

**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**

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

大原 絹代

(指導: 小木曾文内教授, 岩田幸一教授, 清水康平助教)

目次

概要	p.3-4
諸言	p.5-6
材料および方法	p.7-12
成績	p.13-15
考察	p.16-19
結論	p.20
謝辞	p.21
引用文献	p.22-23

基幹論文

Ohara K et al. J Neuroinflammation 2013, 10 : 139

概要

本研究は歯髄炎に起因した舌の異所性異常疼痛発症に対して、三叉神経節 (TG) 細胞に発現する TLR4 シグナル伝達がいかなるメカニズムで関与するかを明らかにすることを目的とした。

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導されるが、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。Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、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製して研究に用いた。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め反射閾値 (HWT) を測定した。その結果、CFA 群の方が Sham および Vehicle 群に比較して 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 toll-like receptor 4 (TLR4) 陽性の TG 細胞は、CFA 群の方で Sham 群よりも有意に多く検出された。TG での heat shock protein 70 (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。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、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。さらに、Naive ラットの歯髄に Hsp70 あるいは lipopolysaccharide (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 群および LPS 群どちらのラットも Saline 群に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 群では Saline 群に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 群に比較して 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 発現を観察したところ、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 transient receptor potential V1 (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 発現を歯髄炎モデル群および 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 群よりも歯髄炎モデル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、歯髄に炎症が発現すると、舌を支配する TG 細胞において TRPV1 の合成が亢進する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歯髄内で Hsp70 の産生が亢進する。
2. 歯髄内で産生された Hsp70 は炎症歯髄を支配する TG 細胞へ軸索輸送される。
3. 輸送された 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 と結合する。
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、TG 細胞における Hsp70-TLR4 シグナル伝達は、歯髄炎に起因した舌の異所性痛覚過敏発症に対して重要な役割を担っていると示唆される。

諸言

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[1]。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報告されている[2]。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[3]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[4]。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[5]。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[6]。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[7]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[8]。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[9], 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[10]。

Heat shock protein (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[11-13]。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[14]。

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。一方, 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[15]。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ており, TLR4 と TRPV1 は重要な機能連関を有すると考えられている[16]。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考えられる。

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。

材料および方法

1. 実験動物

本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得、また動物の処置は国立衛生研究所および国際疼痛学会のガイドラインに従って行った[17]。

実験には、体重 250 g から 350 g の SD 系雄性ラットを用いた。動物は 12 時間の明暗サイクルの環境下、恒温室（23°C）で食物および水分摂取を制限することなく飼育した。

2. 歯髄への CFA 投与

ラットを 2% isoflurane (Mylan) で浅麻酔後、pentobarbital Na (50 mg/kg) を腹腔内投与し深麻酔を行った。その後、ラットを恒温マット（37°C）に乗せ仰臥位に保持し、ラットの上下顎を慎重に開口し、注水下で円形の炭化タングステンカーバイドバーを用いて低速の歯科用ドリルにて下顎左側第 1 臼歯 (M1) を露髄させた。デンタルペーパーポイントの先端（直径 0.15 mm, 長さ 1.5 mm）を complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma-Aldrich) あるいは control として溶媒 (Vehicle) に浸漬し、露髄した M1 に CFA あるいは Vehicle を投与した。その後、窩洞は歯科用セメント (Fuji I) にて封鎖した。なお、象牙質まで切削し、セメント封鎖したものを Sham とした。

3. 機械あるいは熱刺激により誘発される頭部引っ込め反射閾値 (HWT) の測定

歯髄に CFA を投与して 3 日後、ラットを 2% isoflurane で浅麻酔し、歯髄炎を引き起こした歯と同側の舌辺縁（舌の先端から後方 3 mm）に機械あるいは熱刺激を与え、HWT を測定した。HWT を正確に測定するためにエナメルコーティングされたステンレススチール製双極電極（電極間距離：5-6 mm）を頭板状筋に挿入して頭板状筋活動 (EMG) 記録を行い、EMG の誘発閾値を計測した。

下顎をプラスチック紐にて緩やかに開口後、機械刺激用ピンセット（4 mm² square; Panlab s.l.）を用いて、浅麻酔下のラット（各群 n = 7）の舌辺縁に機械刺激（0-130 g, 10 g/sec, cut off : 130 g）を加えた。機械刺激は 10 g/s の刺激速度で、0 g から閾値まで手動にて連続的に与えた。また、熱刺激プローブ（9 mm² square; Intercross）を用いて、ラット（各群 n = 7）の舌辺縁に熱刺激を与えた（35-60°C, 1°C/sec, cut off : 60°C）。その後、舌の機械あるいは熱刺激による EMG 活動を誘発する HWT を測定した。機械および熱刺激は、それぞれ 5 分間隔で 3 回行い、その平均値を HWT として算出した。舌への機械あるいは熱刺激に対する HWT を測定する場合、まず歯髄処置前に HWT のベースラインを算出し、歯髄処置後 1, 3, 5, 7, 9, 11, 14, 21 および 28 日の HWT を経日的に測定した。

4. フルオロゴールド（FG）トレーサーを用いた TG 細胞標識および TLR4 の免疫組織化学的解析

生理食塩水で溶解した 10%FG（Wako）5.0 μ l を注射針（30 G）を用いて、2% isoflurane で麻酔したラットの舌辺縁部に注入した。FG 投与後 4 日目にラットを 2% isoflurane で浅麻酔、さらに pentobarbital Na（50 mg/kg, i.p.）で深麻酔後、M1 歯髄へ CFA あるいは Vehicle を投与した。CFA あるいは Vehicle 投与 3 日後にラットを 0.9%生理食塩液にて脱血し、次いで 0.01 M phosphate buffered saline (PBS) にて希釈した 4% paraformaldehyde（PFA）溶液を用いて灌流固定を行った（各群 n = 5）。Sham, Vehicle あるいは CFA による歯髄刺激側の TG を環流後に摘出し、4%PFA にて後固定を行った。標本を、さらに 20% スクロースに数日間浸漬した後に Tissue Tek (Sakura Finetek) で包埋後冷凍保存を行い、-20°C で凍結標本を作製した。TG 切片標本は、矢状断面にて 10 μ m の厚さで作製した。8 切片ごとに 1 切片を取り、MAS-GP マイクロスライドガラス（Matsunami）に貼り付けて室温で一晩乾燥させた後、TLR4 の免疫組織化学的解析を行った。

