

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593082

研究課題名(和文) 視床下部CRH遺伝子発現を指標とした顎顔面領域における慢性痛発症機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the chronic pain mechanism in the maxillofacial area using index of CRH gene expression in hypothalamus

研究代表者

笠原 江利子 (Kasahara, Eriko)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：50597325

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：近年、非定型歯痛、舌痛症など顎顔面領域の慢性疾患患者は増加傾向にある。しかし、これらの発症機序及び治療法は確立されていない。そこで、我々は診断及び治療法の開発を目的とし、痛みをストレスとして捉え、痛みストレスの視床下部 下垂体 副腎系、室傍核(PVN)への影響を調べるため、三叉神経の支配領域である舌尖部にカプサイシン溶液を注入し、急性疼痛刺激やその後生じる神経損傷による変化について調査した。神経興奮マーカーであるc-fos遺伝子の発現を指標として調べた結果、カプサイシンによる痛み刺激により生じるストレスは、PVN及び三叉神経節におけるc-fos遺伝子発現を誘発することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Recently, patients having chronic pain in the maxillofacial region, atypical odontalgia and glossodynia are increasing, and this becomes a social problem. However, it is not clear the mechanism of chronic pain and method of treatment. The aim of this study is diagnosis of stress of pain and correct therapy. We considered that the pain is one of impression as stressor, and analyzed the influence of the stress on the hypothalamus-pituitary-adrenal(HPA) axis and paraventricular hypothalamic nucleus(PVN). In this study, we inject the solution of capsaicin at the tip of the rat tongue that is controlled by the mandibular nerve branched from the trigeminal nerve, and clear the change in PVN by acute pain stress and following nerve injury. It is provided that the c-fos gene transcription which is a neuronal exciting marker is increasing in both the hypothalamic PVN and the trigeminal ganglion.

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：CRH 急性痛 慢性痛 ストレス c-fos

1. 研究開始当初の背景

生理的な痛みは、生体に異常を知らせる重要な警告信号であり、生体が痛みを感じると闘争・逃走反応が誘発される。しかし、器質的な変化がないにもかかわらず軽度な刺激や交感神経系の興奮、心理的要因によって引き起こされる慢性的な痛み(慢性痛)は警告信号の役割を果たさない病的疼痛であり、QOLの低下をきたす。歯科臨床では「痛み」に対する治療を行うが、最近、非定型歯痛や舌痛症などの慢性疼痛患者が増加傾向にあり社会問題となっている。

ラットの足に機械的な急性刺激を与えると、心理的要素の強いストレスを与えた場合と同様に大脳皮質、外側中隔核、髄板内側核群及び視床下部室傍核(paraventricular hypothalamic nucleus: PVN)などに c-fos (神経興奮マーカー) 遺伝子が強発現し、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。痛みというストレスが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が明らかにされた。臨床においても、顎関節症患者や舌痛症患者など慢性疼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。また、侵害刺激となるストレスが視床下部-下垂体-副腎系(HPA axis)を介し、ホルモン系、自律神経系、免疫系との相互作用を経て、最終的に大脳辺縁系-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、痛みの感覚及び感情が誘発されることが知られている。

慢性疼痛の原因は炎症性のものと非炎症性のものに分類される。非炎症性のもは神経損傷に起因したものが多く、神経が化学的あるいは機械的損傷を受けると、その神経の末梢領域やその周囲で侵害刺激に対する閾値が低下し、通常では疼痛を惹起しない弱い刺激によっても疼痛が生じることが知られている。慢性疼痛モデル動物を調べてみると、損傷を受けた一次感覚ニューロンが、末梢で合成される神経成長因子(NGF)を受け取ることができなくなり、その一方で、同じ末梢領域・周囲の領域を支配し、損傷を免れた一次感覚ニューロンはNGFを過剰に取り込むことが知られている。このNGFの過剰取り込みが一次感覚ニューロンに異常な興奮を誘発し、疼痛閾値低下の原因の一つとなっている可能性が考えられている。

本研究で用いたトウガラシの辛み成分であるカプサイシンは、末梢に投与されると強い痛みを与えると同時に、神経損傷をもたらすことが知られている。この神経損傷は、一次感覚ニューロンにおけるNGFの取り込みや輸送が阻害されるためと考えられている。

2. 研究の目的

本研究では、三叉神経の下顎神経の支配領域である舌尖部にカプサイシン溶液を投

与し、急性の侵害刺激やその後生じる神経損傷による視床下部での変化について調べ、痛みストレスが視床下部-下垂体-副腎系(HPA axis) および三叉神経節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。

