facilitates TRPV1 expression. Enhanced expression of TRPV1 on the tongue-innervating trigeminal ganglion neurons promotes neuronal excitability and results in mechanical and heat hypersensitivity of the tongue.

研究分野：歯内療法学

キーワード：関連痛 歯痛錯誤 歯髄炎 異所性疼痛

### 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床の現場において、経験を積んだ歯科医師でも、少なからず“誤診”“誤治療”を起こしてしまう。その誘因として、確定診断を困難にする“関連痛”や“異所性の感覚異常”の存在が挙げられる。歯髄炎が発症すると、原因歯以外の組織に痛みが生じる「歯痛錯誤」が発現する。その一方で、歯や歯周組織と遠隔に位置する組織の疾患に起因して異所性に歯痛を発現する「非歯原性歯痛」も存在する。これら「歯原性・非歯原性疾患」に起因して発症する“関連痛”や“異所性の感覚異常”の存在は確定診断を困難なものとし、「誤診」や「誤治療」の原因となるため、歯科临床上、大きな問題と言っても過言ではない。しかしながら現在、それらの発症メカニズムには未だ不明な点が多く残されているため、その解明は診断精度の向上や適切な治療に貢献すると考えられ、臨床的意義は大きい。そこで申請者は、歯髄炎に関連した異常疼痛発症メカニズムの解明を目的とし、本研究計画を起案した。

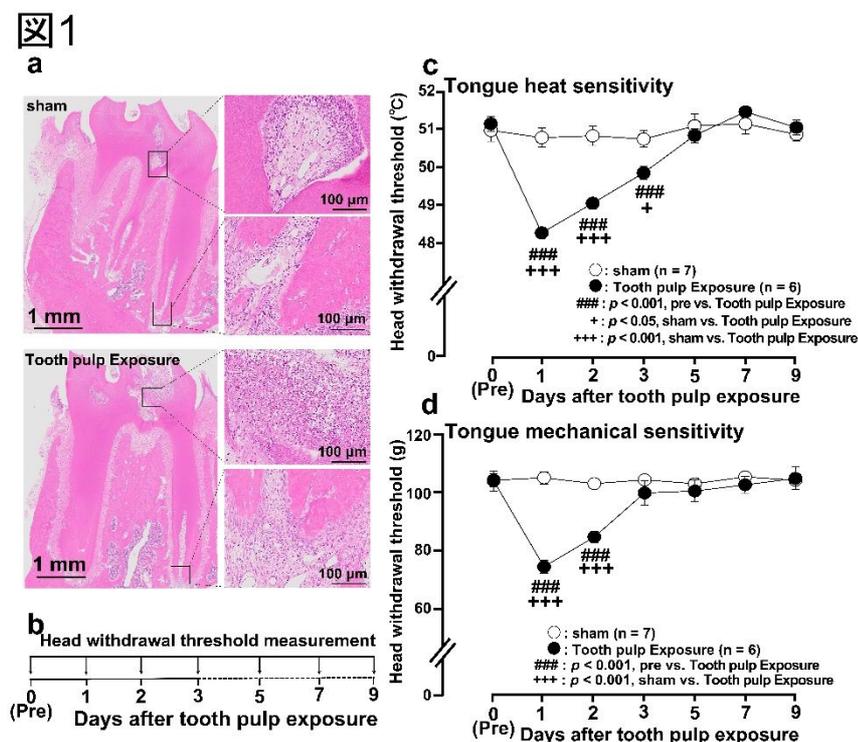
### 2. 研究の目的

口腔顔面痛学会で紹介されている非歯原性歯痛診療ガイドラインは、その発生機序を関連痛、神経障害に起因する疼痛、および中枢における神経伝達物質などの生化学的変化、情報処理過程の変調による疼痛として説明している。申請者も日々の臨床において本ガイドラインを重宝しており、非歯原性歯痛に対する臨床的なアプローチは格段に進歩したと言えるが、すべての口腔顔面痛の予防、対応および完全な治療を遂行するためには十分とは言えない。口腔顔面痛発症のメカニズムの詳細はいまだ不明な部分が多く、“原因不明の口腔顔面痛”に対し、今後新たな検査・診断法を構築し、更には新たな治療法を開発していくには、教育および臨床の両側面から鑑みてもその発症機構のメカニズム解明が不可欠であり、原因究明が必須である。本研究では、申請者の専門領域で特に問題となる歯髄炎発症後の“関連痛”や“異所性の感覚異常”発症メカニズムにフォーカスを絞りを、その解明を目的とし本研究計画を起案した。

