

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861793

研究課題名(和文) 歯髄炎に伴う神経・グリア細胞の相互作用に関する総合的研究

研究課題名(英文) Neuron-immune Interactions in the Sensitized Thalamus Induced by Pulpitis

研究代表者

河村 隼(KAWAMURA, Jun)

東京医科歯科大学・医歯(薬)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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：私達はこれまでに、歯髄炎によってラットの視床におけるニューロンとグリア細胞間に相互作用がみられることを報告したが、その詳細はあまり解析されていない。

本研究では、分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼであるp38MAPKがラットの視床におけるニューロンとグリア細胞間の相互作用に参与していることを示唆した。具体的には、露髄後の72時間までニューロン等に発現するp38MAPKとアストロサイトに発現するGFAPの免疫応答発現が上昇し、また、MAPK 13とMAPK 14のmRNA発現も上昇することを解析した。

研究成果の概要(英文)：We have recently reported that the signal of pulp injury induces both neuronal and glial cell activation in the contralateral thalamus in rats, although the mechanisms of the glial cell/neuronal interaction remain unclear. This study was undertaken to test our hypothesis that p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways are involved in the pulp injury-induced glial cell/neuronal interaction in the thalamus. The area immunopositive to phospho-p38 MAPK increased until 72 hours after pulp exposure in both local anesthetic-pretreated and saline-pretreated animals. The density of glial fibrillary acidic protein-expressing astrocytes showed a significant increase only in the saline-pretreated animals. Expression levels of MAPK 13 and MAPK 14 mRNAs increased at 24 hours and still higher at 72 hours in the saline-pretreated animals.

研究分野：歯内療法学

キーワード：グリア ニューロン 歯痛

1. 研究開始当初の背景

歯の硬組織の切削に伴い歯髄細胞や歯髄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., JNeurosci 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、歯髄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。実験的歯髄炎に伴う中枢神経系内の歯髄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) 歯髄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。

2. 研究の目的

本研究では、臨床において通常の歯科的治療法では完治しない歯髄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「実験的歯髄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歯科基礎医学的研究」と「歯髄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 : 「実験的歯髄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 系ラット等を用いて、マスタードオイル (MO) を歯髄に適用させ実験的歯髄炎を誘発し、以下について検索する。

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 サブユニットの生理学的解析と mRNA 発現動態を解析する。

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解析するために免疫組織化学的手法を用いる。

(2) 臨床歯科医学的研究 : 「歯髄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、広義の歯髄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う。

歯髄疾患の治療前に 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。

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を行う。

4. 研究成果

(1) 薬物投与による歯髄駆動ニューロン (TPDNs) のスパイク応答性の変化
歯髄電気刺激に対してスパイク応答を示した歯髄駆動ニューロンの局在部位を、Paxinos and Watson の “The rat brain in stereotaxic coordinates” を参照しつつ組織学的に同定した結果、いずれも内側視床核群の内側背側 (MD) 核内に記録部位が存在していた。ミネラルオイル (MI) 歯髄適用による TPDNs の応答性は、MI 適用前 15 分間 5 分毎の TPDNs のスパイク応答 (コントロール) と比較し、統計学的に有意な変化がみられなかった (Wilcoxon test)。そこで、MI 群の TPDNs のスパイク応答を基線応答とした。MO による歯髄化学的条件刺激により (MO 群、MO-MK801 群)、TPDNs のスパイク応答性は基線応答と比較し、有意に増大した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。また、MO 群、MO-MK801 群について各測定時点毎の TPDNs スパイク応答を基線応答と比較したところ、MO-MK801 群では、MD 核への MK-801 微小投与により、スパイク応答が有意に減弱した ($P < 0.05$, Mann-Whitney U-test)。

(2) RT-PCR 分析による NMDAR mRNA 発現様式の解析

MO 群では、MO 適用 10 分後において、MO 非適用群と比較して NMDAR-2A および NMDAR-2D の mRNA の発現増強が認められた。MO-MK801 群では、MD 核内 MK-801 微小投与 2 分後 (MO 適用 12 分後) において、MO 群の MO 適用 10 分後と比較して、NMDAR-2A および NMDAR-2D mRNA の発現の減少が認められた。

