

令和元年6月7日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11749

研究課題名(和文) 三叉神経領域の痛覚日内変動機構の解明 効果的な時間薬物療法の確立に向けて

研究課題名(英文) An analysis of diurnal variation in pain sensitivity in trigeminal areas-for establishing an effective drug treatment considering the administration time

研究代表者

杉村 光隆 (Sugimura, Mitsutaka)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90244954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1990年代以降、体内時計機構の研究の進歩とともに、痛覚の日内変動に関する報告がなされてきた。しかし、繊細な感覚機能が集積している口腔顔面領域を支配する三叉神経系に関するものは認められない。本研究では、急性持続性疼痛の動物モデルを用いて、三叉神経支配領域の疼痛関連行動および侵害受容に関わるタンパク発現の日内変動の有無を検討した。その結果、ホルマリン注射によって認められた疼痛関連行動は、明期と比較して暗期で有意に長く、三叉神経脊髄路核尾側亜核において観察された疼痛関連タンパクのc-Fosも明期と比較して暗期で有意に多かった。以上より、三叉神経領域における痛覚には日内変動があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、繊細な感覚機能が集中している三叉神経領域の痛みの感じ方には日内変動があることがわかった。今回得られた結果が、鎮痛薬などの投薬のタイミングを考慮した、より効果的で安全な薬物治療方法を確立することの一助となれば、その意義は極めて深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Since the 1990s, there has been a report on the diurnal variation of pain sensation with the progress in research on the internal clock. However, no report have been found about the trigeminal nervous system that controls the orofacial region responsible for delicate sensory functions. In this study, we examined the presence or absence of diurnal variation in pain-related behavior and in the expression nociceptive proteins in the trigeminal innervation region using an animal model of acute and persistent pain. As a result, the pain-related behavior observed by formalin injection was significantly longer in the dark period compared to the light period, and the number of c-Fos, the pain-related protein was significantly greater in the dark period than the light period. From the above, it was considered that there is circadian variation in nociception in the trigeminal region.

研究分野：ペインクリニック

キーワード：痛覚 三叉神経系 概日リズム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子に制御されている体内時計は、睡眠・覚醒リズムに加え、脳波やホルモン分泌、細胞分裂、体温調節、血圧などの生命機能を維持するために、極めて重要なシステムであり、細菌から哺乳類まで生物が普遍的に備えている。その周期は、例えばヒトでは約24.5~25 時間であり、私たちの社会が1 日24 時間の周期であるため、そのまま何もしなければ、生活の昼夜のサイクルがどんどんずれていってしまうことになるが、それを解決するために、生体には体内時計をリセットする機構が備わっている。リセット因子として最も強力なものは、光の刺激であり、そのほか温度、食事、社会的接触等の環境因子が有効に作用することが明らかになっている3)。1997 年に哺乳類最初の時計遺伝子Clock とPer がクローニングされて以来4)、中枢時計である視交叉上核(SCN; suprachiasmatic nucleus)のみならず、生体のほとんどあらゆる器官、組織、細胞に体内時計が存在し、時計遺伝子の発現量が1 日の中で律動的に変化することによって、一細胞を最小単位として時間情報が生み出されることがわかってきた5,6)。

体内時計の機序が分子生物学的に少しずつ解明されるにつれて、医学および医療の分野では、疾患の原因解明や治療戦略から医療過誤対策にいたるまでの幅広い領域に、時間生物学的知見が応用される研究も発展しつつある。痛みに関する研究分野でも、痛覚の日内変動や効果的な疼痛治療の開発に向けた取り組みが始まっている。侵害受容に関わる多くのメディエータは、体内時計に合わせたリズムを持っており、痛みの感じ方もそれに合わせたリズムがあると言われている7)。例えば、分娩時の痛みは夜の方が大きく、末期癌患者のモルヒネの追加は夕刻に多い。また、関節リウマチ患者の多くは早朝に激しい痛みを感じ、片頭痛は夜間に痛みが増悪する。よって痛みの律動性を理解して治療戦略を練ることが効果的な成果をもたらし、患者にとって福音となるものと思われる。その第一段階として、痛覚に関する時間生物学的な基礎研究では、雄性マウスの脊髄レベルにおけるsubstance P が炎症性疼痛の日内変動の修飾因子であることや8)、雄性ラットの熱刺激の侵害受容は活動期後半(暗期)に亢進すること1)、あるいは熱刺激に対する雄性マウスの痛覚の日内変動は二峰性のピークを示すこと9)、などの報告が散見されるが、その本体の解明には至っていない。加えて、我々が本研究で提案する三叉神経領域での侵害受容に関する時間生物学的知見は皆無である。本研究では三叉神経支配領域において、ホルマリン投与による急性持続性疼痛モデルを作製し、痛覚の日内変動を検討後、次のステップとして、これまで我々が研究してきた10-12) 女性ホルモンであるエストロゲンが痛覚の日内変動を修飾するのか、ならびに日内変動を考慮した鎮痛剤の投与方法(時間治療学的投与方法)についても検索したい。

