

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：34435

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K10799

研究課題名(和文) 口腔顔面領域の慢性疼痛における延髄吻腹内側部セロトニンニューロンが及ぼす疼痛制御

研究課題名(英文) Pain control induced of serotonergic neurons of the rostral ventromedial medulla in the chronic pain of oral facial region

研究代表者

杉生 真一 (Sugiyo, Shinichi)

大阪人間科学大学・保健医療学部・教授

研究者番号：90397688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔顔面領域の疼痛機序について、中枢内下行性疼痛制御に関わる延髄吻腹内側部(RVM)の役割の一端を明らかにした。RVM内には、三叉神経核へ投射する多くのセロトニン(5-HT)作動性ニューロンが存在し疼痛制御を行っていることから、その働きを明らかにするため、anti-Serotonin transporter-Saporinを利用してRVM内の5-HT作動性ニューロンを選択的に削除した動物を作成し、動物の侵害受容動態を調べた結果、対照群に比べ、痛みが緩和された。この結果からRVM内の5-HT作動性ニューロンは疼痛を促進する働きを有することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経毒と結合した抗IgG セロトニン(5-HT)トランスポーターを用い、延髄吻腹内側部(RVM)の5-HT作動性ニューロンを選択的に削除した(Anti-SERT-Sap)モデルを作成した。そのモデルを使用し、ホルマリン(FC)テストを行った結果、侵害受容性疼痛関連行動数が減少し、三叉神経核尾側亜核のc-Fos陽性細胞数も減少したことにより、RVMの5-HT作動性ニューロンが侵害受容機能を有することを示した。また5-HT作動性ニューロンは神経障害性疼痛モデルで活動性の増加を認め、中枢内下行性疼痛制御に重要な役割を果たす根拠の一端を示した。これらの結果は社会的意義があり、今後の研究へと波及する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we clarified some of the roles of rostral ventromedial medulla (RVM) in the central descending pain control for pain mechanisms in the orofacial region. Since there are many serotonin (5-HT)-ergic neurons in the RVM that project to the trigeminal nucleus and control pain, to clarify their function, we created animals in which 5-HT-ergic neurons in the RVM were selectively deleted using the anti-serotonin transporter-Saporin. As a result, nociceptive dynamics of the animals were examined, and pain was alleviated compared to the control group. These results indicate that 5-HT-ergic neurons in the RVM have a pain-promoting function.

研究分野：口腔顔面痛

キーワード：神経障害性疼痛 下行性疼痛調節系 口腔顔面領域

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

延髄吻腹内側部 (RVM) には侵害受容を強めるニューロンだけでなく、弱めるニューロンも多くあり、それぞれのニューロンが状況に応じて、いかに口腔顔面領域の疼痛制御に関与しているのかは不明である。そこで RVM に存在し、脊髄後角や延髄後角に投射するセロトニン (5-HT) 作動性ニューロンの働きを解明するために、神経毒と結合した抗 IgG 5HT トランスポーター (Anti-SERT-Sap) を利用して RVM の 5-HT 作動性ニューロンの侵害受容における機能的メカニズムを明らかにすることで RVM の主要な役割を捉えることができると着想し、以下の研究計画に至った。

- (1) RVM の 5-HT 作動性ニューロンが顔面部ホルマリン刺激誘導後の三叉神経核尾側亜核 (Vc) に及ぼす影響について
- (2) 下歯槽神経切断モデルラットが及ぼす RVM の 5-HT 作動性ニューロンの活動性について