Rabbit anti-TLR4 polyclonal antibody (abcam) を 0.3% Triton X 100 / 4% NGS-PBS に 1 : 800 の濃度で希釈したものを一次抗体とし、切片標本を 4℃にて 3 日間インキュベートした。0.01 M PBS で洗浄後、Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG (1 : 200 in 0.01 M PBS; Invitrogen) に室温で 2 時間インキュベートした。0.01 M PBS で洗浄後、mounting medium (Thermo Fisher Scientific) で封入し、BZ-9000 system (Keyence) にて解析を行った。各ラットの TG において V3 領域の TLR4 陽性 (TLR4-IR) 細胞数を SensitiveMeasure (Mitani) を用いて計測した (各群 n = 5)。全 FG 陽性細胞のうち、TLR4 および FG 陽性細胞の比率を算出し、比較検討を行った。また、1 次抗体を使用していない negative control の標本では染色は確認されなかった。

5. Hsp70 の免疫組織化学的解析

一次抗体として anti-Hsp70 polyclonal antibody (1 : 200 ; abcam) を用い、歯髄炎後における TG 内での Hsp70 の発現を TLR4 の免疫組織化学的解析と同様の方法で検討した。各ラットの TG において V3 領域の Hsp70 陽性 (Hsp70-IR) 細胞数の計測を行った (各群 n = 5)。全 TG 細胞数のうちの Hsp70-IR 細胞数の割合を算出し、比較検討を行った。

6. 組み換え型 Hsp70 の蛍光標識

Hsp70 の蛍光標識化は Alexa Fluor 594 microscale protein labeling kit (Molecular Probes) を用いて行った。Hsp70 50 µg を重炭酸ナトリウム 5 µl と混合し、十分量をピペット採取後、さらに Alexa Fluor 594 溶液 2.6 µl と混合し、室温で 15 分培養して行った。その後、遠心分離して混合生成物から未反応物を除去して濾液を回収後、濃度計測および分注し、-80℃に冷凍保存した。

7. 歯髄および舌への FG, Dil および Alexa-labeled Hsp70 の投与

ラットを pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) で深麻酔後、舌への FG、および歯髄への DiI (Invitrogen) あるいは蛍光標識した Hsp70 の投与を行った。生理食塩水に溶解した 10% FG 5.0 μ l を同側舌辺縁に投与した後 4 日目に、100%エタノールにて溶解した DiI あるいは蛍光標識した Hsp70 をペーパーポイントにて M1 に投与した。その後、3 日目に、ラットを深麻酔下にて環流固定後、TG を摘出して通法に従い切片標本を作製した。TG における FG, DiI および蛍光標識した Hsp70 標識細胞の発現を蛍光顕微鏡にて解析後、比率を算出した。

8. M1 への Hsp70 あるいは LPS 投与

ラットを pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) で深麻酔後、M1 に CFA 処置と同様の方法にて、Hsp70 あるいは TLR4 の他のリガンドである LPS を投与した。投与後 3 日に、機械および熱刺激に対する HWT を測定した。また、Vehicle として生理食塩水を用いた群を control 群とし、同様の方法で HWT を測定した。

9. TG への TLR4 アンタゴニスト投与

ラットを pentobarbital Na (50 mg/ Kg, i.p.) にて麻酔後、TG の V1/V2 および V3 上の頭蓋骨に小穴 (直径 1 mm) を付与した。その後、Katagiri et al. の方法[18]に従ってガイドカニューレを頭蓋骨表面から 9 mm 下方に挿入し、カニューレの先端が TG の表面にて接する状態に設置した。小穴周辺の骨面にステンレススチール製スクリューを 3 ヲ所挿入し、歯科用レジンにて固定した。その後、M1 に CFA を投与し、Vehicle (生理食塩水 : 0.5 μ l) あるいは TLR4 のアンタゴニストである LPS-RS (0.1 mM 0.5 μ l/day; Invivo Gen) をガイドカニューレより 3 日間連続投与した後に、HWT の計測を行った (各群 n = 5)。LPS-RS あるいは Vehicle 投与の影響を検索するため、歯髄炎を発症していない Naive でも同様の手順で計測を行った (各群 n = 5)。

10. TG 細胞からの単一神経活動記録

M1 への CFA 投与あるいは Sham 処置後 3 日目に pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔後, isoflurane による吸入麻酔および薬物の静脈内投与を行うため, 気管カニューレを挿管し, 大腿静脈には静脈カテーテルを挿入した。TG 上部の脳組織を除去した後, TG 表面を露出させ, エナメルコーティングされた電極を TG に挿入し, 単一神経細胞活動を導出した。記録中は, ラットに筋弛緩剤である pancuronium bromide (0.6 mg/kg/h, i.v. Schering-Plough) を投与し動物を非動化した。また, 呼気 CO₂ 濃度を 3.5~4.5% に, また体温を温毛布 (Nihon koden) にて 37°C に保持した。刺激としてキャメルブラシによるブラシ刺激およびクリップによる圧刺激を行った。神経細胞活動を検出した後, ブラシ, ピンセットの先端を用いた圧刺激あるいは小さなクリップ (50 g) を用いたピンチ刺激を 5 秒間受容野に加えた。神経細胞の自発放電はブラシまたは圧刺激前に 1 分間記録した。

11. Real-Time PCR

試料は, 歯髄と TG から採取した。全 RNA は, RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いて精製した。全 RNA のうち 1 µg について, 通法に従い Superscript III 逆転写酵素 (Life Technologies) を用いて第 1 鎖 cDNA 合成を行った[19]。その後, SYBR green (TaKaRa) および LightCycler® Nano (Roche) を用いて Hsp70 (Gen Bank Acc. NM031971.2) および GAPDH (Gen Bank Acc. NM017008.4) のリアルタイム PCR 法を行った。なお, プライマーとして, TaKaRa 製を用いた。

12. TRPV1 発現の免疫組織化学的解析

ラットを pentobarbital Na (50 mg/kg, i.p.) にて麻酔し, 舌に FG を投与し 3 日後に通法に従って灌流し TG を取り出し切片を作製した。一次抗体として anti-gunia pig (1 : 1000 ;

abcam) を用い、歯髄炎発症後の TG 内での TRPV1 の発現を Hsp70 と同様に免疫組織化学的に解析した。各ラットの TG において V3 領域の TRPV1 陽性 (TRPV1-IR) 細胞数の計測を行った (各群 n = 5)。全 TG 陽性細胞数のうちの TLR4 および TRPV1-IR 細胞数の割合を算出し、それぞれの刺激群間にて比較検討を行った。