2. 研究の目的

本研究では、急性持続性疼痛の動物モデルを用いて、三叉神経支配領域の疼痛関連行動および侵害受容に関わるタンパク質の発現の日内変動を解析し、さらには日内変動を考慮した鎮痛剤の投与方法(時間治療学的投与方法)開発の可能性について検索することを目的としている。

3. 研究の方法

(1) 10 週齢の雄性マウス(C57BL/6J Jms Slc、日本SLC)を、室温が 23 ± 1 の静穏な施設で給水・摂食を自由とし、12 時間ごとの明・暗期サイクル(明期; 6-18時、暗期; 18-6 時)で少なくとも10 日間飼育する。

(2) 実験用マウスを実験ケージ(15×15×15 cm)に1匹ずつ入れて30分間馴らした後、用手的に左側上口唇(三叉神経第二枝領域)にホルマリン(5%、10 μ l)を皮下注射する。

(3) 薬剤投与後、実験ケージに速やかに戻し、45 分間ビデオによる録画を行う。疼痛関連行動 (PRB ; pain-related behavior ; licking, flinching, lifting, biting, guarding, shaking など) の行動回数や持続時間を、急性期と持続期の2 相 (acute phase; 0-9 分、tonic phase ; 10-45 分) に分けて評価する。

(4) 当該マウスを灌流固定し、脳を取り出した後、凍結スライス切片を作成し、免疫組織化学染色によりターゲットタンパク (c-Fos) の発現動態を観察する。

*この行程を図 1 の 8 群 (n=8 ずつ) に分け行う。

明 期		
	生理食塩水	5%ホルマリン
野生型マウス	第1群	第2群
Cry1Cry2 ノックアウトマウス	第3群	第4群
暗 期		
	生理食塩水	5%ホルマリン
野生型マウス	第5群	第6群
Cry1Cry2 ノックアウトマウス	第7群	第8群

図1.群わけの内訳

4 . 研究成果

本研究は、現在も遂行中であり未発表データも多く含まれるため、公表して差し支えない部分のワイルドタイプの結果についてのみ記載を行っている。

まず、ホルマリン注射によって認められた疼痛関連行動時間は、明期第 I 相においては生理食塩水群がホルマリン群に比べて有意に長く、第 II 相では両群で差を認めなかった (A)。次に暗期 I 相においては両群で差を認めなかったが、II 相では生理食塩水群に比べてホルマリン群で有意に長かった (B)。ホルマリン群に関して第 I 相では明期と暗期で差を認めなかったが、第 II 相においては暗期で有意に長かった (C)。

次に、三叉神経脊髄路核尾側亜核において観察された疼痛関連タンパクの c-Fos の数は、生理食塩水群及びホルマリン群のいずれも暗期の方が明期に比べて有意に多い結果となった。

これらの結果より、三叉神経領域の疼痛に関しては、明期と暗期で差が認められることが明らかとなった。

Cry1Cry2 ノックアウトマウスでの検索は、引き続き行うこととしている。

Fig2 Induced pain behavior during the I° (0-9 min) and II° (10-45 min) phases.

