

平成22年5月7日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592401
 研究課題名（和文） 視床下部CRF遺伝子発現を指標とした口腔・顎顔面領域における慢性痛発症機序の解明
 研究課題名（英文） Analysis of pathogenic mechanism of chronic pain in oro-facial area using a index of CRF gene expression in hypothalamus
 研究代表者
 庄司 憲明 (SHOJI NORIAKI)
 東北大学・病院・講師
 研究者番号：70250800

研究成果の概要（和文）：三叉神経領域の痛み刺激が延髄より高位の中枢に及ぼす影響については未だ明らかにされていない。本研究では、舌の痛みストレスに対する視床下部の応答を詳細に検討するために、舌に capsaicin 溶液及びその vehicle を注入し血漿 ACTH、corticosterone と視床下部 paraventricular nucleus (PVN) の corticotropin releasing factor (CRF) 遺伝子を指標として解析した。その結果、舌への capsaicin 注入による痛みは、HPA axis を活性化すること、また、CRF hnRNA 遺伝子発現はストレスの遺伝子転写活性の指標として有用であることが示された。

研究成果の概要（英文）：Pain is one of the physical stressor for humans. In this study, we performed quantitative analysis of CRF gene transcription in hypothalamic PVN under the condition of tongue pain stress in rats. Plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) secretion was peak at 30 min after the capsaicin injection to tongue prior to gradually increasing of plasma corticosterone, indicating that tongue pain is stressor enough to up-regulate hypothalamo-pituitary- adrenocortical axis. CRF hnRNA 15 min after the injection was up-regulated 3 fold than that of control rats. This report is the first study which succeeded to detect CRF hnRNA by quantitative real-time PCR analysis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：痛みストレス、視床下部-下垂体-副腎系、CRF 遺伝子、hnRNA

1. 研究開始当初の背景

「痛み」には生体に対する警告信号としての意義があり、刺激に対する痛

みを生体を感じると逃避行動や忌避反射が誘発される。一方、慢性的な痛みは、組織傷害が消失した後でも、正

常時には全く痛みを引き起こさない刺激（軽く触れるだけの刺激）や交感神経系の興奮、または心理的要因によっても発現する。このような慢性痛の原因として、痛覚系の可塑的变化により神経回路に記憶としてひずみが残るためと言われていたが、そのメカニズムについては解明されていない。歯科臨床における治療対象は主に「痛み」であることはよく知られているが、最近、非定型歯痛、舌痛症などの慢性痛患者は増加傾向にあり社会問題となっている。しかしながら、慢性痛に対する治療法は確立されておらず、診断および治療法の開発を目指した慢性痛発症メカニズムの解明は急務であり責務である。

近年、痛みがストレスとして脳内（中枢）に影響を及ぼすことが報告された。仙波らは、ラットの足に機械的な刺激（急性痛）を与え、脳における c-fos（神経活動のマーカー）発現を検討した結果、拘束、恐怖など心理的要因の強いストレスを付加した場合と同様に、帯状回などの大脳皮質、外側中隔核、髄板内核群および視床下部室傍核などに c-fos が強発現することを報告し、痛みというストレスは痛覚伝達系を介した情動系の興奮と組織障害・炎症に伴う身体的ストレスの両面を持っていることを明らかにした。また、臨床研究においても顎関節症患者や舌痛症患者などの慢性痛患者は心理学的ストレスレベルが高いことが報告されている。さらに近年、生体のストレス応答である視床下部-下垂体-副腎系を介し、慢性痛による痛み感作がおこり、心理的刺激によって痛みが誘発されることが Lancet 誌（1999年）に報告された。すなわち、侵害刺激の繰り返しの入力により末梢および中枢が感作され、このストレスが、視床下部-下垂体-副腎系を介し、ホルモン系、自律神経系、免疫系との相互関係を経て、最終的には大脳辺縁系-前頭葉系に影響を与える。これらの系が感作されると心理的刺激によっても痛みの感覚および感情が誘発される。したがって、口腔・顎顔面領域の慢性痛疾患に対する診断および治療を確立するためには、三叉神経伝導系 {三叉神経節-延髄（三叉神経脊髄路核）-視床（後内腹側核）} の変化のみならず、痛みによって惹起されるストレス反応の程度を知ることが重要である。