### 3. 研究の方法

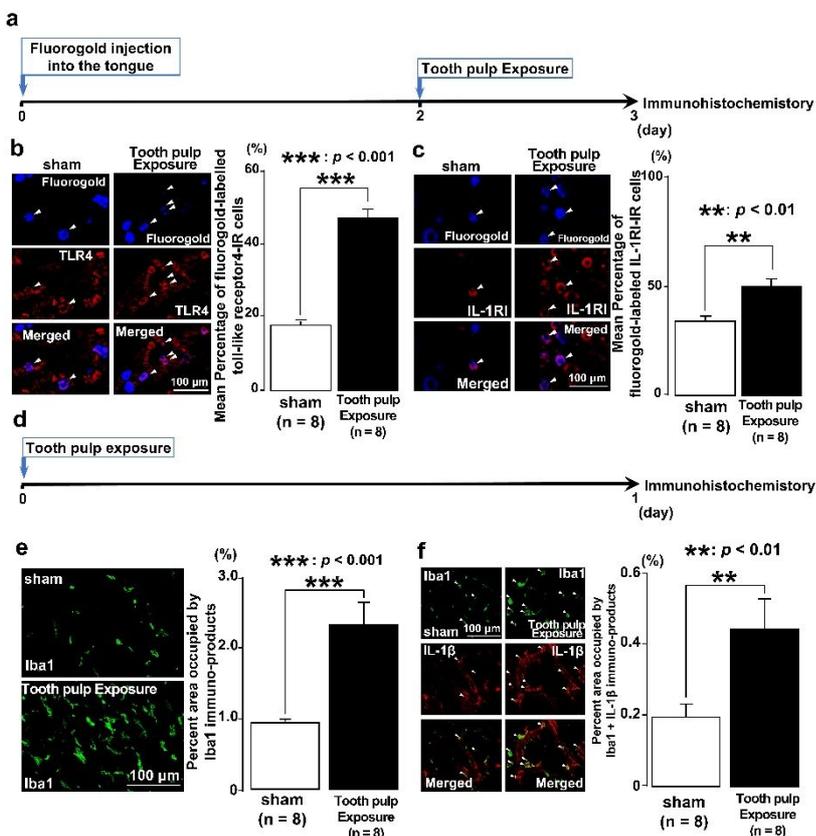
Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを isoflurane (2%) 吸入麻酔による浅麻酔後、生理食塩水に溶解した butorphanol, medetomidine, midazolam (三種混合麻酔薬) の腹腔内注射で麻酔したのち、左側下顎の第一臼歯 (M1) 咬合面のエナメル質と象牙質全体を切削して露髄させることによって歯髄炎モデルラットを作製した。同麻酔を施し、他の介入は行わないラットを sham 群とした。

まず、歯髄に炎症が発生しているかどうか、またそれが舌痛覚過敏を誘導するかどうかを確認するため、露髄群または sham 群の歯髄をヘマトキシリン - エオジン染色にて観察をおこなった。また、浅麻酔下で露髄歯と同側の舌へ熱あるいは機械刺激を与え、頭部引っ込め反射閾値 (HWT) を経日的に測定した。その結果、露髄後 1 日目における M1 では、冠部歯髄に多数の炎症性細胞浸潤が認められたが、根尖部歯髄には認められなかった。露髄歯と同側の舌辺縁部への熱および機械刺激により引き起こされる HWT は、露髄後 1 日目、2 日目、および 3 日目において露髄前 (0 日目) および sham ラットと比較して有意に低下した。一方、sham 群では、舌刺激に対する HWT の有意な変化は認められなかった。これらの結果は、露髄により歯髄炎および舌痛覚過敏が発症することを示している (図 1)。



