

論文の内容の要旨

氏名：CHEN JUI YEN

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Involvement of primary afferent p38-TRPV4 pathway in dry-tongue pain

（一次ニューロンにおける p38-TRPV4 経路の dry-tongue pain への関与）

口腔乾燥症は臨床において多くみられる疾患であり、その原因として加齢、ストレス、唾液腺障害、放射線治療、シェーグレン症候群などが考えられている。口腔乾燥症の症状として、舌を始めとする口腔内の様々な部位に異常な痛みが発症することが知られているが、その発症メカニズムは不明である。そのため口腔乾燥症の患者に対して、原因治療は行われず、対症療法に終始しているのが現状である。

口腔乾燥では粘膜から水分が蒸発し、感覚神経と粘膜が損傷を受ける。損傷組織からは様々な細胞内分子が放出されるが、その中で痛覚発症に関与するものとして ATP, NGF などが知られている。細胞から放出された分子は損傷した神経に作用して、その神経活動を亢進させる。神経の興奮が長時間続くと、神経に発現している様々な受容体の発現が増加することによって神経細胞が感作され、さらに発火頻度が増加する。舌乾燥による舌痛覚過敏には、以上のようなメカニズムが考えられている。

組織損傷に重要な働きをなす受容体として TRP チャンネルが注目されている。TRP チャンネルには複数のサブタイプが存在するが、その中でも特に、TRPV4 は内臓、皮膚や神経細胞に存在し、末梢における機械刺激、温度の変化、低浸透圧により活性化されると報告されている。また、TRPV4 は神経障害性疼痛や炎症性に起因する慢性疼痛などの難治性疼痛にも関与していると報告されていることから、舌乾燥後に引き起こされる機械痛覚過敏に対して重要な働きを有する可能性がある。しかし、口腔乾燥における舌痛に対して、TRPV4 がいかなるメカニズムで関与するかについては不明である。

MAPK 経路は細胞内のシグナルを核内にまで伝える重要な細胞内情報伝達機能を担っていると考えられている。MAPK ファミリーは、ERK, p38 と JNK の三種類に分類されている。細胞外から刺激を受けると ERK や p38 はリン酸化され、pERK と pp38 となり、様々な細胞内分子の合成に関与する。pp38 は、末梢神経障害または局所的な炎症によって神経節細胞に存在する TRPV 1 の発現増加に強く関与していると報告されている。以上のことから、舌乾燥により三叉神経節細胞において、TRPV4 発現が増加し、これによって舌に痛覚過敏が発症すると想像される。そこで、本研究では、TRPV4 の発現増加には p38 のリン酸化が関与し、この経路を介して舌痛覚過敏が発症するという仮説を立てた。

本研究では、SD 雄性ラットを用い、毎日 2 時間ずつ 7 日間、ラットを吸入麻酔下で舌を突出させ、舌乾燥モデルラットを作製した（舌乾燥群）。舌乾燥 1, 3, 5, 7 日目に、浅麻酔下で舌に刺激を与え頭部ひっこめ反射閾値を測定し、同モデルが舌痛覚過敏を発症しているかどうかを判定した。また、麻酔の深さがラットの反射閾値に影響を与える可能性があるため、2 分間隔で最大 5 回、舌に機械刺激を与える前に下肢へ機械刺激を与え、足のひっこめ反射閾値を測定して、麻酔の深度が一定であることを確認した。また、頭部ひっこめ反射閾値を計測する場合、5 回の機械刺激に対して最大および最小の値を取り除いた 3 回の平均値を算出し、反射閾値とした。吸入麻酔を施し舌の突出を行わなかった群をシャム群とした。

その結果として、ラットの舌を乾燥することにより、舌に機械痛覚過敏が発症した。乾燥前、舌の機械刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値は約 100g であったが、3 日後には約 75g にまで低下した。その後 14 日目まで、この値が持続した。シャム群においては 14 日目まで、100g の値を示し、有意な変化は認められなかった。

次に、三叉神経節における TRPV4 の発現変化を調べるため、三叉神経節の切片を作製して免疫組織染色を行った。舌乾燥を開始する前に逆行性神経トレーサーである FG (FluoroGold) を舌に投与し、舌乾燥 7 日目に、ラットを 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定し、三叉神経節を取り出し、凍結

切片を製作した。その後、TRPV4 と TRPV1 の免疫組織染色を行い、舌感覚を支配する神経節細胞において、TRPV4 および TRPV1 陽性細胞数を計測した。その結果、TRPV4 陽性細胞数は、舌乾燥群でシャム群に比較して有意に多い値を示した。この結果から、舌乾燥によって引き起こされた舌の痛覚過敏には TRPV4 が強く関与する可能性が示された。一方、TRPV1 陽性細胞数はシャム群と比べて有意な変化を示さなかった。このことは、舌乾燥によって舌の熱痛覚過敏が発症しないことを意味している。この研究結果は、これまでの研究結果と一致している。

続いて、TRPV4 の発現増加に対する p38 のリン酸化について解析を行った。まず、舌乾燥によって pp38 陽性細胞数がどのように変化するかについて免疫組織学的解析を行った。その結果、舌乾燥群ではシャム処置を行ったラットに比べ有意に多くの pp38 陽性細胞数が検出された。

さらに、舌乾燥 7 日目に、TRPV4 アンタゴニストである HC067047 の舌への局所投与に対する逃避反射閾値の影響について解析を行った。コントロール群には DMSO を vehicle として舌に投与し、30 分と 1 時間後に頭部ひっこめ反射閾値を測定した。30 分後、実験群の頭部ひっこめ反射閾値はコントロール群に比べ有意に舌乾燥前値まで回復していた。また、この閾値の回復は 60 分後には消失していた。コントロール群においては閾値の変化は認められなかった。

また、舌乾燥期間中、毎日 P38 MAPK 阻害薬である SB203580 を三叉神経節内に投与し、1, 3, 5, 7 日に頭部ひっこめ反射閾値を測定した。コントロール群には、DMSO を投与した。その結果 SB203580 注入群で、3 日目から 7 日目まで、コントロール群に比べ有意な閾値の回復を認めた。一方、コントロール群においては有意な回復は認められなかった。

最後に p38 MAPK 阻害薬を投与して、TRPV4 と pp38 の染色を行なった。なお、DMSO を投与した群をコントロールとした。その結果、コントロール群に比較し、舌乾燥群では TRPV4 陽性を示す神経節細胞数は有意に少なかった。

本研究で得られた結果から、舌乾燥により発症する舌の機械痛覚過敏には三叉神経節細胞における p38 のリン酸化の促進、それに引き続く TRPV4 の活性化亢進が関与する可能性が示された。以上の結果は、ヒトのドライマウスで観察される舌痛も上記のメカニズムによって引き起こされる可能性を示している。