2. 研究の目的

痛みストレスが視床下部-下垂体-副腎系に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究は、東北大学医学部動物実験倫理委員会により承認が得られたプロトコールに基づいて、動物の飼育および実験を行った。実験動物として、9~10 週齢の雄性 Wistar 系ラット（体重 200~300g）54 匹を用いた。ラットをジエチルエーテルで麻酔後、ラットの舌に capsaicin（1% capsaicin + 10% ethanol + 10% Tween 80 + saline）を注入した 24 匹を capsaicin 群（注射 5 分後断頭 n=6、同 15 分後 n=6、同 30 分後 n=6、同 60 分後 n=6）、および vehicle（10% ethanol + 10% Tween 80 + saline）を注入した 24 匹を vehicle 群（注射 5 分後断頭 n=6、同 15 分後 n=6、同 30 分後 n=6、同 60 分後 n=6）とした。また、血漿 ACTH および corticosterone と CRF 遺伝子発現量の基礎値を知るため、ジエチルエーテル麻酔および舌に注射しなかったラットを NA-NI（NA: no anesthesia, NI: no injection）群（n=6）とした。全ての動物は、実験の 1 週間前には購入飼育し、安定させた。また、実験期間中、室温 24°C、規則的な明暗サイクル（7 時点灯、19 時消灯）のもとで飼育し、ラット用飼料と脱イオン水を自由に摂取させた。尚、実験はラットのホルモンの日内変動を考慮し、全て午前中に行った。

(1) capsaicin および vehicle の注入、および視床下部室傍核（PVN）組織の試料採取

ラットをジエチルエーテル吸入麻酔による非動化後、舌尖部左側に capsaicin（30mM）または vehicle を注入した。注入後、それぞれの時間（上記）ケージ内に放置し、ジエチルエーテル麻酔後の覚醒状態（通常 2~3 分で覚醒）で断頭した。尚、コントロール群として無麻酔で断頭した NA-NI 群を設定した。ラットの血漿 ACTH および corticosterone 濃度を測定するため、断頭後、躯幹（体幹）から血液を採取し、血漿分離を行った（4°C、3000rpm、5~10 分）。また、CRF 遺伝子解析のための PVN 組織を採取するため、断頭後すぐに脳を摘出し RNA later™（RNA Stabilization Reagent、QIAGEN）を満たしたシャーレ上で即座に大脳を除去後、Punch out 法（移植針、直径 3.5 mm、夏目製作所）にて PVN を含む脳組織を摘出した。摘出後、急速冷凍（dry ice & n-Hexane dehydrated、-80°C）し、real time PCR 法による hnRNA および mRNA 発現量解析のために冷凍庫（-80°C）に保存した。

(2) 血漿 ACTH および corticosterone 濃度の測定

血漿 ACTH 濃度 (pg/ml) を ECLIA 法 (エクルーシス試薬 ACTH キット、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社 ; 感度 : 3.67 pg/ml) にて、corticosterone 濃度 (ng/ml) を EIA 法 (corticosterone Correlate-EIA™ Kit, assay designs 社 ; 感度 : 27.0 pg/ml) にて測定した。

(3) PVN の CRF hnRNA および mRNA 発現量の解析 (real time PCR)

NA-NI 群および capsaicin 群の PVN 組織を Trizol-chloroform 法 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) にて total RNA を抽出し、random hexamer primer および Transcriptor First Strand cDNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて cDNA を作製した。その後、LC FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche Molecular Biochemicals) と各ストレス物質および各プライマーを用いて、LightCycler system (Roche Diagnostics, Japan) で real time PCR 解析を行った。尚、internal control (内部標準) は β actin (hnRNA) および GAPDH (mRNA) とし、全てのプライマーは、Primer3 にて設計して、homology 検索をおこなった。なお、それぞれのプライマーシーケンスは、図 1、反応条件は、図 2 に示す。

(4) 統計学的分析

全ての数値は、平均値±標準偏差で示した。capsaicin 群および vehicle 群の経時的変化の有意差検定は、ANOVA にて分散分析を行った後、Post-hoc test による多重比較検定を行った。また、capsaicin 群と vehicle 群の有意差検定は、F test の後、unpaired T test を用いて行った。有意水準はいずれも 5% 未満とした。なお、統計ソフトは Stat View 5.0 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

