

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18619

研究課題名(和文) 口腔内機械痛覚過敏発症機構に及ぼす加齢性変調の解明

研究課題名(英文) Age related modulation on the mechanism of onset of mechanical hyperalgesia in the oral cavity

研究代表者

浦田 健太郎 (URATA, Kentaro)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号：60754398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜疼痛に対する老化の影響を炎症型M1/抗炎症型M2に変化する三叉神経節(TG)マクロファージに着目し検討した。口蓋粘膜を切開した老齢マウス(SAMP8)と若齢マウス(SAMR1)を使用した。SAMP8はSAMR1と比べ切開後の機械アロディニアが増強し、TGでのM1/CCL2共発現が増加した。CCL2中和抗体のTG内投与は、SAMP8の機械アロディニアを抑制した。非切開SAMP8へのCCL2のTG内投与は、TG中のCCR2/Nav1.8共発現を増加し、機械アロディニアを発症した。老化によりマクロファージの性質変化はM1へ亢進し、M1由来CCL2が機械アロディニアを増強することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

総義歯装着中の高齢患者への診療時に、顎堤粘膜の潰瘍の有無と疼痛の有無とが相関しない場面に遭遇することがある。老化が疼痛へ及ぼす影響は、皮膚では多く報告を認めるが、口腔粘膜を調べた報告は少なく不明な現状にある。本研究の結果、口腔粘膜損傷後の機械刺激による疼痛は老化により増強し、この疼痛増強は、損傷部を支配する三叉神経節中のマクロファージの性質が老化により炎症性へ亢進する事が関与する事を明らかにした。老化による口腔粘膜疼痛受容機構の変調原因の一端を解明したことは学術的意義を持ち、高齢者に対する歯科臨床に有用な新規治療法の開発や診断法の開発に対し重要な基礎データを与える社会的意義を持つものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of aging on oral mucosal pain, focusing on trigeminal ganglion (TG) macrophages that change into inflammatory type M1/anti-inflammatory type M2. Older mice (SAMP8) and younger mice (SAMR1) with incised palatal mucosa were used. SAMP8 showed enhanced mechanical allodynia after incision and increased M1/CCL2 co-expression in TGs compared to SAMR1. Intra-TG administration of CCL2 neutralizing antibody suppressed mechanical allodynia in SAMP8. Intra-TG administration of CCL2 to non-incised SAMP8 increased CCR2/Nav1.8 co-expression in TG and caused mechanical allodynia. Aging increases macrophage disposition toward M1, suggesting that M1-derived CCL2 enhances mechanical allodynia.

研究分野：口腔生理学，歯科補綴学 口腔粘膜疼痛，口腔粘膜感覚に及ぼす老化の影響

キーワード：老化 口腔粘膜 疼痛 機械アロディニア SAMP8 マクロファージ CCL2 三叉神経節

様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経系に様々な変化を引き起こし疼痛受容機構に影響を及ぼす要因の一つに、老化が知られている。補綴臨床では、明らかな潰瘍が存在するのに疼痛を訴えない患者や、明らかな潰瘍が存在しないのに疼痛を訴える高齢の患者に遭遇することがある。また、老化による疼痛への影響は口腔外では多く報告を認める一方で、口腔内を調べた近年の報告は少なく不明確な現状にある。近年、顎顔面領域の疼痛調節に対し、三叉神経節 (TG) 中のマクロファージの関与が注目されている。マクロファージは、組織損傷時や炎症時に活性化した後、炎症型 (M1) と抗炎症型 (M2) に性質変化し、M1 は炎症性、M2 は抗炎症性のケミカルメディエーターを放出することで疼痛の増強あるいは減弱に関与することが報告されている。しかしながら、老化がマクロファージの性質変化にどのような影響を及ぼすかは不明確であり、口腔粘膜を焦点にあてた研究は皆無である。このような研究の学術的背景をもとに、本研究課題では、いまだ明らかではない口腔粘膜損傷後における、一次ニューロンのマクロファージ性疼痛調節機構に老化がどのような変調を生じさせるのか？を学術的「問い」とし、超高齢社会となった今、歯科補綴臨床に対しその解明が与える意義は大きいと考えた。