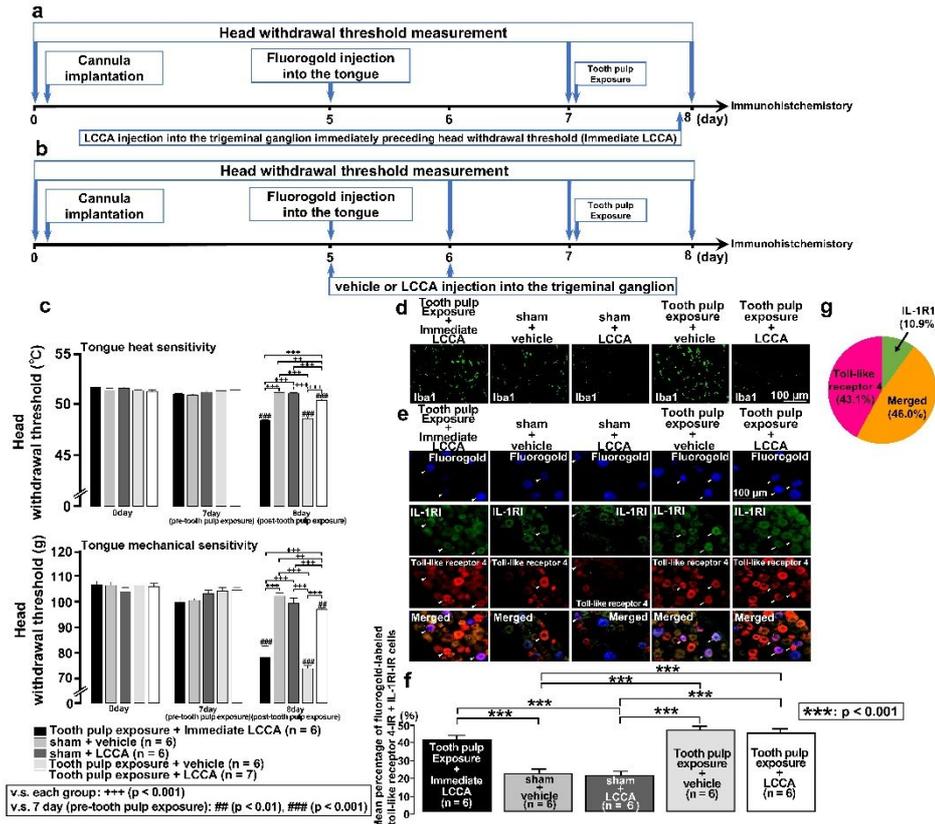
さらに、露髄後の三叉神経節第三枝領域におけるTLR4, IL-1RI, マクロファージ (Iba1), およびIL-1の発現の変化を調べるため、あらかじめ逆行性トレーサー (Fluorogold; FG) を同側舌縁部に投与し、露髄後1日目の三叉神経節第三枝領域におけるFG標識TLR4陽性細胞数, FG標識IL-1RI陽性細胞数およびIL-1陽性マクロファージを解析した。露髄後1日目における, FG標識TLR4陽性細胞数, FG標識IL-1RI陽性細胞数, およびIL-1陽性マクロファージは露髄群において sham 群よりも有意に増加した。この結果は露髄が三叉神経節におけるTLR4およびIL-1RIの発現増加, マクロファージの集積および集積したマクロファージにおけるIL-1の発現増加を引き起こすことを示している(図2)。

図2



次に、集積したマクロファージ, TLR4 およびIL-1RI間の相互作用を解析するために選択的マクロファージ枯渇薬 (LCCA) を三叉神経節に注入しHWTの変化, 三叉神経節におけるIba1, TLR4, およびIL-1RIの発現の変化を, shamまたは露髄の処置を行ったラットを用いて検索した。その結果, M1露髄1日後, LCCA投与により同側舌縁部への機械および熱刺激に対するHWT低下が有意に抑制された。LCCA投与によりFG標識TLR4陽性かつIL-1RI陽性細胞数に変化は認められなかった。これらの結果は、露髄後の三叉神経節におけるマクロファージの集積が、舌の熱または機械痛覚過敏の発症に関与することを示している(図3)。