1 3. 統計学的分析

データは、平均値 \pm SEM として示した。統計学的分析は Student's t-test または一元あるいは二元配置分散分析法を用い、多重比較検定には Bonferroni 法を用いて有意水準 5% の条件で統計学的分析を行った。

成績

1. 舌の機械および熱刺激に対する HWT

歯髄炎側と同側の舌辺縁部への機械および熱刺激に対する HWT は, Sham 群および Vehicle 群と比較して CFA 群において 1 日目から 9 日目で有意な低下を示した (機械刺激: $p < 0.001$, 熱刺激: $p < 0.001$, 各群 $n = 7$) (Fig. 1A: 機械刺激, B: 熱刺激)。Vehicle 群においても, 1 から 9 日目で Sham 群に比較して機械刺激に対する有意な閾値の低下が認められた ($p < 0.001$)。熱刺激に対しては, 3 日目と 7 日目に Sham 群に比較して Vehicle 群の方が, 有意に低い閾値を示した ($p < 0.001$)。

2. TG 細胞における TLR4 発現

M1 への CFA 処置後に, 舌を支配している TG 細胞で TLR4-IR 細胞の発現量の変化を検索するため, FG を舌に, CFA を M1 に投与して TG 細胞の検索を行った。M1 へ CFA 処置をした群では, 多くの TG 細胞が TLR4-IR を示していた。そのうちいくつかのものは舌へ投与した FG に標識されていた (Fig. 2A)。本研究では V3 領域に注目し, FG に標識されかつ TLR4-IR の TG 細胞数を算出した (Fig. 2B 矢印)。FG に標識され, かつ TLR4-IR を示した TG 細胞数は, Sham 群および Vehicle 群と比較して CFA 群において有意に高い値が認められた (各群 $n = 5$, Fig. 2C)。

3. M1 歯髄炎後の Hsp70 発現

Hsp70-IR 細胞は, Sham 群および Vehicle 群において少数の発現が認められる一方で, CFA 群では有意に多く発現していた (Fig. 3A, B および C)。また, Hsp70-IR 細胞数は, Sham 群および Vehicle 群に比較して CFA 群において有意に大きな値が認められた (各群 $n = 5$, Fig. 3D)。

4. 歯髄および舌への FG, DiI および Alexa-labeled Hsp70 投与の効果

舌および M1 にそれぞれ FG および DiI を投与し、舌あるいは M1 を支配する TG 細胞を標識した (Fig. 3E, F, G および H)。その結果, TG 細胞の 9.2% ($n = 5$) は, 舌および M1 を二重支配していることが明らかになった (Fig. 3H)。

著者はさらに, 舌に FG を, M1 に Alexa-labeled Hsp70 をそれぞれ投与したラットにおいて, TG 内での FG あるいは Alexa-labeled Hsp70 でラベルされた TG 細胞を観察し, 個数を計測した (Fig. 3I, J, K および L)。FG 陽性 TG 細胞の 15.4% ($n = 5$) で, Alexa-labeled Hsp70 がラベルされていた (Fig. 3L)。この結果から, Alexa-labeled Hsp70 は M1 から TG 細胞へ軸索輸送された後に細胞外に放出され, 舌を支配している TG 細胞に取り込まれた可能性が考えられた。

5. HWT における TG への Hsp70 および LPS 投与の効果

Naive ラットにおいて, M1 への Alexa-labeled Hsp70 処置後 3 日で, 舌への機械および熱刺激に対する HWT は, Vehicle 群と比較して有意に低下した ($p < 0.01$, 各群 $n = 5$, Fig. 4A および B)。また, M1 への LPS 処置後 3 日で, 舌の機械および熱刺激に対する HWT は, Vehicle 群と比較して投与群の方が有意に低下した ($p < 0.01$, 各群 $n = 5$, Fig. 4C および D)。

6. HWT に対する TG への LPS-RS 投与効果

M1 に CFA を投与した群において, TG へ LPS-RS を 3 日間連続投与 ($0.5 \mu\text{l} / \text{day}$) すると control 群と比較して, 舌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 ($p < 0.001$, 各群 $n = 5$, Fig. 4E および F)。

6. TG 細胞の神経活動

M1 歯髄に炎症を発症させた後、舌を支配している TG 細胞の活動性変化を観察するため、舌を支配している単一神経細胞活動を CFA 群および Sham 群において電気生理学的に検討した。舌を支配している侵害受容性 TG 細胞全 26 個の活動について解析を行った。その結果、TG 細胞は表在性の受容野を有する細胞 (Sham : n = 9, CFA : n = 10) と深部の受容野を有する細胞 (Sham : n = 9, CFA : n = 8) に分類された。CFA 群の表在性および深部に受容野を有する神経細胞における自発放電に変化は認められなかった (Fig. 5A および B)。一方、表在性に受容野を有する神経細胞では Sham 群に比較して CFA 群の侵害的機械に対する応答の亢進を認めた (Fig. 5 C および D)。

7. Hsp70 mRNA 発現

RT-PCR を用いて、M1 に CFA 投与後の M1 歯髄および同側 TG における Hsp70 mRNA の発現変化を検索した (Fig. 6)。CFA 群と Sham 群間での M1 歯髄および同側 TG における Hsp70 mRNA の有意な変化は認められなかった。

8. 舌感覚入力を受ける三叉神経節細胞における TRPV1 および TLR4 発現

M1 に CFA 投与後、舌の外側部への FG 注入により標識された TG 細胞において TRPV1 および TLR4 発現について解析を行った結果、CFA 群において、FG で標識された TG 細胞を比較すると、CFA 群の方が Sham 群よりも有意に多くの TG 細胞が TRPV1 および TRPV1 + TLR4 陽性を示した (Fig. 7)。

考察

本研究では歯髄炎が発症した後、舌を支配する TG 細胞で TLR4 発現が亢進し、さらに舌を支配する TG 細胞の過興奮性が誘導されて TRPV1 の合成が進み、結果的に舌の異所性疼痛異常が発症することが示された。歯髄炎による舌の異所性疼痛異常の発現機構を検索するため、HWT の測定および TG 細胞における Hsp70, TLR4 および TRPV1 発現を免疫組織化学的に解析した。CFA 投与後、舌の機械および熱刺激に対する HWT の閾値が有意に低下し、TG における TLR4 および Hsp70 の発現が増加していることが認められた。さらに、舌を支配している TG における侵害受容細胞の興奮性増強が誘導されていることが確認された。また、Alexa-labeled Hsp70 が M1 から TG 細胞へ軸索輸送され、少数ではあるが M1 および舌を支配している TG 細胞に発現したことが確認された。さらに、M1 への Hsp70 および LPS 投与により、HWT が低下し、TG への LPS-RS 投与により HWT の低下が抑制された。

