

## 論文の内容の要旨

氏名：大原 絹代

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：三叉神経節 TLR4 シグナル伝達が関与する歯髄炎誘導性舌異常疼痛発症の神経機構

歯髄に炎症が引き起こされると歯髄だけでなく口腔顔面領域の離れた場所に痛覚異常が発症することが報告されている。これまでの研究で、三叉神経の損傷や口腔顔面領域の炎症に起因する慢性痛は、口腔顔面領域の感覚のみならず、咀嚼機能あるいは嚥下のような様々な機能にも影響を及ぼすといわれている。ヒトの歯髄炎では、多くの場合、持続的な歯痛が引き起こされるが、歯髄炎によって末梢神経系が感作されると、しばしば口腔内に異所性の痛覚異常が誘導されることが知られている。口腔顔面の感覚異常や痛覚異常は、誤診あるいは誤治療のような臨床的に深刻な問題を引き起こす原因となる場合が多い。このような問題を解決するためには歯髄炎に起因した異所性痛覚異常の発現機序を解明する必要があるが、そのメカニズムは明らかではない。

末梢組織の感染あるいは炎症、微生物による生成物および様々な化学伝達物質による刺激は、一次求心性神経の侵害受容体の活動性を亢進する。末梢神経系における活動性の増強が長時間持続すると、末梢および中枢神経は感作され、結果的に異常疼痛が発症することが知られている。例えば、顎関節に炎症がおこると、顎関節を支配する小型の三叉神経節（TG）細胞から substance P や calcitonin 遺伝子関連ペプチドが放出され、これらの神経ペプチドが顔面皮膚を支配する隣接した TG 細胞の興奮性を増強すると報告されており、TG における細胞間情報伝達が歯髄炎発症後に口腔顔面領域を支配する TG 細胞の活動性亢進に対して重要な役割を担っている可能性を示している。

Toll-like receptor（TLR）は、種々の pathogen-associated molecular pattern（PAMP）に応じてシグナル伝達をスタートさせる膜内外のパターン認識受容体として働くほか、組織傷害や細胞ストレス後に発現する danger-associated molecular pattern（DAMP）を内因性リガンドとして認識する機能も有する。これまでの研究で、脊髄後根神経節（DRG）や TG 内の一次求心性神経細胞に存在する TLR が、神経細胞の興奮性変調に関与することが知られ、特に一次求心性神経細胞で発現する TLR4 および TLR7 は、組織傷害や細胞ストレス後に誘導された PAMP および DAMP を認識し、末梢組織における炎症後の慢性疼痛発症に関与していると考えられている。

一方で、heat shock protein 70（Hsp70）は、TLR の特異的な内因性リガンドとして知られ、また脳や心臓などの組織内でも発現が認められ、組織傷害や炎症に関連した異常疼痛発症に関与するとされている。また Hsp70 は、歯の外傷や歯髄炎により、歯髄内に発現することも報告されている。これらのことから、Hsp70 は歯髄炎後の異常疼痛および口腔顔面領域の異所性異常疼痛の発症に関与している可能性があると考えられる。また、transient receptor potential V1（TRPV1）は capsaicin による化学刺激や 42°C 以上の侵害熱刺激に対する重要なイオンチャネルであり、C 線維の軸索を持つような小径あるいは中径の侵害受容感覚神経に多く存在しているといわれている。また、TG 内の TLR4 が TRPV1 の感作に関与していることが報告され、TLR4 と TRPV1 は重要な機能連関を有すると考えられている。すなわち、歯髄の炎症後に TG 細胞で合成された TLR4 は TRPV1 の合成に関与し、歯髄炎後に発症する口腔顔面領域の異所性異常疼痛に関与している可能性が示唆される。

そこで、本研究では、TG 細胞における Hsp70-TLR4 シグナル伝達を介した TG 細胞間の機能連関が、いかなるメカニズムで歯髄炎に起因した舌痛覚過敏を発症するかを解明することを目的とした。

Sprague-Dawley（SD）系雄性ラットを pentobarbital Na（50 mg/kg, i.p.）で麻酔したのち、左側下顎の第一臼歯（M1）歯髄に complete Freund's adjuvant（CFA）を投与し、歯髄炎モデルラットを作成して研究に用いた。歯髄に炎症が引き起こされ歯髄神経が感作されることによって舌に痛覚過敏が誘発されるが、この神経メカニズムを行動学的、免疫組織化学的、分子生物学的および電気生理学的手法を用いて解析した。歯髄炎を発症した歯と同側の舌へ熱あるいは機械刺激を与えて頭部引っ込み反射閾値（HWT）を測定した。その結果、CFA 群の方が Sham および Vehicle 群と比較して 1 日目から 9 日目まで有意な HWT の低下を示した。舌に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド（FG）を投与したラットでは、TG 内において FG でラベルされた細胞が多数認められたが、FG で標識され TLR4 陽性の TG 細胞は、CFA

