

令和 6 年 6 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17100

研究課題名（和文）Glutamateは口腔感覚の痛みを制御するのか

研究課題名（英文）Can glutamate control pain of oral sensation?

研究代表者

西山 明宏（NISHIAMA, AKIHIRO）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：80550128

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）：口腔内に発生する痛みは、種々の要因が関与していることが報告されている。これらの原因として末梢性や中枢性（中枢感作）、さらには各臓器における受容体や代謝産物が起因するものとして考えられている。基礎研究（in vitro）では口腔内の感覚（痛み）の制御にGlutamateが関与していることを報告してきた。また口腔感覚の制御に末梢血管に存在するCGRP受容体と三叉神経が口腔内の痛みに関連することを学会にて報告した。これは末梢神経と微小血管によるパラクラインまたはオートクラインが痛みを誘発していることとして示唆する結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は口腔感覚、特に末梢神経を含めた微小環境における痛みの制御について研究を進めた。痛みを焦点にした微小血管と末梢神経とのコミュニケーションを確立することで、神経障害性疼痛のような原因が解明されていない末梢での痛みの治療の基盤となることが期待される。末梢の知覚神経を想定した研究であるため、口腔領域に限らず全身の末梢で発症する神経関連の痛みに応用できると考えている。

研究成果の概要（英文）：The pain in the oral region has been reported to be influenced by various factors. These causes are considered to be peripheral or central (central sensitization), as well as receptors and metabolites in various organs. Our basic research (in vitro) has reported that glutamate is involved in the regulation of oral sensation (pain). Additionally, it was reported at a conference that CGRP receptors present in peripheral blood vessels and the trigeminal nerve are related to pain in the oral cavity. This result suggests that paracrine or autocrine mechanisms involving peripheral nerves and microvessels induce pain.

研究分野：神経生理学

キーワード：Glutamate 口腔感覚 三叉神経 TRPチャネル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯はエナメル質、象牙質、セメント質で構成され、内部に三叉神経節(歯髄)ニューロンが分布する歯髄が存在する。象牙質には、象牙細管内容液で満たされる象牙細管が貫いて存在している。象牙細管の歯髄側内部には、自由神経終末と象牙芽細胞突起が進入している。象牙質への様々な刺激は象牙細管内液の静水圧変化を誘発し象牙芽細胞膜を変形させ transient receptor potential (TRP) チャネルを活性化する。その活性化が ATP 放出を誘発することで歯髄ニューロンに ATP を介した神経伝達が生じ象牙質痛が発生する。一方、象牙芽細胞には、グルタミン酸受容体発現も報告されており、その興奮性神経伝達物質である Glutamate が象牙芽細胞間あるいは歯髄ニューロンとの細胞間連情報伝達物質として働いていることも示唆された。これらの報告は、象牙芽細胞間で、Glutamate をメディエーターとする  $Ca^{2+}$  シグナルネットワークが構築されることを示唆している。さらに各種のグルタミン酸受容体が、各臓器に発現しているが、我々の研究では三叉神経節ニューロンに Glutamate がグルタミン酸受容体サブタイプ(代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11) との細胞間連絡の可能性を確認しているが、その先の各受容体の役割についての詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

ヒトの歯の象牙質が露出すると激しい歯痛が発生する(象牙質痛)。象牙質には、象牙細管内容液で満たされる象牙細管が貫いて存在し、象牙細管の歯髄側内部には、自由神経終末と象牙芽細胞突起が進入している。象牙質への様々な刺激は象牙細管内液の静水圧変化を誘発し象牙芽細胞膜上の膜タンパク質を活性化する。我々は、その活性が神経伝達物質である ATP、Glutamate 放出を誘発すること、さらに ATP により象牙質痛が発生することを報告した。一方で Glutamate を介した象牙芽細胞・歯髄ニューロンとの細胞間連絡も報告、また歯髄ニューロンに発現するグルタミン酸受容体を特定しており、次に役割を解明すべく進行中である。本研究は、Glutamate が歯痛変調にどのような経路で関与していくのか生理機能学的に明らかにする事を目的とする。