1. TG 細胞への TLR4 発現

これまでの研究で、脊髄の後根神経節細胞で発現する TLR は、神経の興奮性変調に関与しており、組織損傷や炎症下で発現した内因子リガンドに反応すると報告されている [16, 20, 21]。TLR が関与するシグナル伝達は異常疼痛発症の誘因となり、TLR4 シグナル伝達を阻害することにより、痛覚過敏が抑制されることがわかっている [10, 21]。一方で、下唇への CFA 投与により TG 細胞間の相互作用を介して上唇を支配している TG 細胞の興奮性が増強したとの報告もあり [22-24]、TG 内の細胞間機能連関が異所性の疼痛異常の発症に対して重要な役割を果たす可能性が考えられる。本研究では、歯髄炎発症後に舌への機械および熱刺激に対する侵害受容反射が有意に増強し、Vehicle 群と比較して舌を支配している TG の TLR4-IR 細胞の発現数が有意に増加していることが認められた。この結果は TG 細

胞に発現する TLR4 が歯髄炎後誘導される舌異所性異常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。

2. TG 細胞における TLR4 リガンド

LPS と Hsp70 は、TLR4 の特異的なリガンドとして知られており、これらの分子は神経細胞に発現する TLR4 と結合し、神経の興奮性を増強する [13, 21]。また、Hsp70 は細胞内に局在し、熱ショック因子と結合する。細胞に過度のストレスが加わると変性タンパクの蓄積が起こり、熱ショック因子から Hsp が解離し、結果として Hsp がターゲットとなる変性タンパク質と結合する [25]。一方、LPS はグラム陰性菌の細胞壁構成成分であり、TLR4 の外因性リガンドとして知られている。本研究では、M1 に CFA を投与して歯髄炎を引き起こすと、対象とした舌を支配する TG 細胞において、TLR4 および Hsp70 の発現増加が確認された。Hsp70 は、炎症性組織に発現する内因性リガンドの 1 つであり、TLR4 の特異的なリガンドとしても作用する [9, 25, 26]。Naive のラットを用いた実験で、Hsp70 や LPS を TG 内へ投与すると機械および熱痛覚過敏が誘導された。また、歯髄炎が発症すると、舌への機械および熱刺激に対する HWT の閾値が低下するが、この閾値の低下は TG への LPS-RS 投与によって有意に抑制された。さらに、本研究では、Sham 群と比較して CFA 群において、舌を支配している侵害受容性 TG 細胞の有意な興奮性増強を観察した。これらの結果より、M1 に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。

3. 歯髄から TG 細胞への Hsp70 の軸索輸送

Hsp70 は、組織に炎症が引き起こされると末梢組織だけでなく神経節細胞にも発現する [27]。本研究において、Hsp70 は歯髄炎により M1 歯髄に発現し、M1 歯髄から TG 細胞へ軸索輸送によって運ばれる、あるいは歯髄炎後に TG 細胞において発現する可能性が考えられた。歯髄内投与に存在する Hsp70 が TG 細胞に軸索輸送される可能性を確認するため、Naive ラットの M1 歯髄に Alexa-labeled Hsp70 を投与し、TG 細胞で標識された Hsp70 の解析を行った。その結果、Hsp70 を歯髄に投与すると、3 日目には TG において Alexa-labeled Hsp70 でラベルされた細胞が多く認められた。そのうちの 15.4%は舌に投与した FG によってラベルされていた。また、歯髄炎発症後、歯髄と TG において CFA 群と Sham 群での Hsp70 mRNA 発現の有意な差は認められなかった。

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、舌の異所性痛覚過敏を引き起こしている可能性が考えられた。

4. TG 細胞における TRPV1 の合成亢進

本研究では歯髄炎の発症後、舌を支配する TG 細胞では Sham 群に比べ CFA 群の方が TRPV1 の合成が亢進した。これまでの研究で、後根神経節細胞で合成された分子は神経細胞にとどまることなく末梢および中枢ターミナルへと運ばれ、機能を発揮すると報告されている [28]。本研究においても TG 細胞に検出された TRPV1 が末梢のターミナルおよび中

枢へと運ばれ、舌を支配する細径神経線維のターミナル部に多くの TRPV1 が集積して機能を発揮することによって、痛覚異常が引き起こされるものと考えられた。

5. 歯髄および舌を二重支配している TG 細胞

本研究では、舌への FG および M1 歯髄への DiI 投与を行ったラットの TG 細胞の 9.2% が両トレーサーによって標識された。一方 TG 細胞の約 6% は複数の歯髄を支配していることが報告されている [4]。これらのことから、少数の TG 細胞が 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異常疼痛発症の一因を担っていると考えられる。

結論

本研究結果のまとめを Fig. 8 に示した。M1 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 M1 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 と結合して TRPV1 の合成が亢進する。その結果、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。

謝辞

本研究遂行にあたり、格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科保存学第Ⅱ講座の小木曾文内教授ならびに生理学教室の岩田幸一教授、および歯科保存学第Ⅱ講座の清水康平助教に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました生理学教室、病理学教室、歯科保存学第Ⅱ講座の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究は、平成 23 年度日本大学歯学部佐藤研究費（研究代表者：清水康平）、平成 25 年度日本大学歯学部佐藤研究費（研究代表者：篠田雅路）、平成 21～22 年度科学研究費補助金若手研究（B）（研究代表者：清水康平、課題番号 21791868）、平成 22～23 年度科学研究費補助金若手研究（B）（研究代表者：篠田雅路、課題番号 22792021）、平成 23～24 年度科学研究費補助金若手研究（B）（研究代表者：清水康平、課題番号 23792192）、平成 25 年度科学研究費補助金挑戦的萌芽研究（研究代表者：岩田幸一、課題番号 24659832）および平成 23～25 年度日本大学大学院歯学研究科研究費（学生分、大原絹代）によって実施された。

