

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10123

研究課題名(和文) 幼少期ストレスによる頭頸部疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Orofacial pain mechanism due to infant stress

研究代表者

澁田 郁子(鈴木郁子)(SHIBUTA, Ikuko)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：60459906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：生後4日目のラット口髭部皮膚に切開縫合し、さらに生後7週目に口髭部皮膚を再切開した群では、機械逃避反射閾値の低下が亢進し、小型から中型の口髭部投射Nav1.8陽性TGニューロン数の増加が亢進した。また、再切開群においてNav1.8阻害により機械逃避反射閾値低下の亢進が抑制された。三叉神経節内のマクロファージにCCL2が発現し、CCR2の阻害は口髭部投射Nav1.8陽性TGニューロン数の増加を抑制した。新生児期切開による成体期切開後の機械痛覚過敏亢進には、CCL2シグナルを介した口髭部投射TGニューロンでのNav1.8発現増加によるニューロン活動亢進が関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまで注目されてこなかった幼少期ストレス負荷による免疫細胞-侵害受容ニューロン間コミュニケーションの可塑的变化によって発症する頭頸部疼痛の分子基盤を解明したことであり、学術的独自性が高い研究であると確信する。本研究の成果は、幼少期ストレス負荷に起因した成熟期に発症する顎顔面部領域の異常疼痛発症のメカニズム解明に留まらず、臨床応用を念頭においてEBMに基づいた異常疼痛治療に対するターゲット分子の同定に寄与し、新規治療法の創造に繋げることができる。

研究成果の概要(英文)：The involvement of the Nav1.8 and the CCL2/CCR2 signaling in the trigeminal ganglion (TG) in facial skin incisional pain hypersensitivity was examined. The whisker pad skin was incised on postnatal day 4 and week 7. Mechanical hypersensitivity was enhanced in Incision-Incision group. The number of Nav1.8-immunoreactive TG neurons and the amount of CCL2 expressed in the macrophages and satellite glial cells in the TG were increased on day 14 after re-incision in the Incision-Incision group. Blockages of Nav1.8 and CCR2 suppressed the enhancement of mechanical hypersensitivity in the Incision-Incision group. CCL2 enhanced mechanical hypersensitivity. Our results suggest that neonatal facial injury accelerates the TG neuronal hyperexcitability following orofacial skin injury in adult in association with Nav1.8 overexpression via CCL2 signaling, resulting in the enhancement of orofacial incisional pain hypersensitivity in the adulthood.

研究分野：口腔生理学

キーワード：幼少期ストレス 一次侵害受容ニューロン 三叉神経節

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

幼少期の精神的および身体的ストレスは感覚神経系の生後発達にさまざまな影響を与えることが知られていることから、幼少期ストレスが成熟期に発症する異常疼痛の調節に関与することは容易に想像できる。例えば、幼児期にネグレクトを経験すると大腸痛覚過敏の発症率が高くなること、頭頸部痛の程度を増悪させることが報告されている。このように、幼少期ストレスが成熟期における異常疼痛と密接に関連しているということは多くの臨床医にとって周知の事実であるにもかかわらず、幼少期ストレスに起因した成熟期に発症する頭頸部異常疼痛の発症メカニズムはほとんどわかっていないのが現状である。

近年、精神的および身体的ストレスにより増加する副腎皮質からのコルチコステロンは、神経系に可塑的变化をもたらすことが明らかにされつつある。われわれは、母子分離ストレスにより増加した血中コルチコステロンが顎顔面領域に投射する一次侵害受容ニューロンの興奮性を増強し、顎顔面領域に機械痛覚過敏を発症させることを突き止めた。