### 3. 研究の方法

下記の項目に示す三叉神経節細胞に発現するグルタミン酸受容体が生理学的機能を果たしているかを確認。象牙芽細胞への侵害刺激から放出された Glutamate を受容した三叉神経節細胞に存在する代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11 の生理活性が得られるか確認する。

三叉神経節細胞に対してグルタミン酸受容体各アゴニストを用いて生理機能活性を記録する。  $Ca^{2+}$  イメージング法を用いて代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11 に対する各アゴニストを用いて細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を記録し、同定したグルタミン酸受容体の生理活性を確認し、生理活性のあるものを最終的なターゲットとなる受容体とする。

特定のグルタミン酸受容体アンタゴニスト環境下での象牙芽細胞への侵害刺激後に三叉神経節細胞の細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を記録し同定されたグルタミン酸受容体の相関をみる。

象牙芽細胞に対して侵害刺激を加えることで glutamate が放出することが明らかとなっているが、三叉神経節細胞に発現する特定のグルタミン酸受容体がこの glutamate を受容することで同様の挙動を取るか確認する。

研究方法( )の詳細は下記になる。

マウス由来象牙芽細胞系細胞、マウス急性単離三神経節(TG)細胞から fura-2 を用いて細胞内遊離  $Ca^{2+}$  濃度 ( $[Ca^{2+}]_i$ ) 計測を行った。象牙芽細胞と TG 細胞の共培養系(図 1)は、象牙芽細胞に蛍光トレーサー(DiOC18)を取り込ませた後、TG 細胞が培養されているディッシュに播種する事で確立する。象牙質刺激に伴う細胞膜変形は、直接機械刺激を行う事で模倣する。細胞外液を充填した微小ガラス管を、標的細胞の直上(図 2A)から垂直方向へ  $7.5 \mu m$  ( $2.2 \mu m/m$ ) 押すことで直接機械刺激とする(図 B)。標準細胞外液には Krebs 溶液を用いる。

単一象牙芽細胞に膜変形刺激を加えると、刺激された象牙芽細胞のみならず

(stimulated odontoblast) 周囲に存在する象牙芽細胞にも  $[Ca^{2+}]_i$  増加が観察された

(neighboring odontoblasts)(図 3)。細胞外  $Ca^{2+}$  存在下で象牙芽細胞に各グルタミン酸受容体選択的アンタゴニスト(代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11)を機械刺激直前に投与しその応答を記録する。刺激を加えた象牙芽細胞周囲の細胞の応答の増減を記録し発現のみならず生理学的機能しているグルタミン酸受容体を詮索する。

三叉神経節細胞に対して ATP アンタゴニストの有無および代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11 に特異的なアゴニスト・アンタゴニストを還流

し、同様の細胞刺激を確認し、ATP 依存に伴うグルタミン酸受容体の挙動を確認。ATP が痛みの伝達物質であることは報告済みであるが、Glutamate と共闘することでどのような変調をきたすかで、Glutamate の役割の解明につながると考えている。