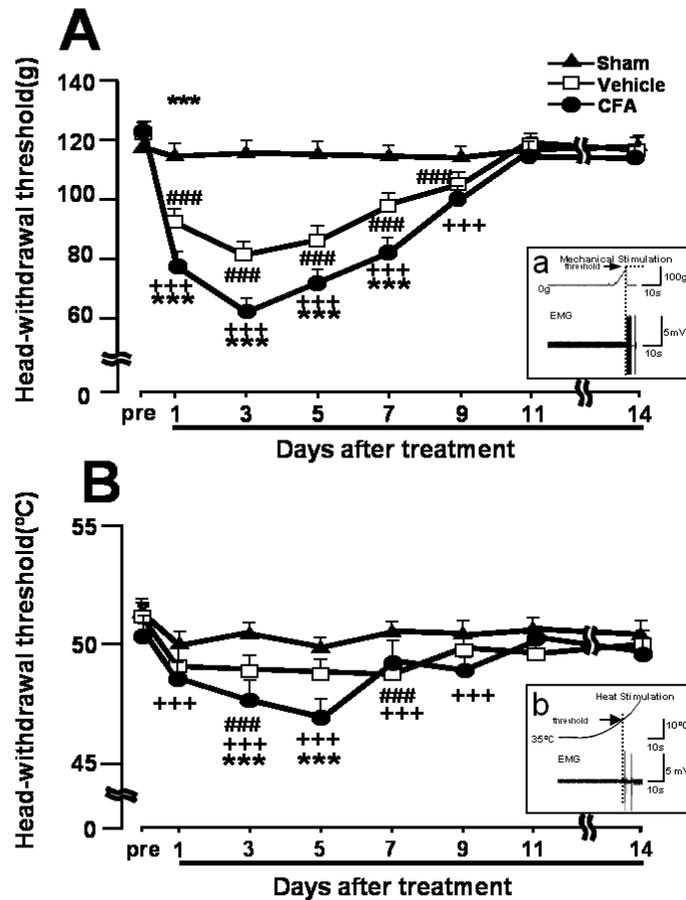
引用文献

1. Grushka M, Sessle BJ : **Applicability of the McGill Pain Questionnaire to the differentiation of 'toothache' pain.** *Pain* 1984, **19** : 49-57.
2. Ertekin C, Secil Y, Yuceyar N, Aydogdu I : **Oropharyngeal dysphagia in polymyositis/dermatomyositis.** *Clin Neurol Neurosur* 2004, **107** : 32-37.
3. Bender IB : **Pulpal pain diagnosis-a review.** *J Endod* 2000, **26** : 175-179.
4. Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, Urata K, Iwata K : **Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation.** *PLoS one* 2013, **8** : e52840.
5. Farella M, Michelotti A, Gargano A, Cimino R, Ramaglia L : **Myofascial pain syndrome misdiagnosed as odontogenic pain.** *Cranio* 2002, **20** : 307-311.
6. Ji RR : **Peripheral and central mechanisms of inflammatory pain, with emphasis on MAP kinases.** *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2004, **3** : 299-303.
7. Takeda M, Tanimoto T, Nasu M, Ikeda M, Kadoi J, Matsumoto S : **Activation of NK1 receptor of trigeminal root ganglion via substance P paracrine mechanism contributes to the mechanical allodynia in the temporomandibular joint inflammation in rats.** *Pain* 2005, **116** : 375-385.
8. Okun E, Griffioen KJ, Mattson MP : **Toll-like receptor signaling in neural plasticity and disease.** *Trends Neurosci* 2011, **34** : 269-281.
9. Liu T, Gao YJ, Ji RR : **Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch.** *Neurosci bull* 2012, **28** : 131-144.
10. Nicotra L, Loram LC, Watkins LR, Hutchinson MR : **Toll-like receptors in chronic pain.** *Exp Neurol* 2012, **234** : 316-329.
11. Giffard RG, Han RQ, Emery JF, Duan M, Pittet JF : **Regulation of apoptotic and inflammatory cell signaling in cerebral ischemia : the complex roles of heat shock protein 70.** *Anesthesiology* 2008, **109** : 339-348.
12. Iguchi M, Littmann AE, Chang SH, Wester LA, Knipper JS, Shields RK : **Heat stress and cardiovascular, hormonal, and heat shock proteins in humans.** *J Athl Train* 2012, **47** : 184-190.
13. Zhang Y, Wang YH, Zhang XH, Ge HY, Arendt-Nielsen L, Shao JM, Yue SW : **Proteomic analysis of differential proteins related to the neuropathic pain and neuroprotection in the dorsal root ganglion following its chronic compression in rats.** *Exp Brain Res* 2008, **189** : 199-209.
14. Pileggi R, Holland GR : **The expression of heat shock protein 70 in the dental pulp following trauma.** *Dent Traumatol* 2009, **25** : 426-428.
15. White JP, Cibelli M, Rei Fidalgo A, Paule CC, Noormohamed F, Urban L, Maze M, Nagy I : **Role of transient receptor potential and acid-sensing ion channels in peripheral inflammatory pain.** *Anesthesiology* 2010, **112** : 729-741.
16. Diogenes A, Ferraz CC, Akopian AN, Henry MA, Hargreaves KM : **LPS sensitizes TRPV1 via activation of TLR4 in trigeminal sensory neurons.** *J Dent Res* 2011, **90** : 759-764.
17. Zimmermann M : **Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals.** *Pain* 1983, **16** : 109-110.

18. Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K : **Satellite glial cell P2Y₁₂ receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats.** *Mol Pain* 2012, **8** : 23.
19. Omagari D, Takenouchi-Ohkubo N, Endo S, Ishigami T, Sawada A, Moro I, Asano M, Komiyama K : **Nuclear factor kappa B plays a pivotal role in polyinosinic-polycytidylic acid-induced expression of human beta-defensin 2 in intestinal epithelial cells.** *Clin Exp Immunol* 2011, **165** : 85-93.
20. Ferraz CC, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A : **Lipopolysaccharide from Porphyromonas gingivalis sensitizes capsaicin-sensitive nociceptors.** *J Endod* 2011, **37** : 45-48.
21. Qi J, Buzas K, Fan H, Cohen JI, Wang K, Mont E, Klinmand, Oppenheim JJ, Howard OM : **Painful pathways induced by TLR stimulation of dorsal root ganglion neurons.** *J Immunol* 2011, **186** : 6417-6426.
22. Hitomi S, Shinoda M, Suzuki I, Iwata K : **Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in ectopic pain following inferior alveolar nerve transection in rats.** *Neurosci Lett* 2012, **513** : 95-99.
23. Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K : **Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain.** *J Neurosci* 2011, **31** : 7145-7155.
24. Yasuda M, Shinoda M, Kiyomoto M, Honda K, Suzuki A, Tamagawa T, Kaji K, Kimoto S, Iwata K : **P2X₃ receptor mediates ectopic mechanical allodynia with inflamed lower lip in mice.** *Neurosci Lett* 2012, **528** : 67-72.
25. Kim JY, Yenari MA : **The immune modulating properties of the heat shock proteins after brain injury.** *Anat Cell Biol* 2013, **46** : 1-7.
26. Guo LH, Schluesener HJ : **The innate immunity of the central nervous system in chronic pain : the role of Toll-like receptors.** *Cell Mol Life Sci* 2007, **64** : 1128-1136.
27. Turturici G, Sconzo G, Geraci F : **Hsp70 and its molecular role in nervous system diseases.** *Biochem Res Int* 2011, **2011** : 618127.
28. Cortright DN, Szallasi A : **TRP channels and pain.** *Curr Pharm Des* 2009, **15** : 1736-1749.