(1) capsaicin 溶液および vehicle 液注入後の視床下部室傍核(PVN)と三叉神経節組織の試料採取および解析

実験動物として、9~10週齢の雄性 Wistar 系ラット(体重200~300g)61匹を用いた。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30mM capsaicin 溶液(1% capsaicin + 10% ethanol + 10% Tween 80 + saline) 10 μ l を注入した31匹を capsaicin 群(注入5分後断頭n=6、同15分後n=6、同30分後n=6、同60分後n=7、同120分後n=6)及び vehicle (10% ethanol + 10% Tween 80 + saline) を10 μ l 注入した24匹を vehicle 群(注入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、ジエチルエーテル麻酔のみを行ったラットを control 群(n=6)とした。

断頭後即座(約5分以内)にRNaseを不活化するRNA laterTM(QIAGEN)の存在下にPVNおよび左側三叉神経節を摘出、その後急速冷凍(dry ice & n-Hexane dehydrated, -80 $^{\circ}$ C)し、Real Time PCR法によるmRNA発現量解析の資料として冷凍庫(-80 $^{\circ}$ C)に保存した。

PVNおよび左側三叉神経節のtotal RNAをTrizol-chloroform法(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にて抽出し、ジェノミックDNAのコンタミネーションをDNafreeTM(Ambion, Austin, TX, USA)で除去後、Super ScriptTMFirst-Strand Synthesis System for RT-PCR(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)を用いてcDNAを作成した。その後c-fosおよび β -actin(内部標準)の遺伝子発現について、iCycler(Bio-Rad Hercules, CA, USA)を用いてReal Time PCR解析を行った。

数値は、平均値 \pm 標準偏差で示した。capsaicin群におけるcontrol群と各時間群との有意差検定は、ANOVA分散分析を行った後、Dunnett testによる多重比較検定を行った。有意水準はいずれも5%未満とした。なお、統計ソフトはSPSS 15.0 for Windows (SPSS Japan Inc., Tokyo JAPAN)を用いた。

(2) capsaicin 溶液の注入後の視床下部室傍核(PVN)の試料採取および免疫組織学的解析

実験動物として9~10週齢のWistar系雄性ラットを用いた。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 30mM capsaicin 溶液(1 %capsaicin + 10% ethanol +10% Tween 80 + saline) 10 μ l を注入したラットを capsaicin 群 (注入後直ちに灌流固定 n= 1、注入 5 分後灌流固定 n=1、同 15 分後 n=1、同 60 分後 n=3、同 120 分後 n=3) とした。また、control 群 (ジエチルエーテル麻酔のみ n=1)、vehicle (10% ethanol +10% Tween 80 + saline) を 10 μ l 投与した vehicle 群 (注入後直ちに灌流固定 n=1、注入 5 分後灌流固定 n=1、同 15 分後 n=1、同 60 分後 n=2、同 120 分後 n=2) とした。灌流固定は、エーテルによる鎮静後、ネンプタール (1.0ml/Kg) を腹腔内に注入して麻酔導入後、ヘパリンを加えた 0.1M リン酸緩衝液 (PB) 150ml を左心室より流し脱血、次いで 4%パラホルムアルデヒド - 0.1M PB 溶液 300ml を用いて行った。control 群においても同様の方法で灌流固定を行った。

灌流固定したラットから脳を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液に 1 晩浸漬した。その後、20%スクロースを含む 0.01M PBS に 1 日以上浸漬し、大脳と小脳を除いて Tissue Tek OCT compound (サクラファインテックジャパン) に包埋後、-80 にて凍結ブロックを作成した。脳幹は、凍結ミクロトーム (CM3030S、Leica Microsystems、Germany) を用いて厚さ 30 μ m の浮遊切片を作成し、次いで、免疫組織学的染色を行った。作成した切片を 0.5% H_2O_2 にて内因性ペルオキシダーゼ処理を行った。その後、Goat 血清を加えた c-fos 抗体 (1:10000、Anti-c-Fos (Ab-5) 4-17 rabbit pAb Calbiochem) を加え、4 にて 2 晩培養した。切片洗浄後 ABC 法を行うため Biotinylated anti-rabbit IgG (H+L) (1:500 VECTOR Laboratories) を加え、次いで ABC 複合体