またわれわれの予備実験から、幼少期の顔面部外傷により、成人期の顔面部外傷後に顎顔面の広い領域に過度の機械痛覚過敏が発症し、三叉神経節内における衛星細胞の活性化が増強することを確認している。また、三叉神経節内においては、衛星細胞の活性化が他の衛星細胞の活性化を調節するという空間的機能的連関が存在することが報告されている。以上より、幼少期ストレスによる衛星細胞活性化を起因とする三叉神経節内の衛星細胞と一次侵害受容ニューロン間コミュニケーション機構の可塑的变化が成人期における一次侵害受容ニューロンの興奮性の増強に関与していることが予想される。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、幼少期ストレス負荷に起因した成人期に発症する顎顔面部領域の異常疼痛に対する三叉神経節内の衛星細胞の機能的役割を明らかにすることである。本研究は、幼少期ストレス負荷による三叉神経節内のマクロファージ - 衛星細胞 - 侵害受容ニューロン間コミュニケーションの可塑的变化によって発症する頭頸部疼痛の分子基盤を解明することであり、学術的独自性が高い研究であると確信する。本研究の成果は、幼少期ストレス負荷に起因した成人期に発症する顎顔面部領域の異常疼痛発症のメカニズム解明に留まらず、臨床応用を念頭において EBM に基づいた異常疼痛治療に対するターゲット分子の同定に寄与し、新規治療法の創造に繋げることができる。

### 3. 研究の方法

(1) 生後 4 日目、雄性 SD ラットの口髭部皮膚をイソフルラン吸入麻酔下にて切開縫合し、新生児期外傷性ストレスモデル動物を作製した。生後 7 週目に深麻酔下にて口髭部皮膚を再切開し、再切開処置後 14 日目まで隔日的に同部位への機械刺激に対する逃避閾値の測定を行った。

(2) あらかじめ切開部皮膚へ神経逆行性トレーサー-Fluorogold(FG)を注入して口髭部皮膚投射三叉神経節ニューロンを標識した後、再切開処置後 14 日目に三叉神経節を摘出した。口髭部投射三叉神経節ニューロンにおける Nav1.8 発現を免疫組織化学的に解析した。

(3) 再切開処置後 14 日目に Nav1.8 阻害薬を再切開部皮下へ投与し、投与後 120 分間の機械逃避閾値の変化を計測した。

(4) 再切開処置後 14 日目、三叉神経節における CCL2 陽性細胞の局在を同定した。さらに、再切開処置後 2,4,14 日目において三叉神経節における CCL2 量をウエスタンブロット法により定量した。

(5) 再切開処置後 14 日間、CCR2 拮抗薬を三叉神経節内投与し、機械逃避閾値の変化を計測した。再切開処置後 14 日目、三叉神経節における CCR2 陽性細胞の局在を同定し、FG 標識 CCR2 陽性かつ Nav1.8 陽性ニューロンの変化を解析した。

(6) 非ストレス群ラットに CCL2 を三叉神経節内投与し、機械逃避閾値の変化を計測した。

(7) 再切開処置後 14 日間、NF- $\kappa$ B 阻害薬を三叉神経節内投与し、機械逃避閾値の変化を計測した。

### 4. 研究成果

(1) 再切開処置後 10 日目以降、新生児期外傷性ストレス群において口髭部皮膚の機械逃避閾

値の低下が有意に亢進した ( 図 1 )

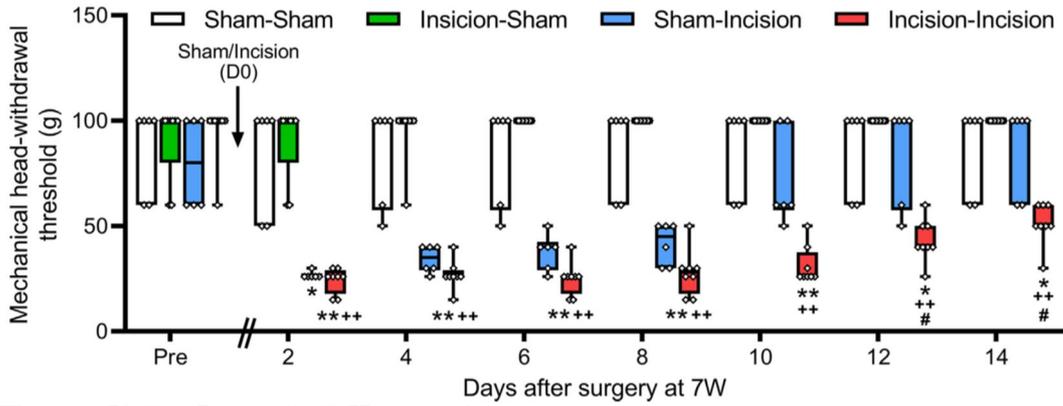


図 1 口髭部皮膚の機械逃避閾値の変化

( 2 ) 小型から中型の口髭部投射 Nav 1.8 陽性三叉神経節ニューロン数が有意に増加した ( 図 2 )