2. 研究の目的

本研究では老化促進モデルマウスを用い、顎顔面領域の侵害情報が入力される TG での、口腔粘膜切開後におけるマクロファージの M1/M2 性質変化及び各マクロファージ由来のケミカルメディエーターの発現を正常マウスと比較することで、老化によるマクロファージ性疼痛受容機構の変調を解明し、高齢者に対する補綴臨床に有用な新規治療法の開発や診断法の開発において重要な基礎データを与えることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 口蓋粘膜切開モデルマウスの作製

老化促進モデルマウス (SAMP8 雄性 23 週齢) 及び老化のコントロール群として正常老化モデルマウス (SAMR1 雄性 23 週齢) を使用した。各マウスの左側上顎大白歯部より 1mm 離れた位置の口蓋粘膜に長さ 5mm 深さ 1mm の切開を付与した。SAMP8 切開群、SAMP8 非切開群、SAMR1 切開群、SAMR1 非切開群の 4 群を各実験に用い、比較検討した。

(2) 機械刺激時のマウスの逃避反射閾値測定による行動観察実験

切開処置後、イソフルラン吸入による浅麻酔下にて、口蓋の切開線中央から 1mm 内方の部位に、デジタルフォンプライによる機械刺激を加え、徐々に刺激強度を増加させ、マウスに頭部引っ込め反射が認められた刺激強度を機械逃避反射閾値、以下 MHWT とし経日的に測定した。

(3) 免疫組織化学的解析

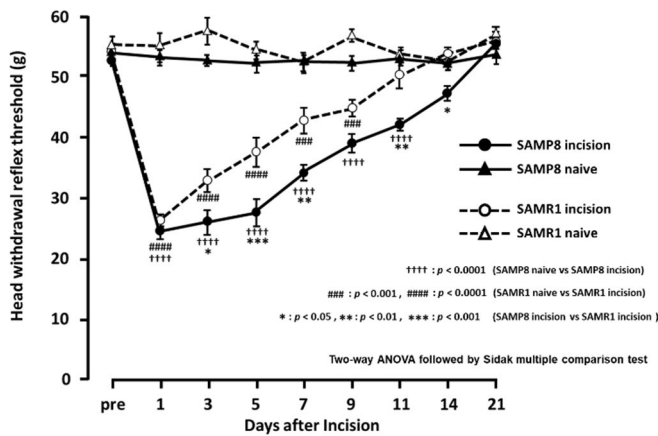
口蓋切開部を支配する TG ニューロンを標識するために、左側口蓋粘膜に、神経逆行性トレーサーである FG を 5 μ l 注入した。FG 注入後 4 日目に口蓋粘膜切開を行い、行動観察実験で老化による口蓋部機械アロディニアへの特徴的な影響を認めた日時に、深麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定後、三叉神経節を摘出し、凍結切片を作製した。口蓋部を支配する、三叉神経第 2 枝領域における FG 標識されたニューロン周囲の Iba1 (マクロファージマーカー)、CD11c (M1 マクロファージマーカー)、CD206 (M2 マクロファージマーカー) 各陽性細胞、CD11c と CCL2 の共陽性細胞、CD206 と TGF- β の共陽性細胞の発現を免疫組織化学的に解析した。また、TG へのリコンビナント CCL2 投与後における CCL2 受容体 (CCR2) とイオンチャネル (Nav1.8) の共陽性細胞の発現も免疫組織化学的に解析した。

(4) 行動薬理学的解析

TG に直接的かつ持続的に薬液を投与するためにカニューレ設置手術を行った。SAMP8 マウスの頭蓋骨を露出させ、左側 TG 直上部 (小泉門から 2.8 mm 前方, 矢状縫合の 1.2 mm 外側) を骨削し, 直径 1 mm の小孔を付与。ガイドカニューレを小孔から頭蓋骨表面より 6 mm 下方まで挿入した後, 歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。続いて 26 ゲージ針, ポリエチレンチューブ及び CCL2 中和抗体あるいはリコンビナント CCL2 を貯留した浸透圧ミニポンプを接続し, カニューレから TG 内に挿入し固定することで各薬液を持続投与した。カニューレ設置手術後に 3 日の回復期を設けた後, SAMP8 切開群へは口蓋粘膜切開処置を行い, MHWT の測定を行動観察実験と同様のスケジュールで行った。尚, SAMP8 切開群へは CCL2 中和抗体を, SAMP8 非切開群へはリコンビナント CCL2 を投与した。