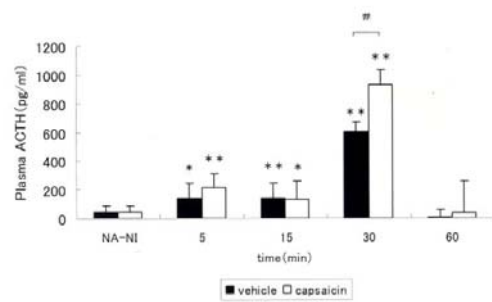
4. 研究成果

(1) 血漿 ACTH および corticosterone の経時変化

① 血漿 ACTH

NA-NI 群 (基礎値) の血漿 ACTH は、45.64 ± 45.05 pg/ml であった。capsaicin 注入後 5 分で 213.4 ± 131.2 pg/ml、15 分で 132.9 ± 100.4 pg/ml、30 分で 935.1 ± 221.7 pg/ml と増加したが、60 分経過後 40.87 ± 47.40 pg/ml とほぼ基礎値に復した。また、vehicle 注入群では、vehicle 注入後 5 分で 143.9 ± 100.5 pg/ml、15 分で 144.2 ± 68.37 pg/ml、30 分で 602.2 ± 52.17 pg/ml と増加したが、60 分経過後 6.167 ± 5.515 pg/ml と基礎値以下となった。capsaicin 群と vehicle 群を比較すると、注入 30 分後の血漿 ACTH 濃度にのみ有意差が見られた (* p=0.002) (図 1)。

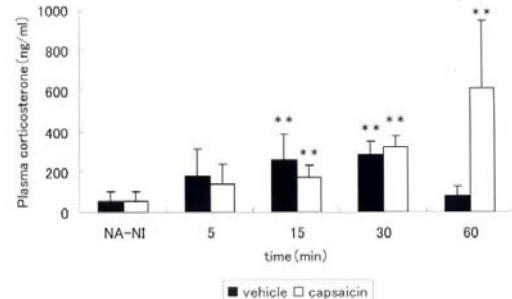
図 1



② 漿 corticosterone

NA-NI 群 (基礎値) の血漿 corticosterone は、それぞれ 54.76 ± 47.78 ng/ml であった。capsaicin 注入後 5 分で 141.7 ± 93.39 ng/ml、15 分で 174.7 ± 57.75 ng/ml、30 分で 324.1 ± 50.63 ng/ml、60 分で 611.2 ± 335.1 ng/ml と増加を認めた。一方、vehicle 注入群では、5 分で 179.7 ± 130.8 ng/ml、15 分で 257.4 ± 130.5 ng/ml、30 分で 282.8 ± 65.82 ng/ml と増加が認められたが、60 分経過後ほぼ基礎値に復した (80.43 ± 48.46 ng/ml)。capsaicin 群と vehicle 群を比較すると、注入 60 分後の capsaicin 群と vehicle 群に有意差がみられた (* p=0.002) (図 2)。

図 2

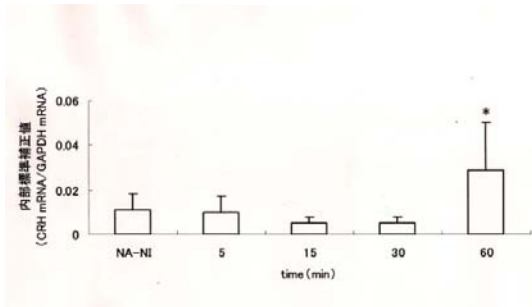


(2) 視床下部室傍核 (PVN) における遺伝子発現

① CRF hnRNA

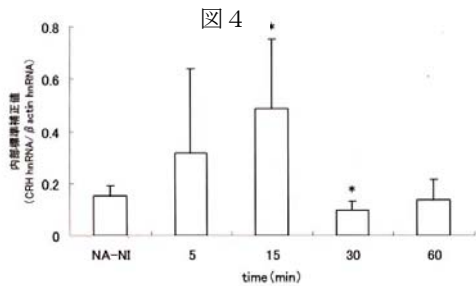
PVN における CRF hnRNA 発現の基礎値 (NA-NI 群) は、0.1508 ± 0.03899 (内部標準補正值 : CRF hnRNA / β actin hnRNA) であり、capsaicin 注入後 5 分で 0.3160 ± 0.3227、15 分で 0.4861 ± 0.2668、30 分で 0.09752 ± 0.03384、60 分で 0.1379 ± 0.07738 の値を示した。注入後 15 分後で有意な増加を示し (p=0.012)、注入後 30 分後で有意な減少を示した (p=0.010) (図 3)。