2. 研究の目的

先行研究では、病態により RVM の働きに違いがあるとされている。そこで RVM の働きを解明するために、RVM 内の 5-HT 作動性ニューロンを Anti-SERT-Sap により選択的に削除した場合、RVM がどのように働くかを解明することを目的とした。削除後のモデルを使用し、経時的な疼痛関連行動 (PRB) の定量を行い、侵害受容動態の差異を明らかにすることとした。侵害受容動態の差異があった時期で脳の切片を作製し、免疫組織化学法にて c-Fos、5-HT 作動性ニューロン (5-HT 陽性細胞) の発現を調べ、脳の細胞の表現型および活動レベルの差異を明らかにすることとした。また炎症性モデルと神経障害性モデルを作成し、各々のモデル動物でフォン・フライテストを行い、機械的疼痛閾値を定量し、各モデルでの機械的疼痛閾値に差異があった時期での RVM 内の c-Fos、5-HT 陽性細胞数を調べ、病態の違いによる RVM 内の 5-HT 作動性ニューロンの下行性疼痛制御の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 体重 180-200 g の雄 SD ラットを用いた。麻酔下で、動物を脳定位固定装置に固定し、Anti-SERT-Sap または非結合 (Blank) サポリン (Bl-Sap; Advanced Targeting Systems, SanDiego, CA, USA) をガラスマイクロピペットで頭頂葉を通してブレグマから尾側へ 11.3-12.0 mm、正中線の 0 mm、および深さ 8.8-9.0 mm の RVM (0.5 μ M, 10 μ l) に投与し、Anti-SERT-Sap 前処置群と Blank-Sap 前処置対照群を作成した。手術 2-4 週間後、動物をプレキシガラストケースに入れ、少なくとも 60 分間馴化させた後、生理食塩水で希釈した 1.25%ホルマリン (FC) 溶液 50 μ l を左口髭部皮膚領域の皮下に注入した。注入後、ラットをケースに戻し、PRB として注入部位の同側および反対側の前肢または後肢で左上口唇部を搔く行動を 5 分間ごとに 60 分間計数した。FC 溶液注入 120 分後に、灌流固定と脳幹部の取り出しを行った。後日、延髄部の連続横断切片を作成し、免疫組織化学法を用いて、c-Fos と 5-HT 陽性細胞の染色を行った。

(2) 体重 180-200 g の雄 SD ラットを用いた。口腔・顔面の疼痛発現は、下歯槽神経切断モデル (神経障害性疼痛モデル) と急性持続性疼痛モデル (下歯槽神経切断無しモデル) を用いた。両モデルは、手術 1 週間後に FC 溶液よりも持続性がある起炎材として完全フロイドアジュバント原液を生理食塩水で等倍希釈した溶液 (CFA 希釈溶液) 50 μ l を左口髭部皮膚領域に投与した。CFA 希釈溶液投与、1W、2W、3W 後の機械的疼痛閾値をフォン・フライテストにて定量し、疼痛の評価を行った。フォン・フライテストでは、専用の口腔顔面刺激用ホルダー (Ugo Basile 社製 37100; Durham Holder) に動物を保持し、デジタルフォン・フライ (IITC 社製 IITC-2390) を使用し、動物が痛みを感じて顔面をのけぞらせた加重を機械的疼痛閾値として定量した。機械的疼痛閾値の差異があった時期で、ホルムアルデヒド溶液を用い通常の灌流固定を行い、両モデルの脳幹部の連続横断切片を作成した。各モデル切片を用いて c-Fos 陽性細胞と 5-HT 陽性細胞を免疫組織化学法にて同定し、各々の三叉神経支配領域での両モデルの機械的疼痛閾値の定量に再現性があるのか、差異が実際にあるのかを検証した。また両モデルで、脳幹部の 5-HT 陽性細胞の活動性の差異があるかを調べるため 5-HT 陽性細胞と c-Fos 発現の共存関係を調べ、神経障害性疼痛時に RVM の 5-HT 作動性ニューロンの活動性がどのように疼痛制御に影響を及ぼすかを調べた。

4. 研究成果

(1) Anti-SERT-Sap 前処置群では、Blank-Sap 前処置対照群と比べ、第 2 相でホルマリン誘導 PRB 数が有意に減少した (図 1)。RVM は、下行性疼痛調節に重要な部位であり、免疫組織化学法により、Vc の後角に投射する多くの 5-HT 陽性細胞を含むことが認められた (図 2)。また Anti-SERT-Sap 前処置群では、Blank-Sap 前処置対照群と比べ、RVM 中の 5-HT 陽性細胞数が有意に選択的削除され (図 2, 図 3) Vc I/II と Vc III/IV の c-Fos 陽性細胞数は有意に減少した (図 4, 図 5)。これらの結果から、RVM における 5-HT 作動性ニューロンが、侵害受容機能を有することを示す結果となった。

ホルマリン誘導 PRB (疼痛関連行動)