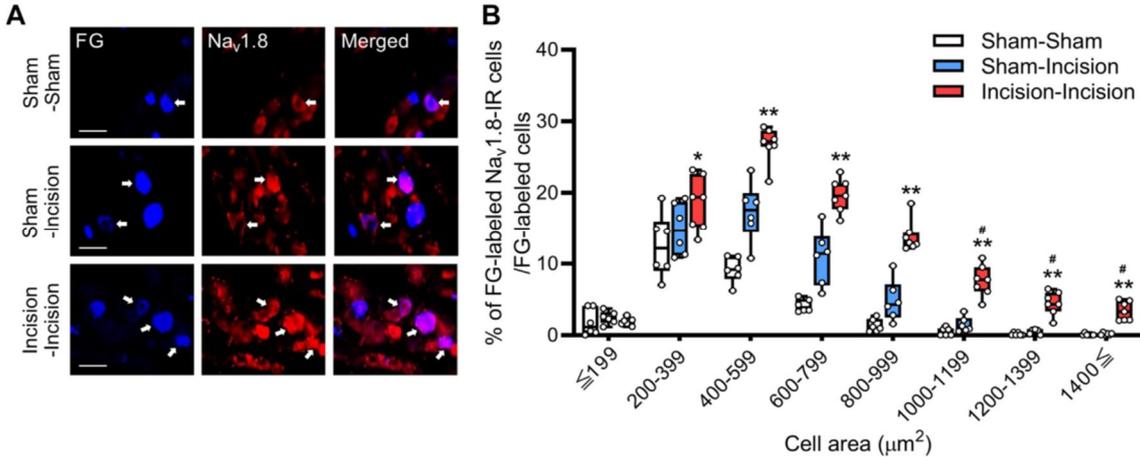


図 2 再切開処置後 14 日目の三叉神経節ニューロンにおける Nav1.8 発現。(A) FG 標識 Nav1.8 陽性三叉神経節ニューロン (B)FG 標識 Nav1.8 陽性ニューロンのサイズ分布

( 3 ) 機械逃避閾値低下の亢進が濃度依存的に抑制された ( 図 3 )

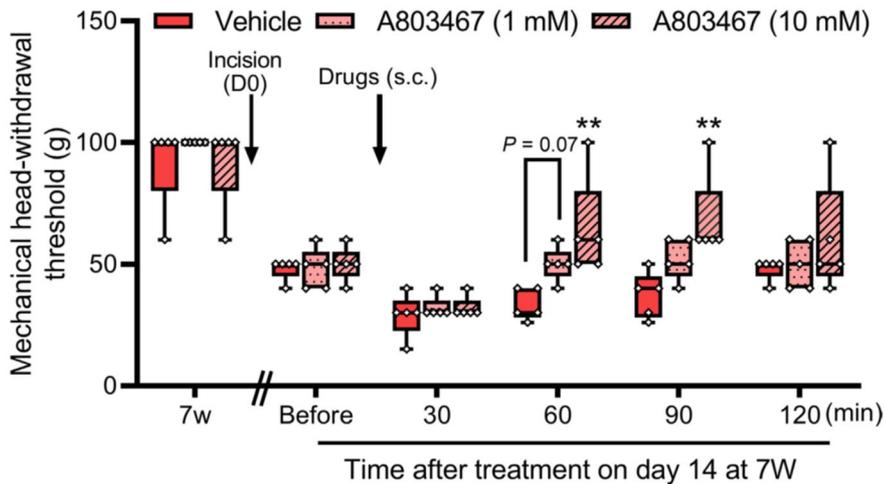


図 3 Nav1.8 阻害薬の再切開部皮下投与 30, 60, 90, 120 分後の口髭部皮膚の機械逃避閾値の変化

( 4 ) 三叉神経節に存在するマクロファージおよび衛星細胞に CCL2 の発現を認めた。再切開処置後 14 日目において、新生児期外傷性ストレス群での CCL2 量の有意な増加が認められた ( 図 4 )