4. 研究成果

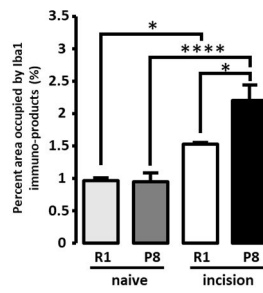
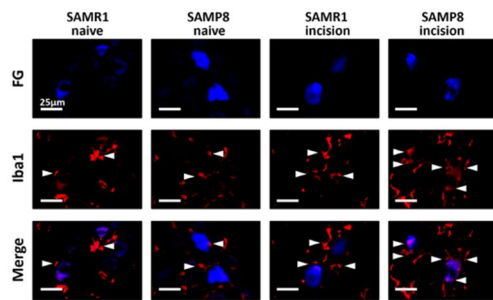
(1) 行動観察実験 (口蓋粘膜切開後の MHWT の経日的変化)



切開処置により, SAMP8 と SAMR1 はともに MHWT の有意な低下を認め, SAMP8 は SAMR1 と比較して切開後 3 日目から 14 日目まで MHWT の有意な低下を認めた。老化により口蓋部の機械アロデニアは増強することが明らかとなった。

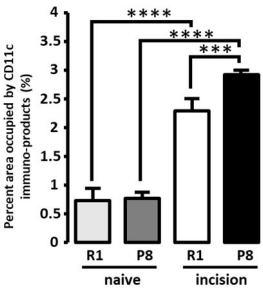
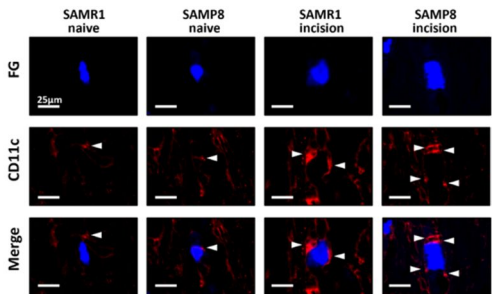
(2) 免疫組織化学的解析

TG における切開処置後のマクロファージの変化



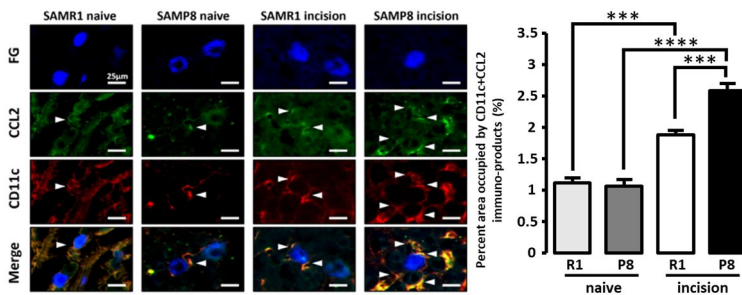
切開処置後 3 日目において, SAMP8 切開群は他の群と比較して有意に多くの Iba1 陽性細胞の発現を認めた。口蓋部機械アロディニア発症時, 老化により TG のマクロファージは増加することが明らかとなった。

TG における切開処置後の M1 マクロファージの変化



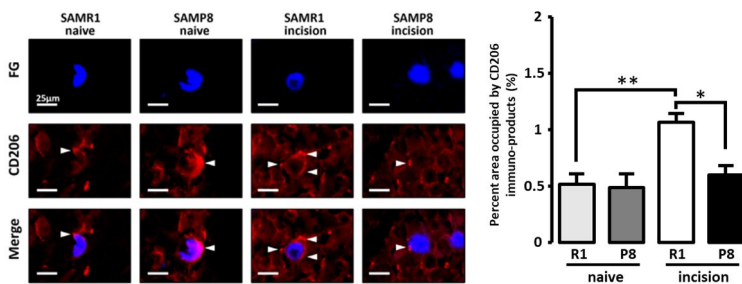
切開処置後 3 日目において, SAMP8 切開群は他の群と比較して有意に多くの CD11c 陽性細胞の発現を認めた。口蓋部機械アロディニア発症時, 老化によりマクロファージの性質変化は, 炎症性 M1 へ亢進することが明らかとなった。