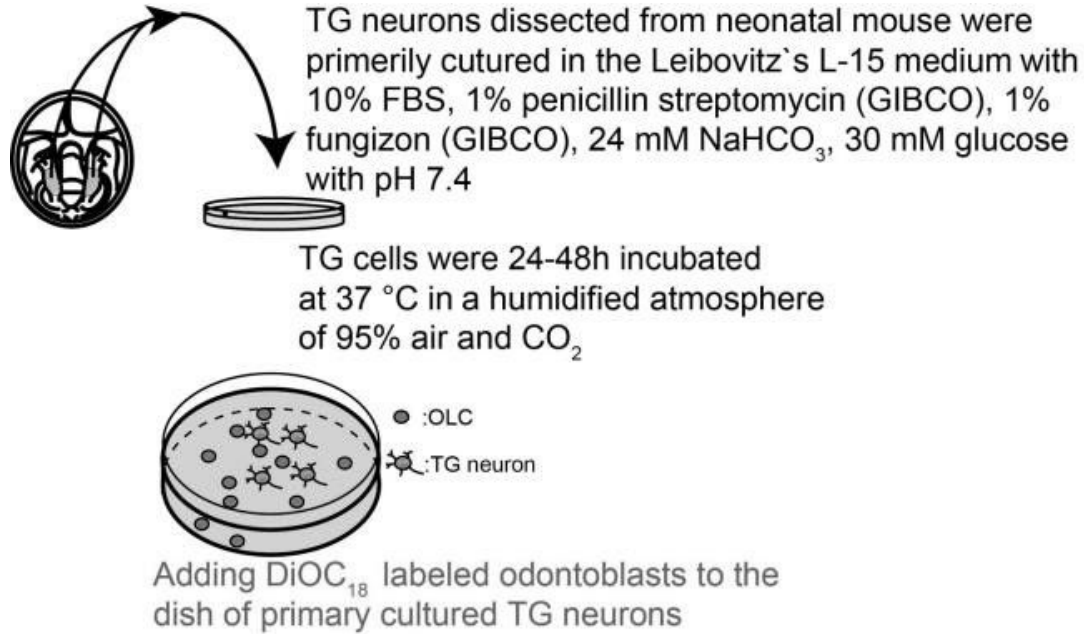


図 1

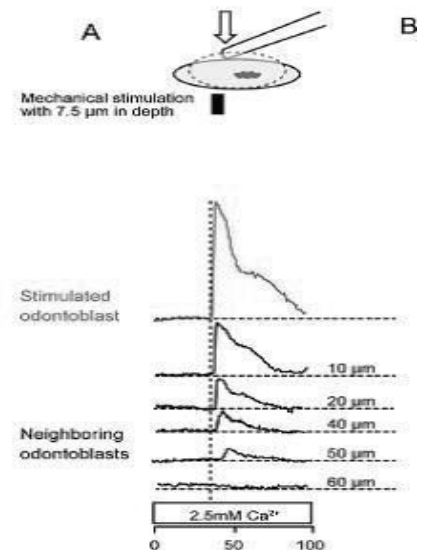
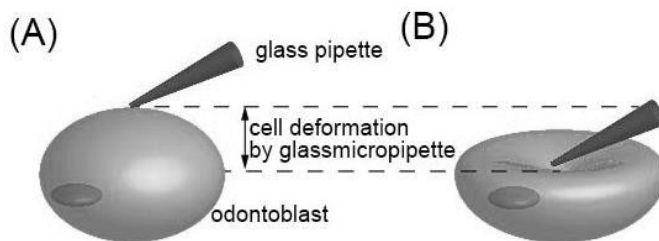


図 2

図 3

#### 4. 研究成果

浸透圧ストレスを加えてでのマウス三叉神経節における代謝型グルタミン酸受容体 4, 9, 11 の PCR で他の代謝型グルタミン酸受容体よりも有意に発現を認めていた。さらにこのマウス三叉神経節細胞(浸透圧ストレスを加えた群、浸透圧ストレスを加えていない群)に対してグルタミン酸刺激後の各種代謝型グルタミン酸受容体の拮抗薬を生理学的に確認比較したところ代謝調節型グルタミン酸 4, 9, 11 に応答を有意にみる事ができた。このことから浸透圧刺激は侵害刺激を模倣していることから、興奮した神経に対して刺激された象牙芽細胞から放出するグルタミン酸に対して示された受容体が優先的にこの伝達物質の取り込みを行っていることが示唆された。しかし今回のコミュニケーションがグルタミン酸を臨床的に考慮したときに、疼痛の制御における痛みの増強なのか、鎮痛なのかはこの研究系では解明には至らなかった。この応答の解明については本研究をオーバーラップして象牙芽細胞、神経組織の微小環境を考慮して血管内皮細胞とのコミュニケーションを確立して、解明を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岩崎 亮、黄地健仁、西山明宏、木村麻記、黒田英孝、澁川義幸、片倉 朗
2. 発表標題 血管内皮細胞のカルシトニン受容体様受容体を介した細胞内cAMP レベルの活性化と軸索反射メカニズム解明への取り組み
3. 学会等名 東京歯科大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩崎 亮、黄地健仁、木村麻記、西山明宏、黒田英孝、澁川義幸、片倉 朗
2. 発表標題 三叉神経節ニューロン - 血管内皮細胞間の機械刺激誘発性CGRP-CALCRL axis 活性化によるcAMP 依存性軸索反射
3. 学会等名 東京歯科大学学会
4. 発表年 2023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
---------	---------