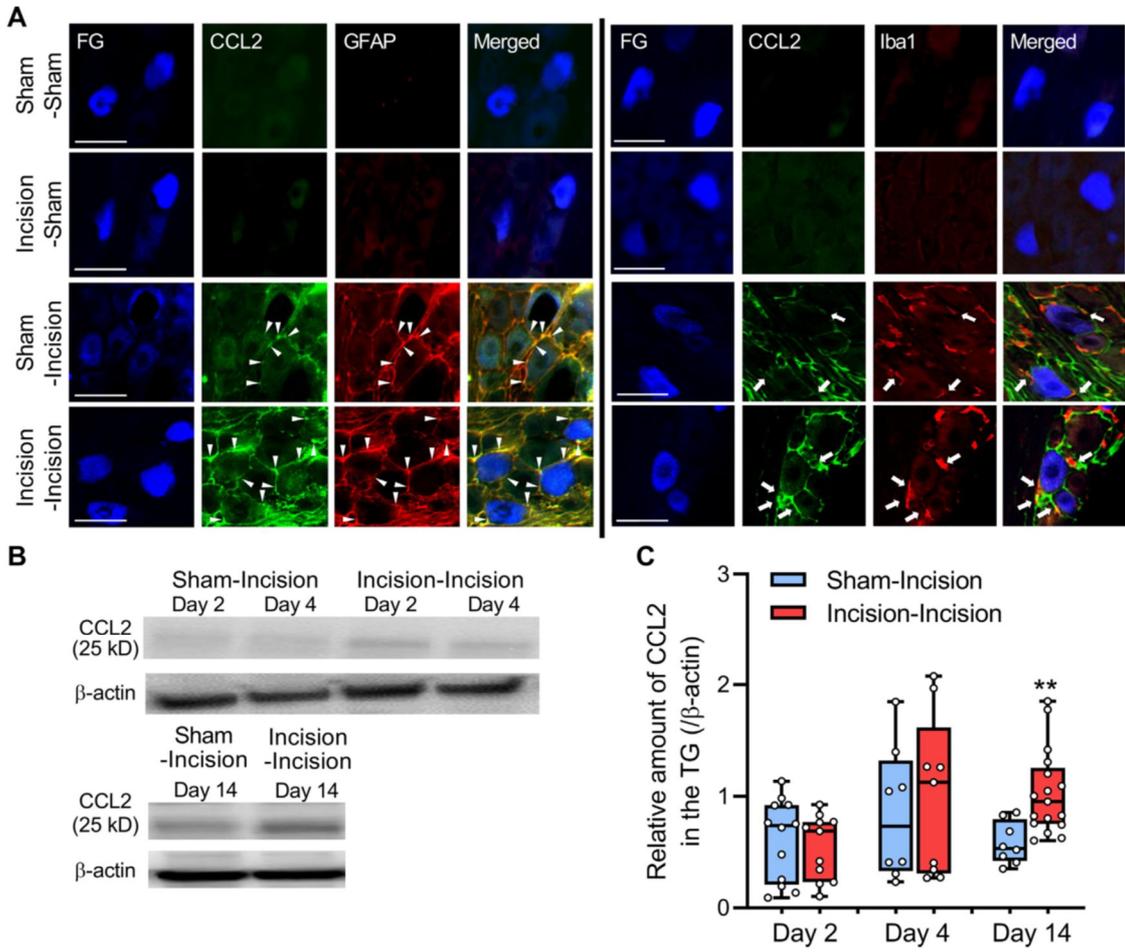


図4 再切開処置後14日目の三叉神経節ニューロンにおけるCCL2発現。(A)CCL2陽性細胞の局在 (B,C) 再切開処置後2,4,14日目の三叉神経節におけるCCL2量の変化