TG における切開処置後の M1 マクロファージ関連性 CCL2 の変化



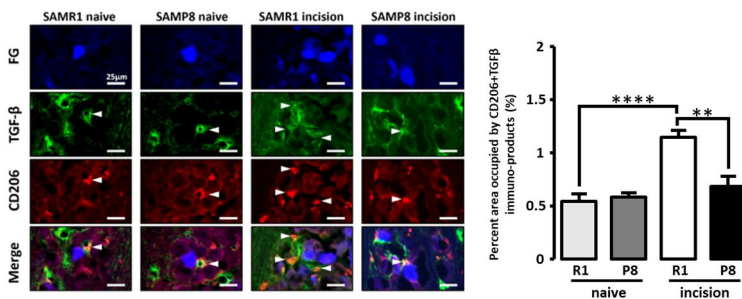
切開処置後 3 日目において、SAMP8 切開群は他の群と比較して CD11c/CCL2 共陽性細胞の有意に多くの発現を認めた。口蓋部機械アロディニア発症時、老化により M1 マクロファージ由来の炎症性因子の CCL2 の放出は増加することが明らかとなった。

TG における切開処置後の M2 マクロファージの変化



切開処置後 3 日目において、SAMR1 切開群は他の群と比較して有意に多くの CD206 陽性細胞の発現を認めた。口蓋部機械アロディニア発症時、老化によりマクロファージの性質変化は、抗炎症性 M2 へは減弱することが明らかとなった。

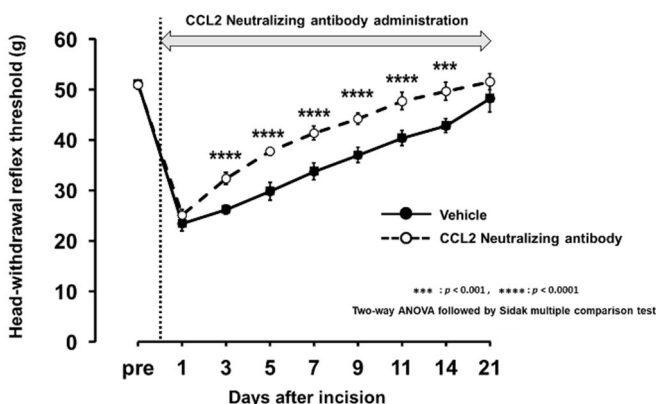
TG における切開処置後の M2 マクロファージ関連性 TGF-β の変化



切開処置後 3 日目において、SAMR1 切開群は他の群と比較して CD206/TGF-β 共陽性細胞の有意に多くの発現を認めた。口蓋部機械アロディニア発症時、老化により M2 マクロファージ由来の抗炎症性因子 TGF-β の放出は減弱することが明らかとなった。

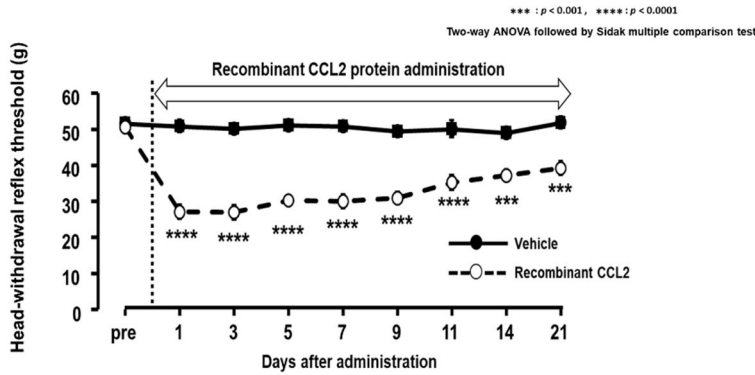
(3) 行動薬理的解析

SAMP8 切開群への CCL2 中和抗体投与後の MHWT の変化



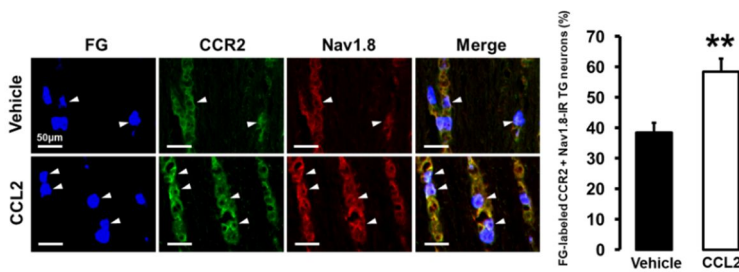
切開処置により有意に低下した MHWT は、炎症性因子 CCL2 の中和抗体を投与すると、溶媒のみを投与した群と比較して、有意に MHWT 低下の抑制を認めた。老化により増強した機械アロディニアは CCL2 中和抗体により抑制されることが明らかとなった。