群において Sham 群よりも有意に多く検出された。これは、TG 細胞に発現する TLR4 が歯髄炎後誘発される舌異所性疼痛発症に重要な役割を担う受容体の 1 つである可能性を強く示唆するものである。また、TG での Hsp70 陽性細胞は、CFA 群の方が Sham 群および Vehicle 群と比較して有意に多く認められた。歯髄炎が発症すると、TG 細胞に発現した Hsp70 が舌を支配している TG 細胞に存在する TLR4 と結合し、TG 細胞の興奮性増強を誘導すると考えられる。これまでの報告および本研究結果から考察すると、歯髄炎が発症した後に発現する Hsp70 には、局在の違いから以下に示す 2 つの機能があると考えられる。一つは、歯髄内の神経および細胞保護的作用を有し、シャペロンタンパク質として恒常性維持の役割を担っている。もう一つは、TG に発現する Hsp70 は、末梢神経の興奮異常あるいは危険信号を脳に伝達し、TLR4 の内因性リガンドとして働くことで免疫調節的な役割を担っていると考えられる。

FG とは異なる逆行性トレーサーである DiI を M1 歯髄に投与し、舌には FG を投与したラットにおいて、両方のトレーサーで標識された TG 細胞は、全標識細胞中 9.2% であった。また、これまでに我々は、TG 細胞の約 6% は複数の歯髄を支配していることも報告した。このことから、少数の TG 細胞は M1 歯髄と舌を二重支配しており、この解剖学的特徴もまた M1 歯髄炎に伴う舌の異所性疼痛異常発症の一因を担っていると考えられる。さらに、舌に投与した FG と歯髄に投与した Alexa-labeled Hsp70 の両方によってラベルされた TG 細胞は、全標識細胞中 15.4% であった。以上の結果から、Hsp70 は歯髄炎がおこると歯髄内に発現し、軸索輸送で TG 細胞に運ばれ、M1 歯髄を支配している TG 細胞から放出される。その後、Hsp70 は舌を支配している TG 細胞に発現している TLR4 と結合し、舌を支配している TG 細胞の神経活動増強を誘導し、舌の異所性異常疼痛発症を引き起こしている可能性が考えられる。

Naive ラットの歯髄に Hsp70 あるいは LPS を投与し 3 日経過したラットにおいて舌の機械および熱刺激に対する HWT の閾値を測定した結果、HWT は Hsp70 および LPS 投与群どちらのラットも Vehicle 群と比較して有意に小さな値を示した。TG 内に TLR4 の拮抗薬である LPS-RS を 3 日間連続投与した結果、LPS-RS 投与群では Vehicle 投与群と比較して機械および熱刺激に対する HWT の低下が有意に抑制された。電気生理学的検索により、舌を支配する TG 細胞の侵害性機械応答は、Sham 群と比較して CFA 群において有意な増強が認められた。歯髄および TG の Hsp70 mRNA 発現を検索したところ、CFA 群と Sham 群間ではその発現量に有意差は認められなかった。

さらに、本研究では舌の感覚神経における TRPV1 発現の増加が痛覚過敏の発症に関与するかどうかを解明するため、舌に FG を投与し、TG 細胞における TRPV1 発現を CFA 群および Sham 群において免疫組織化学的に検討した。その結果、舌を支配する小型の TG 細胞において、Sham 群よりも CFA 群において有意に多くの TRPV1 陽性細胞を認めた。この結果から、歯髄に炎症がおこると、舌を支配する TG 細胞において TRPV1 の合成が進むことが明らかになった。

本研究結果から以下に示したメカニズムが推察される。

1. 歯髄に炎症が引き起こされると炎症を起こした歯髄内で Hsp70 の産生が亢進する。
2. 歯髄において産生された Hsp70 は炎症歯髄を支配する TG 細胞へ軸索輸送される。
3. 運ばれた Hsp70 はさらに TG 細胞から細胞外に放出される。
4. TG 細胞から放出された Hsp70 は舌を支配する TG 細胞に発現した TLR4 に結合する。
5. Hsp70 が TLR4 に結合することによって、TG 細胞内における TRPV1 の合成が亢進する。

以上から、歯髄炎発症後、Hsp70 は歯髄組織に発現し、TG 細胞体に軸索輸送される。その後、輸送された Hsp70 は歯髄を支配している TG 細胞体から細胞外分泌され、舌を支配している TG 細胞の TLR4 と結合し、舌を支配している TG 細胞の興奮性が増強される。また、M1 歯髄および舌を二重支配する TG 細胞の存在により、歯髄炎による TG 細胞の興奮性増強とともに同細胞が二重支配している舌の痛覚異常発現にも関与すると考えられる。これら 2 つのメカニズムが、歯髄炎後の舌の異所性異常疼痛発症機構の一部を担っていると推論される。