(5) 再切開処置後のCCR2拮抗薬三叉神経節内投与は、機械逃避閾値の低下を抑制した。CCR2はFG標識Nav1.8陽性ニューロンに発現し、CCR2拮抗薬三叉神経節内投与により、再切開処置後の口髭部投射Nav1.8陽性三叉神経節ニューロン数の増加が抑制された(図5)

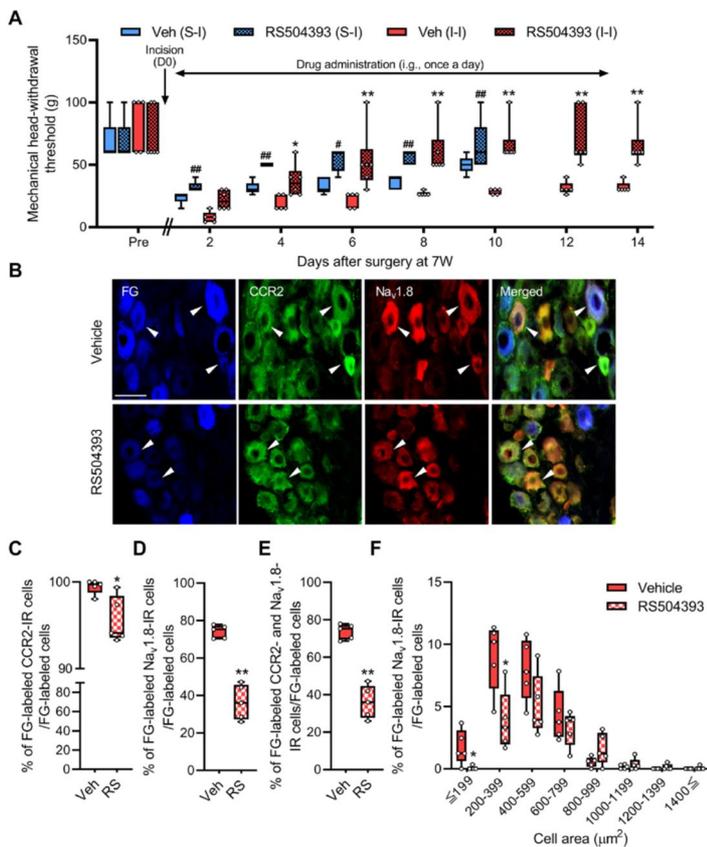


図5 口髭部皮膚の機械逃避閾値および Nav1.8 の発現における CCL2/CCR2 シグナルの関与。(A) 再切開処置後の CCR2 拮抗薬三叉神経節内投与による機械逃避閾値の変化 (B)口髭部投射 CCL2 陽性細胞および Nav1.8 陽性細胞の三叉神経節における局在 (C,D,E)再切開処置後の CCR2 拮抗薬三叉神経節内投与による FG 標識 Nav1.8 陽性ニューロン数の変化 (F)FG 標識 Nav1.8 陽性ニューロンのサイズ分布

(6) 非ストレス群ラットへの CCL2 の三叉神経節内投与は、機械逃避閾値を有意に低下させた(図6)