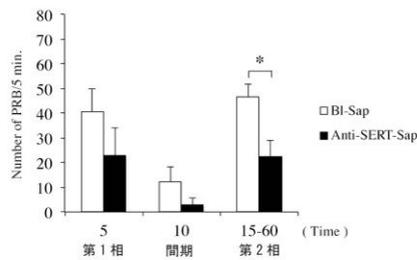


図 1

Vcでのホルマリン誘導c-Fos陽性細胞の分布

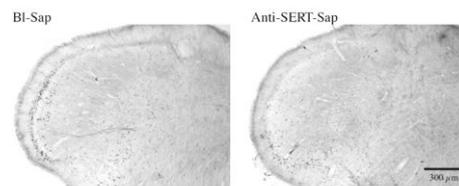


図 4

RVM, Vcでの5HT陽性細胞の分布

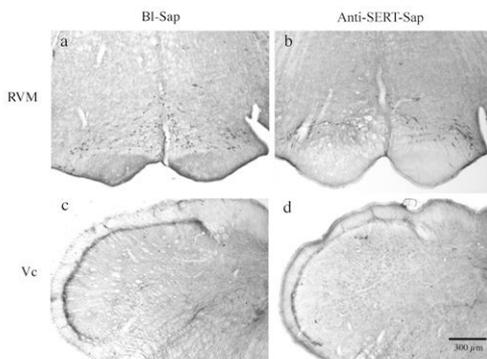


図 2

Vcでのホルマリン誘導c-Fos陽性細胞数

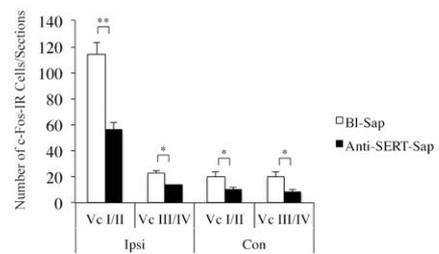


図 5

RVM での 5HT 陽性細胞の分布

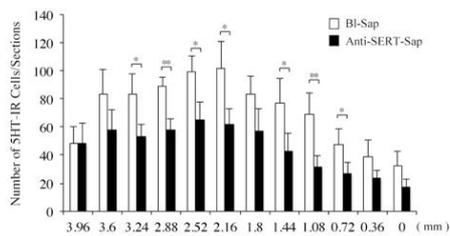


図 3

(2) 下歯槽神経切断モデルラットでは対照群と比較して、左上顎神経の支配領域（左口髭部皮膚領域）でフォン・フライテストを行った結果、ope 後 2W で異所性の痛覚過敏が有意に引き起こされ（図 1）、VcI/II の c-Fos 陽性ニューロンが有意に増加し（図 2）、また RVM の c-Fos と 5-HT 陽性細胞の二重染色より、RVM の吻側領域で活性 5-HT 陽性ニューロンの有意な増加を認められた（図 3）。これらの知見から、下歯槽神経の損傷後に起因する神経障害性疼痛時の病態では RVM の 5-HT 作動性ニューロンの活動性（活性 5-HT 陽性ニューロン）の亢進が生じていることが認められた。