(3) Real-time PCRによる遺伝子学的解析
ミクログリアの活性化関連遺伝子である
Allograft inflammatory factor 1 (Aif1)、
interferon regulatory factor 5(IRF5)と、
アストロサイトの活性化関連遺伝子である
Signal Transducer and Activator of
Transcription 3(STAT3)、glucose
transporter 1(GLUT1)の定量的 mRNA 発現解
析を行った。

MO 適応 10 分後では、Aif1、IRF5 mRNA の発
現量は、正常群に比べて有意に増加した
($P<0.05$)。また、MO 適応 30 分後では、STAT3、
GLUT1 mRNA の発現量が、正常群に比べて有意
な増加を示した ($P<0.05$)。

(4) 免疫組織学的解析 と Real-time PCR
による遺伝子学的解析

活性化ミクログリアのマーカーの一つであ
る OX6(抗クラス MHC)を用いた免疫組織化
学的解析を行うとともに、グリア細胞活性化
関連遺伝子である Itgam (CD11b)、抗原提示
細胞関連遺伝子である CD86 の定量的 mRNA 発
現解析を行った。

免疫組織学的解析 :72 時間後まで、実験群、
コントロール群ともに、正常群に比べて OX6
陽性ミクログリアの密度は増加した
($P<0.05$)。各観察期間とも、実験群の方が
コントロール群に比べて OX6 陽性ミクログリ
アの密度は有意に大きかった ($P<0.05$)。

遺伝子学的解析 :72 時間後まで、Itgam、
CD86 mRNA の発現量は、実験群、コントロ
ール群ともに、正常群に比べて増加した
($P<0.05$)。各観察期間とも、実験群の方が
コントロール群に比べて Itgam、CD86 mRNA
の発現量は有意に大きかった ($P<0.05$)。

(5) 免疫組織学的解析 と Real-time PCR
による遺伝子学的解析

ラットの視床におけるニューロンとグリア
細胞間の相互作用を、分裂促進因子活性化タ
ンパク質キナーゼである p38MAPK に注目し、
解析を行った。その結果、露髄後の 72 時間
までニューロン等に発現する p38MAPK とアス
トロサイトに発現する GFAP の免疫応答発現
が上昇し、また、MAPK 13 と MAPK 14 の mRNA
発現も上昇することを解析した。

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 1 件)

Tomoatsu Kaneko, Uraiwan
Chokechanachaisakul, Jun Kawamura,
Yusuke Yamanaka, Takafumi Ito, Mitsuhiro
Sunakawa, Hideaki Suda, Takashi Okiji,
Up-regulation of p38 Mitogen-activated
Protein Kinase during Pulp Injury-induced
Glial Cell/Neuronal Interaction in the Rat
Thalamus,

Journal of Endodontics、査読有、
Volume 39, Number 4、2013、488 - 492
DOI : 10.1016/j.joen.2012.11.018

〔学会発表〕(計 4 件)

河村 隼、金子友厚、山中裕介、伊藤崇
史、砂川光宏、興地隆史、須田英明、
実験的歯髄炎はラット視床におけるミク
ログリアを活性化させる、
第 138 回日本歯科保存学会、2013、福岡

Jun Kawamura, Tomoatsu Kaneko, Uraiwan
Chokechanachaisakul, Yusuke Yamanaka,
Takafumi Ito, Mitsuhiro Sunakawa,
Takashi Okiji, Hideaki Suda,
Glial Cell/neuronal Interaction in
Thalamus following Dental Pulp
Inflammation, the 2nd Meeting of the
International Association of Dental
Research-Asia Pacific Region
(IADR-APR)、2013、Bangkok (Thailand)
Jun Kawamura, Tomoatsu Kaneko, Yusuke
Yamanaka, Takafumi Ito, Mitsuhiro
Sunakawa, Takashi Okiji, Hideaki Suda,
Local anesthetic pretreatment
suppresses activation of astrocytes as
antigen presenting cells in the rat
thalamus following dental pulp
inflammation、13th INTERNATIONAL
SYMPOSIUM ON DENDRITIC CELLS、2014、
Tours (France)

河村 隼、金子友厚、砂川光宏、興地隆
史、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 2015 年度秋季学術大会(第 143 回)、
2015、東京

〔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：