Fig. 1

Tongue mechanical/thermal hypersensitivity following CFA application to the tooth pulp in lightly anesthetized rats



A : Head-withdrawal threshold (HWT) to mechanical stimulation of the tongue.

B : HWT to heat stimulation of the tongue.

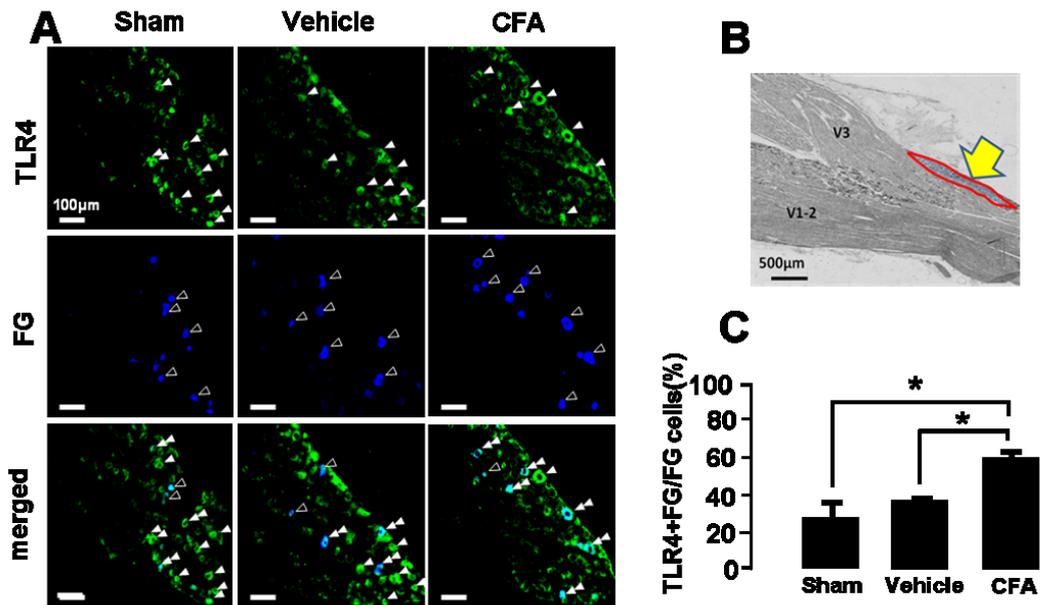
Aa and Bb : EMG recordings from trapezius muscles during mechanical or heat stimulation of the tongue.

: P < 0.001 (Sham vs. Vehicle), **+++**: P < 0.001 (Sham vs. CFA),

******* : P < 0.001 (CFA vs. Vehicle)

Fig. 2

TLR4 expression in TG neurons innervating tongue on day 3 after CFA injection into tooth pulp



A : TLR4-IR cells and FG labeled cells in the TG in Sham, Vehicle-applied, or CFA-applied rats, respectively, and merged indicates TLR4-IR cells were merged with FG-labeled cells. FG was injected into the tongue.

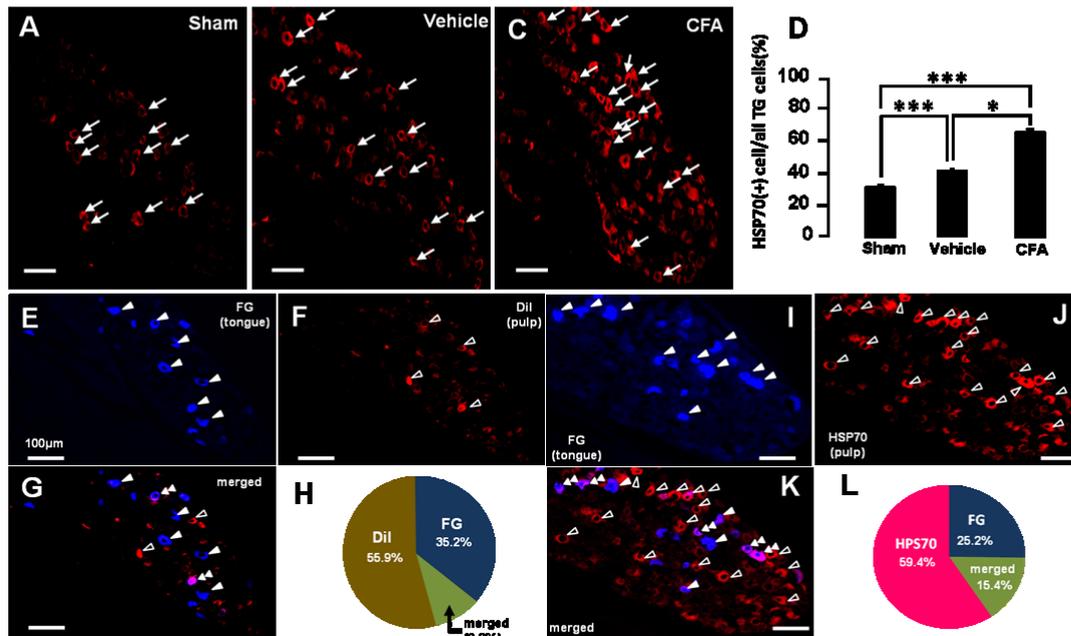
B : Low magnification photomicrographs of the TG.

C : The mean number of TLR4-IR cells labeled with FG in Sham, Vehicle applied, or CFA-applied rats.

*: $P < 0.05$ (Sham, Vehicle vs. CFA)

Fig. 3

Hsp70 expression in the TG neurons in Sham, Vehicle-applied, or CFA-applied rats, and FG-, Dil-, or Hsp70-labeled cells in the TG



A, B, C : Hsp70-IR cells in the TG in Sham (A), Vehicle-applied (B), or CFA-applied rats (C).