SAMP8 非切開群へのリコンビナント CCL2 投与後の MHWT の変化



SAMP8 非切開群にリコンビナント CCL2 を投与すると、溶媒投与群と比較して有意な MHWT の低下を認めた。SAMP8 非切開マウスへの CCL2 投与により機械アロディニアが発症することが明らかとなった。

(4) SAMP8 非切開群へのリコンビナント CCL2 投与後の TG における CCR2/Nav1.8 共陽性細胞発現の免疫組織化学的解析



溶媒投与群と比較してリコンビナント CCL2 投与群では、TG での CCR2 と Nav1.8 の共発現が有意に増加した。CCL2 が TG で増加すると CCR2 を介して Nav1.8 が増加することが明らかとなった。

研究計画当初予定していた M1 マクロファージから放出される炎症性サイトカインの TNF- α 、および M2 マクロファージから放出される抗炎症性サイトカインの IL-4 は、免疫組織化学的解析の結果、老化による有意な差が得られなかった。各マクロファージから放出される炎症性あるいは抗炎症性因子においては、老化の影響をすべてが共通して受けない可能性も考え得る。このことは本研究における当初予期していなかった、新たな知見と考えている。

以上の結果より、口蓋粘膜損傷後において、TG でのマクロファージの性質変化は老化により M1 への亢進が生じ、M1 から放出される CCL2 が TG 細胞に発現する CCR2 を介して Nav1.8 の発現増加及び活性化を生じさせることで、口蓋部機械アロディニアが老化により増強及び持続することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Oto Tatsuki, Urata Kentaro, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Shibuta Ikuko, Iwata Koichi, Iinuma Toshimitsu, Shinoda Masamichi	4. 巻 256 - (4)
2. 論文標題 Age-Related Differences in Transient Receptor Potential Vanilloid 1 and 2 Expression Patterns in the Trigeminal Ganglion Neurons Contribute to Changes in the Palatal Mucosal Heat Pain Sensitivity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Tohoku Journal of Experimental Medicine	6. 最初と最後の頁 283 - 290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1620/tjem.2022.J004	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大音 樹, 浦田健太郎, 藤原慎太郎, 西尾健介, 李 淳, 池田貴之, 伊藤智加, 高津匡樹, 浜野 裕, 千葉浩志, 飯沼利光
2. 発表標題 加齢が口腔粘膜損傷後のマクロファージによる疼痛調節に及ぼす影響
3. 学会等名 第130回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大音樹, 浦田健太郎, 生田目大介, 西尾健介, 池田貴之, 伊藤智加, 岡田真治, 高津匡樹, 伊藤賢, 有輪芳明, 飯沼利光
2. 発表標題 口腔粘膜損傷後に発症する機械・熱痛覚過敏への加齢による影響
3. 学会等名 第129回日本補綴歯科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 大音樹, 岡田真治, 伊藤玲央, 飯沼利光
2. 発表標題 加齢が口腔内疼痛受容機構に及ぼす影響
3. 学会等名 日本老年歯科医学会学会創立30周年記念大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 浦田 健太郎, 大音 樹, 飯沼 利光
2. 発表標題 老化による口腔粘膜疼痛感受性変化に対する免疫応答の役割
3. 学会等名 第69回日本顎口腔機能学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浦田 健太郎, 大音 樹, 西尾 健介, 李 淳, 高津 匡樹, 飯沼 利光
2. 発表標題 加齢によるTRPV1及びTRPV2発現の変化が口腔粘膜の疼痛感受性に及ぼす影響
3. 学会等名 第33回日本老年歯科医学会学術大会
4. 発表年 2022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
---------	---------