

論文の内容の要旨

氏名：菅野浩平

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：Macrophage-mediated Toll-like receptor 4–interleukin-1R signaling via p38 phosphorylation contributes to the ectopic tongue pain following tooth pulp inflammation

(歯髄炎に起因する舌痛覚過敏発症に対する p38 のリン酸化を介した三叉神経節内 TLR4–IL-1R シグナル伝達へのマクロファージの関与)

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、咀嚼や嚥下などの様々な運動にも影響し、機能障害を引き起こすといわれている。このような症状を引き起こす要因として、病変部を支配する三叉神経節ニューロンの長期感作と興奮性の増強、それに引き続く非病変部を支配する三叉神経節ニューロンと三叉神経脊髄路核ニューロンの可塑的变化が考えられている。また、歯髄に炎症が起こると、歯髄だけでなく口腔顔面の広い領域に異所性疼痛が引き起こされることが知られている。歯科臨床において、口腔顔面に発症した異所性疼痛は誤診や誤治療など様々な問題を引き起こす要因となる。しかし、歯髄炎に起因する口腔顔面領域の異所性疼痛の発症メカニズムに関しては不明な点が多い。三叉神経節には衛星細胞、マクロファージ、リンパ球等の非神経細胞が存在し、さまざまなシグナル伝達を介して三叉神経節ニューロンの興奮性調節に関与する。これは、歯髄炎に起因する異所性疼痛に対して、これらの非神経細胞が関与する可能性を示している。また、末梢組織に炎症が起こると、後根神経節に集積したマクロファージから interleukin-1 β (IL-1 β) が放出され、これによるシグナル伝達が異常疼痛を引き起こす要因となることも知られている。しかしながら、三叉神経節において、歯髄炎に起因して三叉神経節に集積するマクロファージと三叉神経節ニューロン間の相互作用がいかなるメカニズムで疼痛発症に関与するかは明らかにされていない。そこで、本研究では、三叉神経節に存在する非神経細胞の一つであるマクロファージに焦点を当て、歯髄炎に起因する口腔顔面領域の異所性疼痛発症機構の解明を試みた。

末梢組織の感染に伴い、微生物により生成されるさまざまな化学伝達物質は、侵害受容体の活性化を亢進する。微生物が生成する毒素やリポタンパクの受容体として toll-like receptor (TLR) が知られており、TLR は一次求心性ニューロンに発現して興奮性変調に関与することが報告されている。特に一次求心性ニューロンに発現する TLR4 は、組織傷害や細胞ストレス後に誘導された pattern recognition receptors および damage associated molecular patterns を認識し、末梢組織の炎症に起因した異常疼痛発症に関与していると考えられている。また、heat shock protein 70 (Hsp70) は、TLR4 の特異的な内因性リガンドとして知られ、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。さらに、Hsp70 は炎症が生じた歯髄組織内で発現し、歯髄支配三叉神経節ニューロンに取り込まれて細胞体へ軸索輸送される。Hsp70 は三叉神経節内に放出され、パラクリン作用により舌支配三叉神経節ニューロンの細胞体に発現する TLR4 に結合することにより舌痛覚過敏を誘発することも報告されている。さらに、炎症性マクロファージでは IL-1 β の発現が増強されることや、口腔顔面領域の炎症は三叉神経節ニューロンにおける interleukin-1 receptor type I (IL-1RI) の発現の増強をもたらし、興奮性を促進して異常疼痛を引き起こすことが報告されている。すなわち、歯髄炎後の三叉神経節内マクロファージにおいて IL-1 β 産生が亢進し、IL-1RI を介して舌支配三叉神経節ニューロンの興奮性が増強する結果、舌痛覚過敏が引き起こされる可能性がある。

Transient receptor potential Vanilloid 1 (TRPV1) は capsaicin による化学刺激や侵害的な熱 (> 43°C)、低 pH (< 6.5)、およびいくつかの刺激によって活性化されるイオンチャネルであり、自由神経終末に多く存在しているといわれている。また、活性型サテライト細胞における IL-1 β の発現亢進後に三叉神経節内の TRPV1 が感作することが報告され、IL-1 β と TRPV1 は重要な機能連関を有すると考えられている。そこで、三叉神経節内のマクロファージとニューロン間の機能連関が、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、本研究を計画した。

Sprague-Dawley (SD) 系雄性ラットを isoflurane (2%) 吸入麻酔による浅麻酔後、生理食塩水に溶解した butorphanol, medetomidine, midazolam (三種混合麻酔薬) の腹腔内注射で麻酔したのち、左側下顎の第一臼歯 (M1) 咬合面のエナメル質と象牙質全体を切削して露髄させることによって歯髄炎モデルラットを作製した。同麻酔を施し、他の介入は行わないラットを sham 群とした。