図3



これらの結果は、露髄後の三叉神経節におけるマクロファージの集積が、舌の熱または機械痛覚過敏の発症に関与することを示している(図3)。

次に、M1 露髄と同時に選択的 TLR4 アンタゴニスト (LPS-RS) を三叉神経節に注入し、露髄 1 日後に HWT の計測、三叉神経節第三枝領域における FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。LPS-RS を投与して M1 露髄 1 日後において、同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT 低下が有意に抑制され、FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数の増加が有意に抑制された。これらの結果は、TLR4 シグナルが IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数の増加をもたらしたことを示している (図 4)。

また、あらかじめ FG を同側舌縁部に投与し、選択的 TLR4 アゴニスト (recombinant Hsp70) を未処置ラットの三叉神経節に注入し、HWT 測定と IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。その結果、recombinant Hsp70 投与 1 日後、同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT が有意に低下し、FG 標識 IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数が有意に増加した。この結果から三叉神経節ニューロンにおいて TLR4 シグナルを介して IL-1RI が増加することが示された。さらに、あらかじめ FG を同側舌縁部に投与し、未処置ラットの三叉神経節に recombinant IL-1 を投与した後、HWT 測定および FG 標識 TRPV1 陽性三叉神経節ニューロン数を免疫組織化学的に解析した。その結果、recombinant IL-1 を TG に投与して 1 日後において同側舌縁部への機械および熱刺激に対する HWT が有意に低下し、FG 標識 TRPV1 陽性ニューロン数が有意に増加した。以上の結果から IL-1 -IL-1RI シグナルが三叉神経節ニューロンでの TRPV1 発現を増強し、舌の熱および機械痛覚過敏を発症する可能性が示された (図 5)。