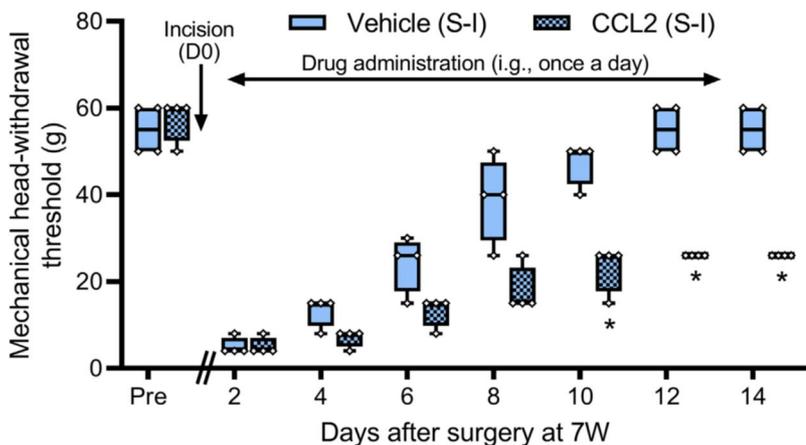


図6 三叉神経節内 CCL2 投与後の口髭部皮膚における機械逃避閾値の変化

(7) 再切開処置後の NF-κB 阻害薬三叉神経節内投与は、機械逃避閾値の低下を抑制した(図7)

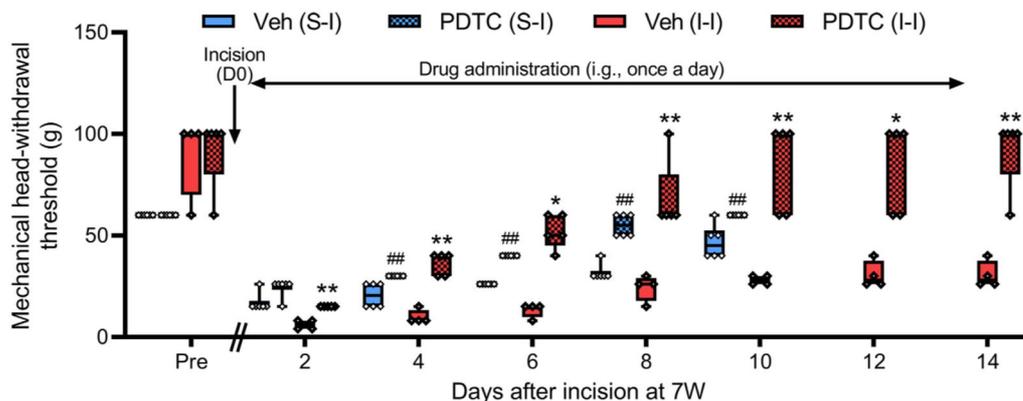


図7 再切開処置後の NF-κB 阻害薬三叉神経節内投与による機械逃避閾値の変化

以上より、新生児期の顔面部外傷性ストレスは、三叉神経節に存在する衛星細胞からの CCL2 シグナリングを介して一次侵害受容ニューロンにおける Nav1.8 発現増強を誘導する。その結果、一次侵害受容ニューロンの興奮性が増強し、顔面部皮膚に異常疼痛が発症したと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Soma Kumi, Hitomi Suzuro, Hayashi Yoshinori, Soma Chihiro, Otsuji Jo, Shibuta Ikuko, Furukawa Akihiko, Urata Kentaro, Kurisu Ryoko, Yonemoto Mamiko, Hojo Yasushi, Shirakawa Tetsuo, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 519
2. 論文標題 Neonatal Injury Modulates Incisional Pain Sensitivity in Adulthood: An Animal Study	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 60～72
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2023.03.018	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 Otsuji Jo, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Soma Chihiro, Soma Kumi, Shibuta Ikuko, Iwata Koichi, Shirakawa Tetsuo, Shinoda Masamichi	4. 巻 12
2. 論文標題 Decreased PPARgamma in the trigeminal spinal subnucleus caudalis due to neonatal injury contributes to incision-induced mechanical allodynia in female rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19314
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-23832-3	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部生理学講座 <a href="http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/g.physiology/">http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/g.physiology/</a>
---

## 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
研究分担者	篠田 雅路  (Masamichi Shinoda)  (20362238)	日本大学・歯学部・教授    (32665)	
研究分担者	三枝 禎  (Saigusa Tadashi)  (50277456)	日本大学・松戸歯学部・教授    (32665)	
研究分担者	人見 涼露  (Hitomi Suzuro)  (70548924)	日本大学・歯学部・講師    (32665)	
研究分担者	林 良憲  (Hayashi Yoshinori)  (80582717)	日本大学・歯学部・准教授    (32665)	

## 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