まず、歯髄に炎症が発生しているかどうか、またそれが舌痛覚過敏を誘導するかどうかを確認するため、露髄群または sham 群の歯髄をヘマトキシリン-エオジン染色にて観察をおこなった。また、浅麻酔下で露髄歯と同側の舌へ熱あるいは機械刺激を与え、頭部引っ込め反射閾値 (HWT) を経目的に測定した。その結果、露髄後 1 日目における M1 では、冠部歯髄に多数の炎症性細胞浸潤が認められたが、根尖部歯髄には認められなかった。露髄歯と同側の舌辺縁部への熱および機械刺激により引き起こされる HWT は、露髄後 1 日目、2 日目、および 3 日目において露髄前 (0 日目) および sham 群に比較して有意に低下した。一方、sham 群では、舌刺激に対する HWT の有意な変化は認められなかった。これらの結果は、露髄により歯髄炎および舌痛覚過敏が発症することを示している。

さらに、露髄後の三叉神経節第三枝領域における TLR4, IL-1RI, マクロファージ (Iba1), および IL-1 β の発現の変化を調べるため、あらかじめ逆行性トレーサー (Fluorogold; FG) を同側舌縁部に投与し、露髄後 1 日目の三叉神経節第三枝領域における FG 標識 TLR4 陽性細胞数, FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数および IL-1 β 陽性マクロファージを解析した。露髄後 1 日目における, FG 標識 TLR4 陽性細胞数, FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数, および IL-1 β 陽性マクロファージは露髄群において sham 群よりも有意に増加した。この結果は露髄が三叉神経節における TLR4 および IL-1RI の発現増加, マクロファージの集積および集積したマクロファージにおける IL-1 β の発現増加を引き起こすことを示している。

次に、集積したマクロファージ, TLR4, および IL-1RI 間の相互作用を解析するために選択的マクロファージ枯渇薬 (LCCA) を三叉神経節に注入し HWT の変化, 三叉神経節における Iba1, TLR4, および IL-1RI の発現の変化を, sham または露髄の処置を行ったラットを用いて検索した。その結果, M1 露髄 1 日後, LCCA 投与により同側舌縁部へ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。LCCA 投与により FG 標識 TLR4 陽性かつ IL-1RI 陽性細胞数に変化は認められなかった。これらの結果は、露髄後の三叉神経節におけるマクロファージの集積が、舌の熱または機械痛覚過敏の発症に関与することを示している。

次に、M1 露髄と同時に選択的 TLR4 アンタゴニスト (LPS-RS) を三叉神経節に注入し、露髄 1 日後に HWT の計測、三叉神経節第三枝領域における FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。LPS-RS を投与して M1 露髄 1 日後において、同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT 低下が有意に抑制され、FG 標識 IL-1RI 陽性細胞数の増加が有意に抑制された。これらの結果は、TLR4 シグナルが IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数の増加をもたらしたことを示している。

また、あらかじめ FG を同側舌縁部に投与し、選択的 TLR4 アゴニスト (recombinant Hsp70) を未処置ラットの三叉神経節に注入し、HWT 測定と IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。その結果、recombinant Hsp70 投与 1 日後、同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT が有意に低下し、FG 標識 IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数が有意に増加した。この結果から三叉神経節ニューロンにおいて TLR4 シグナルを介して IL-1RI が増加することが示された。

さらに、あらかじめ FG を同側舌縁部に投与し、未処置ラットの三叉神経節に recombinant IL-1 β を投与した後、HWT 測定および FG 標識 TRPV1 陽性三叉神経節ニューロン数を免疫組織化学的に解析した。その結果、recombinant IL-1 β を TG に投与して 1 日後において同側舌縁部への機械および熱刺激に対する HWT が有意に低下し、FG 標識 TRPV1 陽性ニューロン数が有意に増加した。以上の結果から IL-1 β -IL-1RI シグナルが三叉神経節ニューロンでの TRPV1 発現を増強し、舌の熱および機械痛覚過敏を発症する可能性が示された。

最後に、M1 露髄と同時に選択的 TLR4 アンタゴニスト (LPS-RS) を三叉神経節に注入し、露髄 1

日後に HWT の計測, 三叉神経節第三枝領域における FG 標識リン酸化 p38 陽性かつ IL-1RI 陽性細胞数を免疫組織化学的に解析した。LPS-RS を投与して M1 露髄 1 日後において, 同側舌縁部への熱および機械刺激に対する HWT 低下が有意に抑制され, FG 標識リン酸化 p38 陽性かつ IL-1RI 陽性細胞数の増加が有意に抑制された。これらの結果は, TLR4 シグナルが p38 のリン酸化を介して IL-1RI 陽性三叉神経節ニューロン数の増加をもたらす可能性を示している。

本研究の結果から, M1 歯髄炎により, 三叉神経節第三枝領域におけるマクロファージの集積およびマクロファージにおける IL-1 β の産生亢進, 三叉神経節ニューロンでの Hsp70-TLR4 シグナル増強による p38 リン酸化を介した IL-1RI の増加, および IL-1 β シグナル増強による舌を支配する TRPV1 陽性三叉神経節ニューロンの増加により, 舌痛覚過敏が誘導されることが明らかになった。