D : The mean number of Hsp70-IR cells in the TG in Sham, Vehicle-applied or CFA-applied rats.

E, F, G : FG- (E) and Dil-labeled cells (F) or Alexa-labeled FG-labeled cells merged with Dil-labeled cells (G) in the TG.

H : The pie graph indicates the percentage of Dil, FG, or merged cells in the TG.

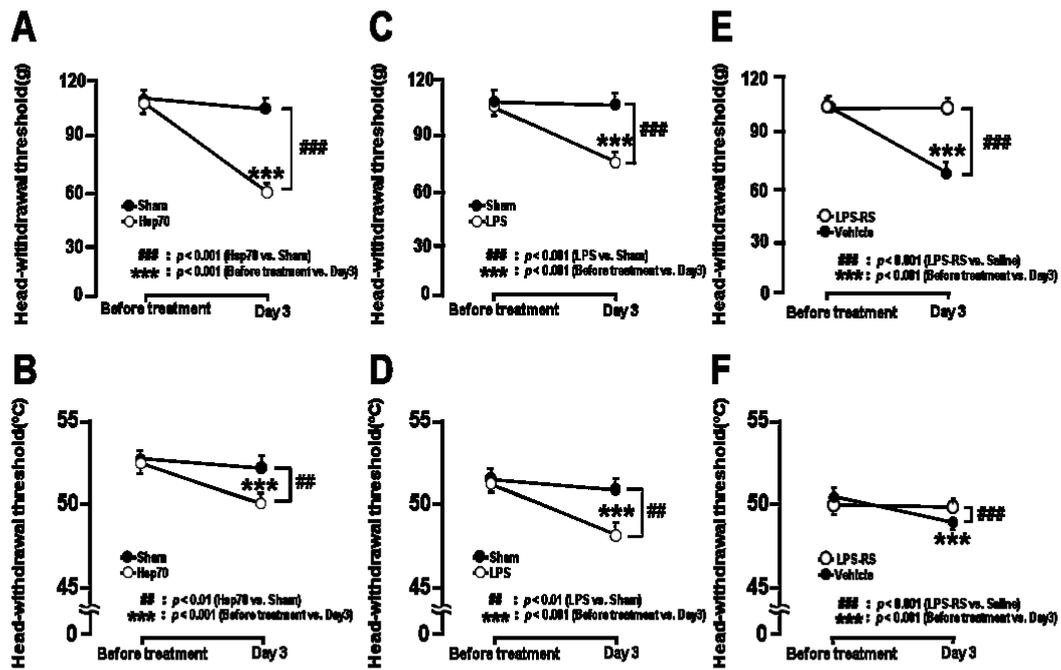
I, J, K : FG- (I) and Alexa-labeled Hsp70-labeled cells (J) or FG-labeled cells merged with Hsp70-labeled cells (K) in the TG.

L : The pie graph indicates the percentage of FG-, Alexa-labeled Hsp70, or merged cells in the TG. Note that intra-pulpal Hsp70 was axonally transported to TG on day 3 after Alexa-labeled Hsp70 injection into the tooth pulp.

* : $P < 0.05$ (Vehicle vs. CFA), ***: $P < 0.001$ (Sham vs. Vehicle, CFA).

Fig. 4

HWT to mechanical or heat stimulation of the tongue in pulpal Hsp70-, LPS-applied rats, or Sham rats, and the effect of LPS blocker LPS-RS on HWT



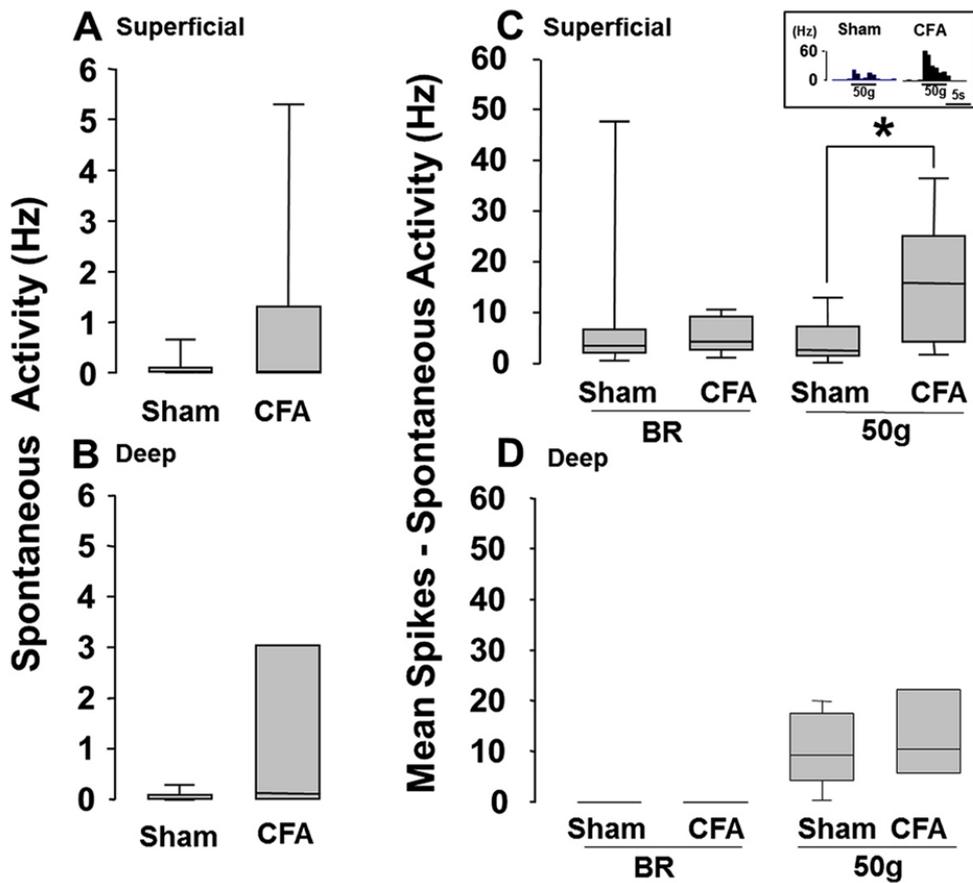
A, B: HWT to mechanical (A) and heat stimulation (B) of the tongue in pulpal Hsp70-applied rats or Sham rats.