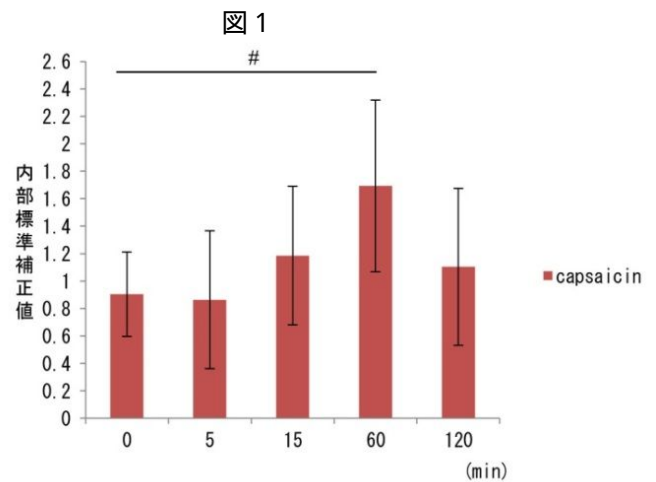
(avidin-biotin-horseradish peroxidase complex) と反応させた。0.05%ジアミノベンチジン Diaminobenzidine にて発色させた浮遊切片をスライドガラスに張り付け、アルコール - キシレン系列で脱水、オイキット (アズワン) を用いて封入した。コントロールとして、1 次抗体をノーマル Goat 血清に変えて染色を行ったが、免疫組織学的反応は認められなかった。

顕微鏡蛍光イメージングシステム (Leica) を用い、計測を行った。まず、1 枚の切片の左右の PVN 相当部において染色された c-fos 発現細胞数を計測し、両側を合算した。さらに、同個体の別の切片 (1 個体について約 3 枚選択) で c-fos 発現細胞数を計測し、1 個体の平均を出した。他の個体においても同様に個体の平均をとり、群別に 1 枚の切片の c-fos 発現の平均個数を算出した。また、群別に計測した切片での c-fos 発現細胞数の数値の範囲を Range (範囲) として示した。

4 . 研究成果

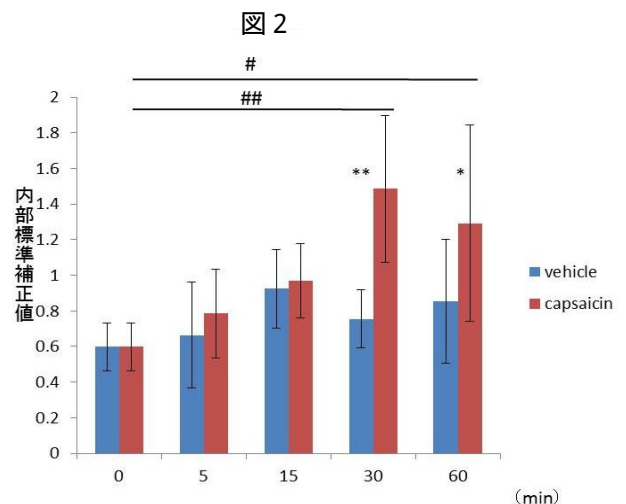
(1) capsaicin 溶液注入後の視床下部 PVN での c-fos 遺伝子発現の経時的変化 (図 1)

capsaicin 群の PVN での c-fos 遺伝子発現は、5 分群で 0.95 倍と減少したが、15 分群で 1.31 倍、60 分群で 1.87 倍、120 分群で 1.22 倍に増加した。control 群 vs capsaicin 群は、ANOVA 後に Dunnett test を行った (# $p<0.05$)。



(2) capsaicin 溶液および vehicle 注入後の左側三叉神経節での c-fos 遺伝子発現の経時的変化 (図 2)

capsaicin 群の三叉神経節での c-fos 遺伝子発現は、30 分群では control 群の 2.5 倍、また、60 分後には 2.16 倍に増加した。control 群 vs capsaicin 群は、ANOVA 後に Dunnett test を行った (# $p<0.05$ 、## $p<0.005$)、vehicle 群 vs capsaicin 群は、unpaired T test を行った (* $p<0.05$ 、** $p<0.01$)。



(3) capsaicin 溶液および vehicle 溶液注入後の PVN における c-fos 発現の免疫組織学的経時的変化

表 1 に capsaicin 溶液注入後の視床下部 PVN における c-fos 発現個数を示す。PVN において、capsaicin 溶液注入 15 分後ではコントロールと比較して c-fos 発現が増加しており、60 分後では、コントロールおよび vehicle 溶液注入 60 分後より増加していた。120 分後では、コントロールより増加していたが、