*P < 0.05, **P < 0.01

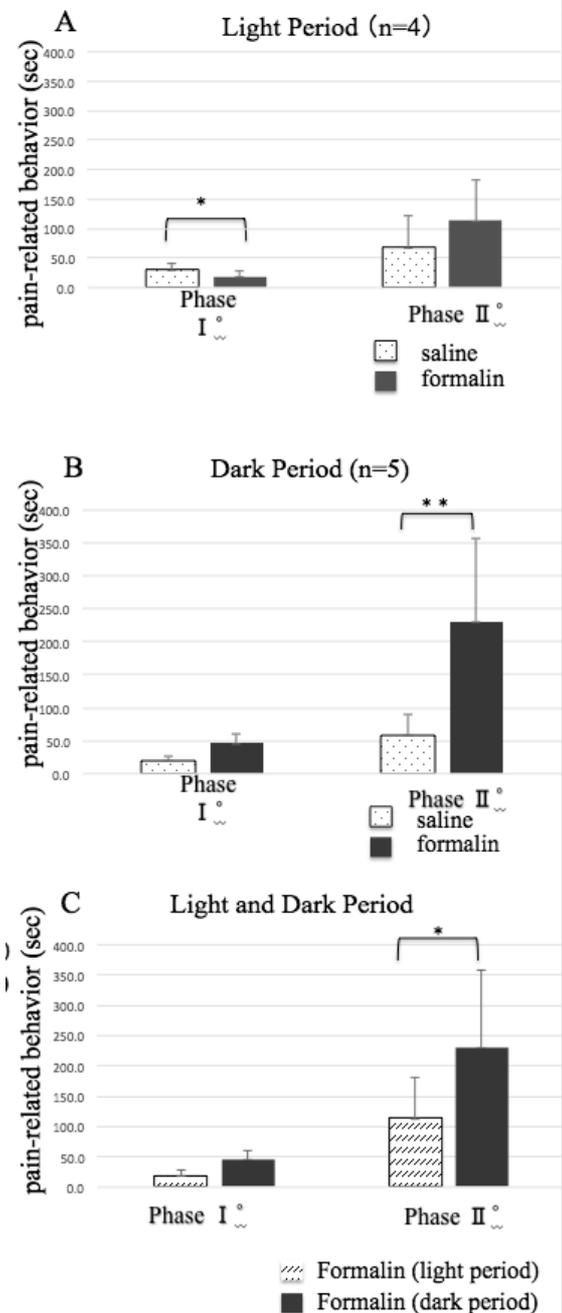


図2. 第I相(0-9分)及びII相(10-45分)の疼痛関連行動(秒)

【参考文献】

- 1) Christina A et al.: Daily rhythm of nociception in rats. *J Circadian Rhythms* 2004; 2:2
- 2) Crockett Rset al.: Diurnal variation in response to thermal stimulation: Mouse-hotplate test. *Physiol Behav* 1977; 18:193-6
- 3) 本間研一ら：生体リズムの研究．北海道：北海道大学図書刊行会，1989．
- 4) Reppert SM et al.: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-41
- 5) Hara R et.al.: Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 2001; 6:269-78
- 6) Son GH et al.: Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid .by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 05:20970-5
- 7) Chassard Det al.: Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology*. 2004 Feb;100(2):413-27.
- 8) Zhang J et al.: Regulation of peripheral clock to oscillation of substance P contributes to circadian inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2012 Jul;117(1):149-60.
- 9) Konecka AM, Sroczyńska I.: Circadian rhythm of pain in male mice. *Gen Pharmacol*. 1998 Nov;31(5):809-10.
- 10) Sugimura M, Niwa H et al. Trigeminal neuropathic pain-related behavior in ovariectomized rats. (Abst) *Jap Dent Soc Anesthesiol*. 2011; 39; 546.
- 11) Yamagata K, Sugimura M, Niwa H: Estrogen status influences the expression level of TRPV1, ANO1 in the trigeminal ganglion of female rat. (Abst) *Jap Dent Soc Anesthesiol*. 2015;43;583.
- 12) Yoshida M, Sugimura M, Niwa H: Effect of estrogen on neuropathic pain in territory of infraorbital nerve. *Jap Dent Soc Anesthesiol*. (Abst) 2015;43;583.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

Ayako Niiro, Sachi Ohno, Saori sako, kazuaki Yamagata, Ryoza Sendo, Kanae Aoyama, Mitsutaka Sugimura, An analysis of diurnal variation in pain sensitivity in trigeminal areas using an animal model of acute and persistent pain、IFDAS 2018、2018

新納彩子、急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析、第 10 回口腔先端科学教育研究センター研究発表会、2018

大野 幸、新納彩子、千堂良造、杉村光隆、三叉神経節における時計遺伝子の発現について、第 45 回日本歯科麻酔学会学術集会、2017

大野 幸、高須奈々、杉村光隆、中村 涉、摂食タイミングを制御するサーカディアンリズム、第 12 回環境生理学プレコンgres、2017

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：眞鍋 庸三

ローマ字氏名：Manabe Youzou

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学部附属病院

職名：講師

研究者番号(8桁)：90248550

研究分担者氏名：遠矢 明菜

ローマ字氏名：Toya Akina

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：80593649

研究分担者氏名：山下 薫

ローマ字氏名：Yamashita Kaoru

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：附属病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：50762613

研究分担者氏名：大野 幸

ローマ字氏名：Ohno Sachi

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医学部歯学部附属病院

職名：助教

研究者番号(8桁)：00535693

研究分担者氏名：岐部 俊郎
ローマ字氏名：Kibe Tohirou
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学部附属病院
職名：助教
研究者番号(8桁)：50635480

研究分担者氏名：山形 和彰
ローマ字氏名：Yamagata Kazuaki
所属研究機関名：鹿児島大学
部局名：医歯学部附属病院
職名：助教
研究者番号(8桁)：40784195

(2)研究協力者なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。