図 4

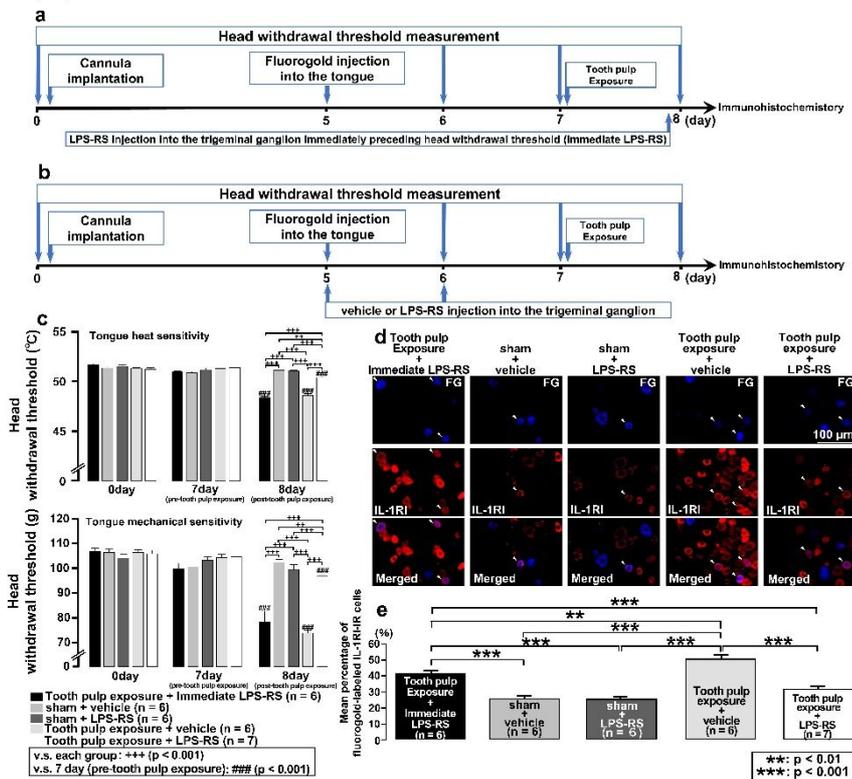
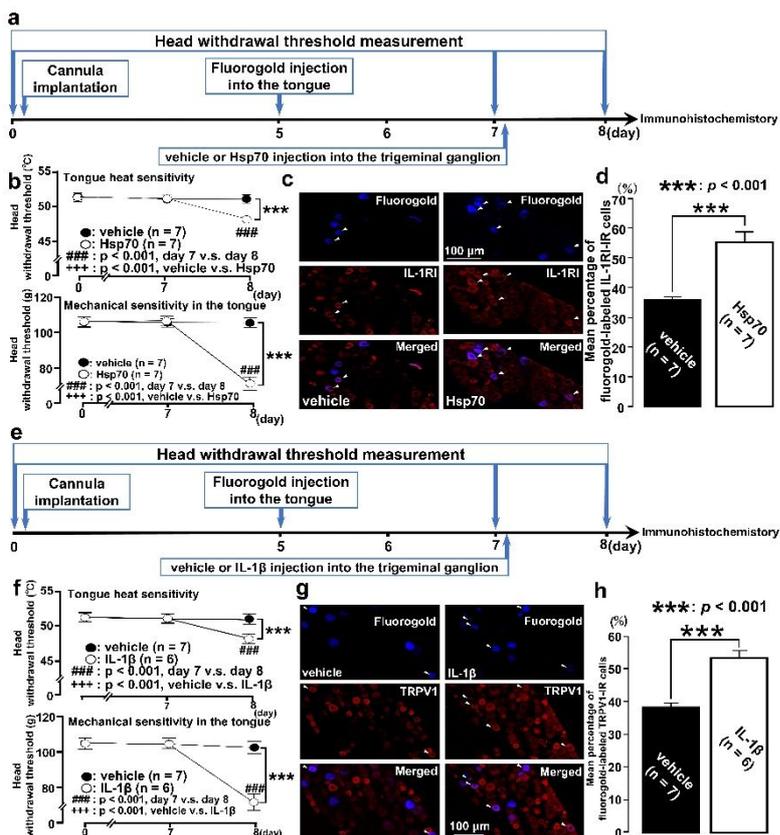
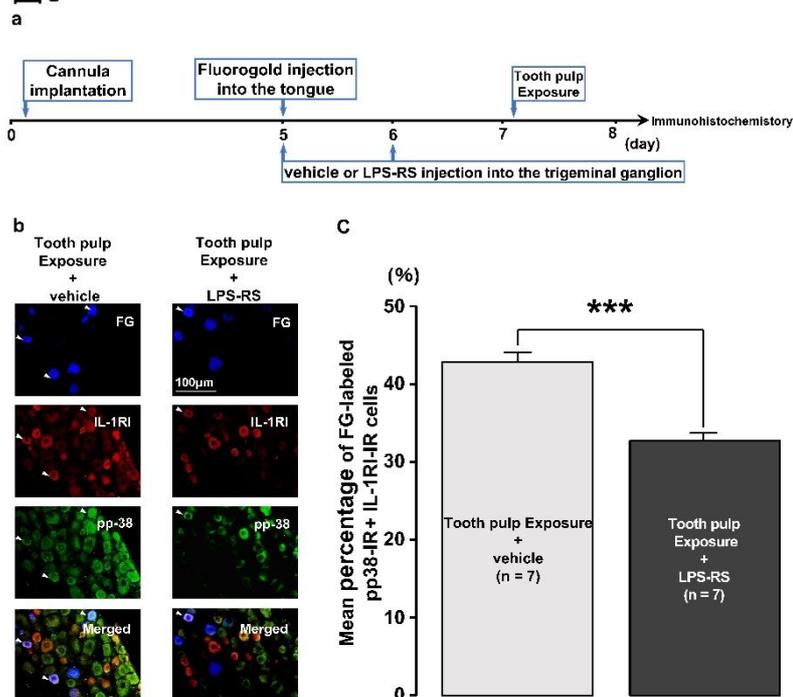


図 5



最後に、M1 露髄と同時に選択的 TLR4 アンタゴニスト (LPS-RS) を三叉神経節に注入し、露髄 1 日後に HWT の計測、三叉神経節第三枝領域における FG 標識リン酸化 p38 陽性かつ IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。LPS-RS を投与して M1 露髄 1 日後において、同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT 低下が有意に抑制され、FG 標識リン酸化 p38 陽性かつ IL-1RI 陽性細胞数の増加が有意に抑制された。これらの結果は、TLR4 シグナルが p38 のリン酸化を介して IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数の増加をもたらす可能性を示している(図 6)。