C, D: HWT to mechanical (C) and heat stimulation (D) of the tongue in pulpal LPS-applied rats or Sham rats.

E, F: Change in HWT to mechanical (E) and heat stimulation (F) of the tongue following TG injection of LPS-RS or Vehicle in pulpal CFA-applied rats.

Fig. 5

Spontaneous activities and brush or 50 g noxious mechanical responses of TG nociceptive neurons in M1 TP CFA-applied rats or Sham rats



A, B : Spontaneous activity of superficial RF neurons (A) and deep RF neurons (B).

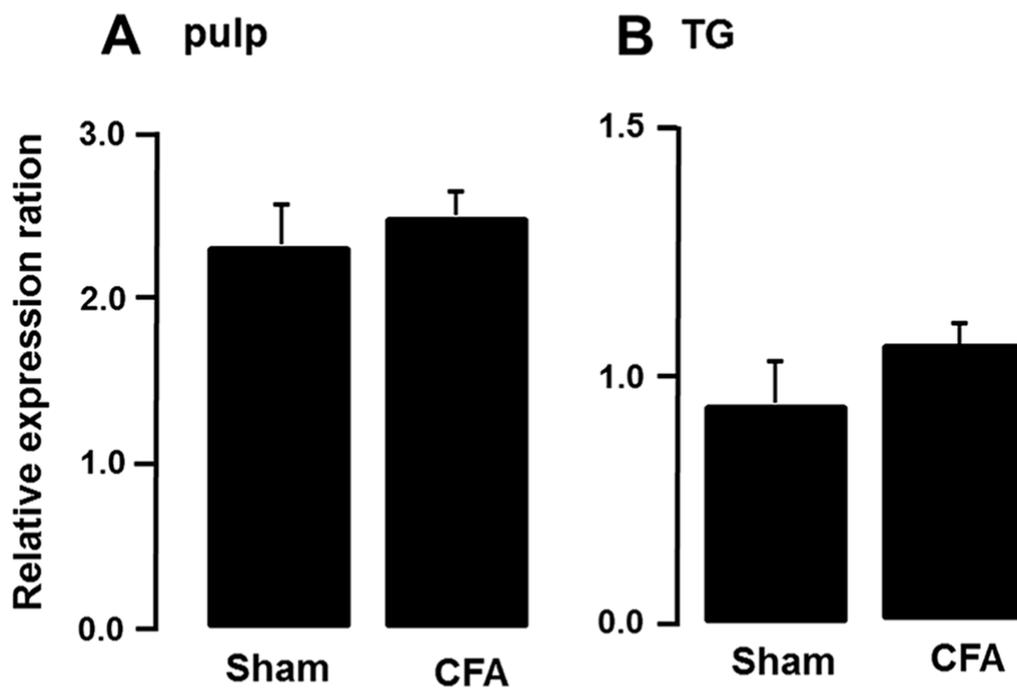
C, D : Mechanical evoked responses of superficial RF neurons (C) and deep RF neurons (D).

Sham : M1 TP Sham-treated rats, inset diagram in C indicate typical unit activities of TG neurons.

CFA : M1 TP CFA-applied rats. *: P < 0.05

Fig. 6

Relative change in Hsp70 mRNA levels in the M1TP or TG following CFA application to the M1 TP or Sham treatment of the M1 TP

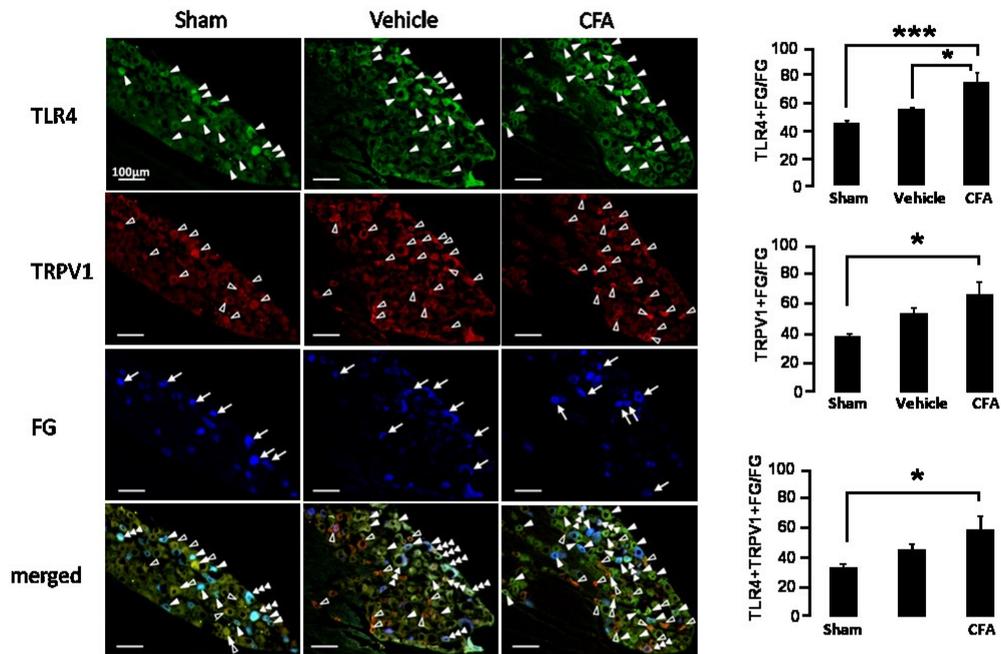


A : Hsp 70 mRNA levels of M1 TP

B : Hsp 70 mRNA levels of the TG.

Fig. 7

TRPV1 expression in TG cells innervating the tongue following M1 TP inflammation



A : Photomicrographs of TLR4-IR and TRPV1-IR cells labeled with FG injected into the tongue in M1 TP-inflamed rats.

B, C, D : Relative number of TLR4+FG / FG labeled cells (B), TRPV1+FG / FG labeled cells (C) and TLR4+TRPV1+FG / FG labeled cells (D).

*****: P < 0.001, *: P < 0.05**

Fig. 8

Schematic illustration of the present results

1. Tooth pulp inflammation
2. Hsp70 expression in the pulp
3. Hsp70 transportation to TG neurons
4. Hsp70 release from TG neurons
5. TLR expression in TG neurons
6. Hsp70 binding to TLR4 expressing neurons innervating the tongue
7. TRPV1 expression in TG neurons
8. TRPV1 transportation from TG neurons to peripheral terminals


Tongue neuropathic pain