図 3



② CRF mRNA

PVN における CRF mRNA 発現の基礎値 (NA-NI 群) は、 0.001223 ± 0.001014 (内部標準補正值 : CRF mRNA/GAPDH mRNA) であり、capsaicin 注入後 5 分で 0.009748 ± 0.007343 、15 分で 0.005242 ± 0.002465 、30 分で 0.005203 ± 0.002680 、60 分で 0.02859 ± 0.02143 の値を示し、注入後 60 分で有意な増加を示した ($p=0.04$) (図 4)。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① K Sugimoto, A Kanail, N Shoji. The effectiveness of the Uchida-Kraepelin test for psychological stress: an analysis of plasma and salivary stress substances. *BioPsychoSocial Med*, 3-5, 2009. 査読有
- ② 杉本是明、庄司憲明、笠原江利子、山本光璋. SWC元気点検票の心療内科疾患患者への適用経験. 感性福祉研究所年報、9:33-40, 2008 査読無
- ③ 笠原江利子、庄司憲明、金井あや、杉本是明 SWC元気点検票と内田クレペリン検査およびSF-36の相互関係について感性福祉研究所年報、9:41-50, 2008 査読無
- ④ 笠原江利子、庄司憲明、金井あや、笠原

紳、杉本是明 自律訓練法によるSWC元気点検票への影響—心身医学療法を“攻めの健康法”に応用する研究—福祉研究所年報、9:51-62, 2008 査読無

- ⑤ 杉本是明、庄司憲明、佐藤しづ子、笹野高嗣、中山孝子、杉本是孝. 歯科から心療内科に紹介された口腔心身症に関する臨床的考察—主体的な心身医学療法の復権を目指して—日本歯科心身医学会雑誌第22巻17-22, 2007 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 庄司憲明, 顎顔面領域の痛みが口腔諸組織およびHPA axisに及ぼす影響. 第8回遺伝子病制御研究所 研究交流セミナー. (2010年1月28日札幌)
- ② 庄司憲明、片浦貴俊、杉本是明、笹野高嗣. 舌カプサイシン刺激が視床下部—下垂体—副腎系に及ぼす影響—視床下部CRF遺伝子を指標として—, 第3回三叉神経領域の感覚—運動統合機構研究会, (2009年10月4日軽井沢)
- ③ Noriaki Shoji, Taniguchi Masamitsu, Masahiro Iikubo, Yoichi Shimeno, Takashi Sasano. Neural bloodflow regulation in rat tongue by chorda-lingual nerve stimulation. IADR 86th General Session & Exhibition 2008年7月5日 Toronto (Canada)
- ④ Kataura T, Sugimoto K, Shoji N, Sasano T The effect of trigeminal afferent stimulation on HPA axis IADR 86th General Session & Exhibition 2008年7月3日 Toronto (Canada)
- ⑤ 杉本是明、庄司憲明、片浦貴俊、笹野高嗣 ラット急性舌痛刺激が HPA axis に及ぼす影響について—定量 PCR による脳内ストレス応答遺伝子発現の検討—第48回日本心身医学会総会 2008年6月13日札幌
- ⑥ 片浦貴俊、庄司憲明、杉本是明、笹野高嗣. 舌への痛み刺激が視床下部—下垂体—副腎系に及ぼす影響について。第52回東北大学歯学会 2007年12月12日仙台
- ⑦ KOREAKI SUGIMOTO, AYA KANAI, NORIAKI SHOJI. TIME COURSE OF HUMAN SALIVARY STRESS PEPTIDES (AMYLASE, IGA, CHROMOGRANIN A) AFTER PSYCHOLOGICAL STRESSOR EXAMINATION, UCHIDA-KRAEPELIN TEST. The 23rd International Symposium on Cerebral Blood Flow, Metabolism & Function (Brain' 07) 2007 May 22 OSAKA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 憲明 (SHOJI NORIAKI)

東北大学・病院・講師

研究者番号：70250800

(2) 研究分担者

杉本 是明 (SUGIMOTO KOREAKI)

東北福祉大学・総合福祉学部・講師

研究者番号：30361158

笹野 高嗣 (SASANO TAKASHI)

東北大学・大学院歯学研究者・教授

研究者番号：10125560

佐藤 しづ子 (SATO SHIZUKO)

東北大学・大学院歯学研究者・助教

研究者番号：60225274

菅原 由美子 (SUGAWARA YUMIKO)

東北大学・病院・助教

研究者番号：30235866

(3) 連携研究者

()

研究者番号：