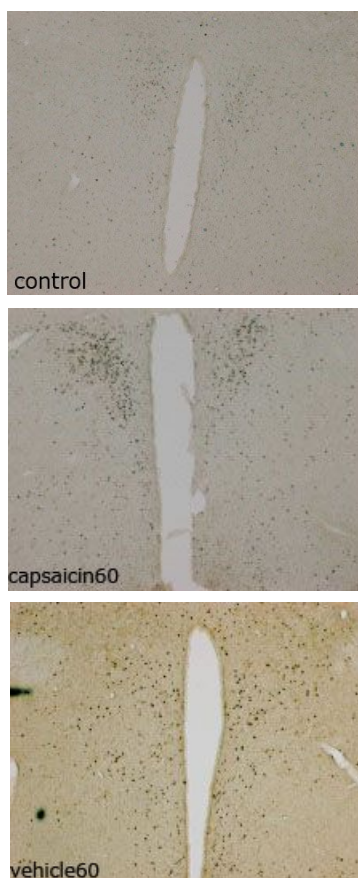
vehicle 溶液注入 120 分後とは大きな差は認められなかった。

表 1 : 溶液注入後の室傍核における c-fos 発現

	各群における 1 枚の切片の 平均個数	Range (範囲)
control	148.7	123-172
capsaicin 0min	100	79-121
vehicle 0min	94.3	63-116
capsaicin 5min	168.5	145-192
vehicle 5min	193	193
capsaicin 15min	329	175-483
vehicle 15min	202	161-243
capsaicin 60min	350.8	278-522
vehicle 60min	180.7	106-267
capsaicin 120min	243.3	170-360
vehicle 120min	177	173-181

また、図 3 には上から、視床下部 PVN におけるコントロール (control)、capsaicin 溶液注入 60 分後 (capsaicin60)、及び vehicle 溶液注入 60 分後 (vehicle60) の写真を示す。

図 3



c-fos 遺伝子発現は、我々がこれまでに明らかにしてきた CRF-hnRNA の遺伝子発現のタイムスケジュールとほとんど同様だった。c-fos 遺伝子発現は、様々な遺伝子発現を誘発すると考えられている。c-fos 遺伝子と

CRF-hnRNA 遺伝子との関連は明らかではないが、c-Fos タンパク発現が CRF-hnRNA の遺伝子発現の増加をもたらしている可能性が示された。すなわち、カプサイシンによる痛み刺激により生じるストレスは、視床下部における c-fos 遺伝子発現と CRF-hnRNA 発現を誘発することが明らかになった。

本研究では、カプサイシン投与後 2 時間以内での c-Fos 発現増加を示したが、今後、長期間における変化や他の部位の刺激に対する発現についても検討し、慢性疼痛と神経損傷との関連について明らかにする予定である。

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 2 件)

Yu Endo, Noriaki Shoji, Yusuke Shimada, Eriko Kasahara, Masahiro Iikubo, Tadasu Sato, Takashi Sasano, Hiroyuki Ichikawa. Prednisolone induces microglial activation in the subnucleus caudalis of the rat trigeminal sensory complex. *Cell Mol Neurobiol*(2014) Jan;34(1):95-100 査読有 DOI: 10.1007/s10571-013-9990-z
Tadasu Sato, Masatoshi Fujita, Mitsuhiro Kano, Hiroshi Hosokawa, Teruyoshi Kondo, Toshihiko Suzuki, Eriko Kasahara, Noriaki Shoji, Takashi Sasano, Hiroyuki Ichikawa. The distribution of transient receptor potential melastatin-8 in the rat soft palate, epiglottis, and pharynx. *Cell Mol Neurobiol* (2013) 33 : 161-165 査読有 DOI:10.1007/s10571-012-9888-1

[学会発表] (計 1 件)

Yu Endo, Masahiro Iikubo, Noriaki Shoji, Tomonori Ishii, Hideo Harigae, Maya Sakamoto, Takashi Sasano . Clinical survey of dentin hypersensitivity-like toothache induced by steroid therapy . 41th American Association for Dental Research 2012年3月24日、アメリカ Tampa

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 江利子 (KASAHARA ERIKO)
東北大学・歯学研究科 (研究院) ・大学院
非常勤講師
研究者番号 : 50597325

(2) 研究分担者

庄司 憲明 (SHOJI NORIAKI)

東北大学・病院・講師
研究者番号：70250800

笹野 高嗣 (SASANO TAKASHI)
東北大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：10125560

市川 博之 (ICHIKAWA HIROYUKI)
東北大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：20193435