図 6



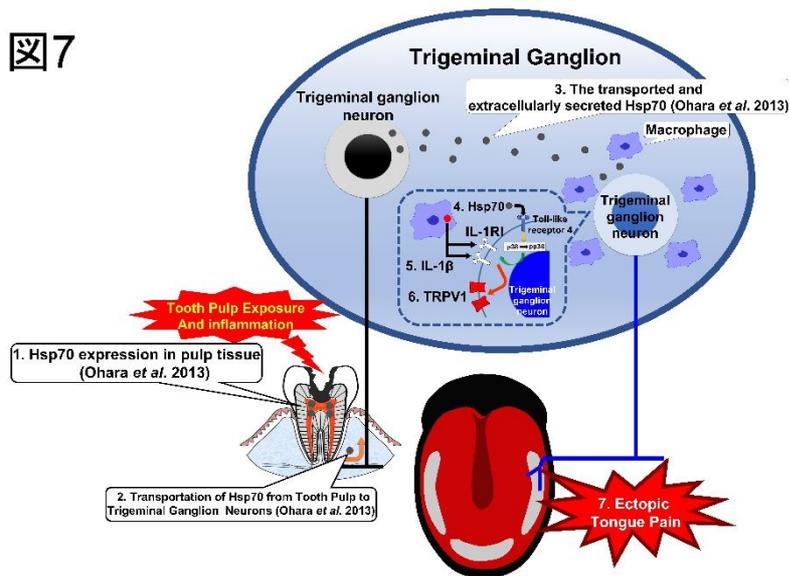
#### 4. 研究成果

本研究の結果から、M1 歯髄炎により、三叉神経節第三枝領域におけるマクロファージの集積およびマクロファージにおける IL-1 の産生亢進、三叉神経節ニューロンでの Hsp70-TLR4 シグナル増強による p38 リン酸化を介した IL-1RI の増加、および IL-1 シグナル増強による舌を支配する TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの増加により、舌痛覚過敏が誘導されることが明らかになった(図 7)。

日本における口腔顔面痛学分野も同様にめざましく発展を遂げ、先述したガイドラインの登場により従来歯科では説明不可能であった原因不明の歯痛および顔面痛の対処法も明らかになりつつある。現在わが国では、神経障害性疼痛、慢性疼痛および心因性関連疾患についての臨床的および基礎的研究が数多くの研究機関で行われており、その病態解明を日々推進している。さらに米国においては、わが国では倫理上あるいは法令上の問題で施行困難な臨床試験を、

それらの成果をもとに積極的に臨床に導入し施行している。このように、世界規模で常に施行されている臨床的あるいは基礎的疼痛研究によって得られた成果は、結果として患者利益に貢献していることが示されている。本研究計画によって得られる成果も同様に、その一翼を担うことを期待している。

図 7



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 1件）

1. 著者名 Kanno Kohei, Shimizu Kohei, Shinoda Masamichi, Hayashi Makoto, Takeichi Osamu, Iwata Koichi	4. 巻 17
2. 論文標題 Role of macrophage-mediated Toll-like receptor 4-interleukin-1R signaling in ectopic tongue pain associated with tooth pulp inflammation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12974-020-01995-y	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菅野浩平、清水康平、岩田幸一、篠田雅路
2. 発表標題 歯髄炎に起因する舌痛覚過敏発症に対する三叉神経節内Macrophage TLR4-IL-1R1シグナル伝達系の関与
3. 学会等名 第25回日本口腔顔面痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 康平
2. 発表標題 象牙質知覚過敏から根管治療後歯痛まで、口腔顔面痛的再考
3. 学会等名 第25回日本口腔顔面痛学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菅野 浩平、清水 康平、小木曾 文内
2. 発表標題 歯髄炎誘導性舌痛覚過敏症に対する三叉神経節内TLR4シグナル伝達へのMacrophageの関与
3. 学会等名 日本歯科保存学会2019年秋期学術大会（151回）
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------