口髭部皮膚領域の時系列での動物動態の変化

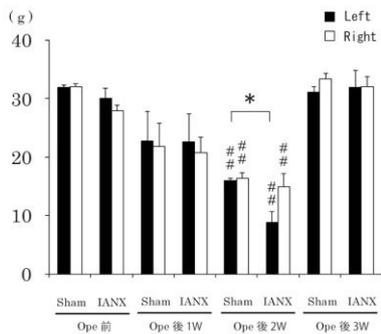


図 1

Vc 領域の c-Fos 陽性ニューロンの分布と個数

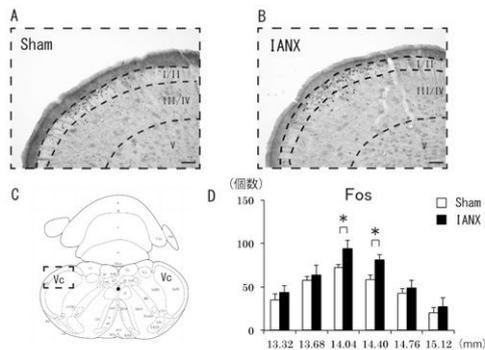


図 2

RVM 領域の活性 5-HT 陽性ニューロン (Fos/5-HT) の分布と個数

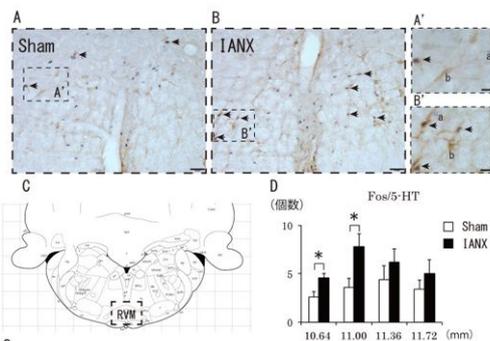


図 3

a:Fos b:5-HT : Fos/5-HT

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yuji Kanazawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Shinichi Sugiyo, Yasufumi Shigeyoshi	4. 巻 42(3)
2. 論文標題 Effects of aging on basement membrane-related gene expression of the skeletal muscle in rats.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedical Research	6. 最初と最後の頁 115 - 119
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2220/biomedres.42.115	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 杉生真一、金澤佑治、武田功	4. 巻 20
2. 論文標題 下歯槽神経切断モデルラットが及ぼす吻側延髄腹内側部セロトニンニューロンの活動性の変化	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 大阪人間科学大学紀要	6. 最初と最後の頁 115-120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yuji Kanazawa, Mamoru Nagano, Satoshi Koinuma, Mitsugu Sujino, Yoichi Minami, Shinichi Sugiyo, Isao Takeda, Yasufumi Shigeyoshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Basement membrane recovery process in rat soleus muscle after exercise-induced muscle injury.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Connect Tissue Res.	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/03008207.2020.1791839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 杉生真一 金澤佑治 武田功	4. 巻 18
2. 論文標題 吻側延髄腹内側部（RVM）のセロトニン作動性ニューロンが顔面部ホルマリン刺激誘導後の三叉神経尾側亜核（Vc）に及ぼす影響	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 大阪人間科学大学紀要	6. 最初と最後の頁 201-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 金澤佑治、長野護、鯉沼聡、筋野貢、南陽一、杉生真一、武田功、重吉康史
2. 発表標題 筋損傷後の基底板再構築過程におけるTCF4 (+) 線維芽細胞の発現時期と局在
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会（誌上開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金澤佑治、杉生真一、武田功
2. 発表標題 筋損傷後の回復過程における基底板構築反応と線維芽細胞の発現
3. 学会等名 第108回理学療法科学学会 学術大会（神奈川）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 金澤佑治、長野護、鯉沼聡、筋野貢、南陽一、杉生真一、武田功、重吉康史
2. 発表標題 筋損傷後の基底板再構築における加齢の影響
3. 学会等名 第6回日本筋学会学術集会（Web開催）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉生 真一・金澤 佑治・武田 功
2. 発表標題 吻側延髄腹内側部のセロトニン作動性ニューロン除去 後の三叉神経尾側亜核における下行性疼痛調節
3. 学会等名 第24回日本基礎理学療法学会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 佑治、鯉沼 聡、長野 護、筋野 貢、南 陽一、杉生 真一、武田 功、重吉 康史
2. 発表標題 老化が筋損傷後の線維芽細胞による基底板再構築に与える影響
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 佑治、杉生 真一、武田 功
2. 発表標題 筋損傷が骨格筋内の線維芽細胞による基底板構築反応に与える影響
3. 学会等名 第24回総合理学療法研究会（大阪）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金澤 佑治、鯉沼 聡、長野 護、筋野 貢、南 陽一、杉生 真一、武田 功、重吉 康史
2. 発表標題 筋損傷後に生じる骨格筋内の線維芽細胞による基底板構築
3. 学会等名 第5回日本筋学会学術集会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuji Kanazawa, Shinichi Sugiyo, Isao Takeda
2. 発表標題 Basement membrane construction by fibroblasts in skeletal muscle during recovery after muscle injury
3. 学会等名 Asian Confederation of Orthopaedic Manipulative Physical Therapy Congress 2019 (Tokyo)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉生真一 金澤佑治 竹村元秀
2. 発表標題 吻腹内側延髄のセロトニン作動性ニューロンが及ぼす顔面部の疼痛制御
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会（新潟）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉生真一 金澤佑治 武田功
2. 発表標題 吻腹内側延髄におけるセロトニン作動性ニューロンの除去は口腔顔面痛を変化させた
3. 学会等名 第24回総合理学療法研究会（大阪）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関