

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593064

研究課題名(和文) 舌痛症発症に対するSatellite glial cellsの関与

研究課題名(英文) Involvement of satellite glial cells in trigeminal ganglion in tongue pain

研究代表者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：20362238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：C57/BL6雄性マウス(7w)の舌背にTNBSを投与すると、舌背に熱痛覚過敏が生じたが組織学的変化は認められなかった。抗Artemin中和抗体およびTRPV1アンタゴニストの投与により舌背の熱痛覚過敏が抑制された。また三叉神経節における舌投射Artemin受容体陽性かつTRPV1陽性神経細胞数が増加した。また、三叉神経節内TRPV1タンパク量が有意に増加した。さらにArtemin舌投与後5日目に舌背に熱痛覚過敏が生じ、TRPV1アンタゴニストの舌投与により舌背の熱痛覚過敏が抑制された。さらに、TNBS投与後、舌投射三叉神経節ニューロンのcapsaicinに対する反応性が増大した。

研究成果の概要(英文)：Burning mouth syndrome is characterized by altered sensory qualities, namely tongue pain hypersensitivity. We found that the mRNA expression of Artemin (Artn) in the tongue mucosa of burning mouth syndrome patients was significantly higher than that of control subjects, and we developed a mouse model of burning mouth syndrome by application of 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) to the dorsum of the tongue. TNBS application to the tongue induced persistent, week-long non-inflammatory tongue pain and a significant increase in Artn expression in the tongue mucosa and marked tongue heat hyperalgesia which was inhibited by local administration of neutralizing anti-Artn antibody. These results suggest that the overexpression of Artn in the TNBS-treated tongue increases the membrane excitability of TG neurons innervating the tongue by increasing TRPV1 sensitivity, which causes heat hyperalgesia.

研究分野：口腔生理学

キーワード：舌痛症 TRPV1 Artemin 熱痛覚過敏 satellite cell GAP43 GFAP TLR4

1. 研究開始当初の背景

口腔顔面痛の一つである舌痛症は、舌に炎症や腫瘍などの器質的な変化が認められないにもかかわらず、舌に慢性的な痛みや痛覚過敏が生じる疾患である。女性に発症することが多く、痛む部位が移動する、食事中は痛みが緩和されるといった特徴があるが、原因はほとんどわかっていない。しかし舌痛症は有病率が高いにもかかわらず、生死を左右することがない疾患であるために研究が非常に遅れている。特に、舌痛症発症の分子メカニズムに対する基礎的研究はほとんど行われていない。そのため舌痛症に対する治療は心理療法や対症療法に留まっており原因療法に至らず、試行錯誤して治療にあたっているのが現状である。本研究の特色は舌痛症発症のメカニズムの基礎的研究に留まらず、臨床応用を念頭において行動薬理学的検討も行い EBM に基づいた治療法開発の足がかりを作ること为目标としている。本研究が舌痛症を抑える治療薬の開発に結びつけば、人類の医学の進歩に貢献することは間違いない。我々は、三叉神経節内における情報伝達の変調が、口腔顔面痛に深く関与することを見出した。三叉神経節には神経細胞の何倍もの Satellite cell が存在していることから、Satellite cell が三叉神経節内の情報伝達を亢進し、口腔顔面痛発症に関与している可能性は十分考えられるが、未だそのメカニズムはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

口腔顔面痛モデル動物を作製し、三叉神経節における satellite glial cells の役割に注目し、口腔顔面痛発症の神経機構を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 全身麻酔下の C57/BL6 マウス舌背に 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS) を 1 時間塗布する。TNBS 塗布後、熱刺激用プローブおよび機械刺激用ホーセップスを使って舌の機械的および熱刺激に対する逃避閾値を経時的に計測する。
- (2) TNBS 塗布後 1 日、7 日、14 日後に舌を摘出し HE 染色にて組織学的変化を解析するとともに、舌組織の TRPV1 陽性神経終末の形態学的変化を免疫組織学的に解析し、発現量を Western blot 法にて定量する。
- (3) SD 系ラットの第一大臼歯を露髄させ、complete Freund's adjuvant (CFA) を歯髓腔にペーパーポイントにて刺激後、仮封し 3 日間放置した。このモデルラットの舌背部に歯髓処置前から処置後 21 日目まで熱刺激あるいは機械的刺激を行い、逃避閾値の変化を測定する。さらに、ペーパーポイント刺入 5 分後、ラットを 4%パラホルムアルデヒド溶

液にて灌流固定し、TG における pERK および TRPV1 陽性細胞の発現様式を免疫組織化学的に検索した。

- (4) 同モデルラットを灌流固定したのち、三叉神経節を取り出し、glial fibrillary acidic protein (GFAP) をマーカーとした satellite glial cells の発現様式の変化および 1 次ニューロンにおける TLR4 の発現を免疫組織学的手法にて解析した。
- (5) さらに同モデルラットの三叉神経節内に TLR4 アンタゴニストを持続注入したラットにおいて、舌への侵害刺激に対する逃避行動および 1 次ニューロンの TLR4 発現変化を詳細に検索した。
- (6) 下歯槽神経切断により口腔顔面領域に異所性機械痛覚過敏が発症することが明らかにされているが、そのメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では下歯槽神経切断により発症する異所性機械痛覚過敏に対する三叉神経節内 Connexin43 (Cx43) の役割を検討した。深麻酔下にて下歯槽神経を切断し、顔面部への機械刺激に対する頭部引込め反射閾値 (HWT) を経日的に測定した。下歯槽神経切断後 8 日目、三叉神経節における Satellite cell 活性および Cx43 発現を解析した。さらに下歯槽神経切断後、三叉神経節内へ Cx43 選択的阻害薬 (Gap27) を持続投与し、Satellite cell 活性および HWT を解析した。

4. 研究成果

C57/BL6 雄性マウス(7w)の舌背に TNBS (10 mg/ml, 1h)を投与すると、投与後 1 日目より舌背に熱痛覚過敏が生じた。TNBS 舌背投与後 5 日目、舌に組織学的変化は認められなかったが、舌背粘膜において Artemin 発現量が増加し、抗 Artemin 中和抗体および TRPV1 アンタゴニスト(SB366791)の投与により舌背の熱痛覚過敏が抑制された。また三叉神経節における舌投射 Artemin 受容体(GFR α 3)陽性かつ TRPV1 陽性神経細胞数が増加した。また、三叉神経節内 TRPV1 タンパク量が有意に増加した。さらに Artemin 舌投与後 5 日目に舌背に熱痛覚過敏が生じ、SB366791 の舌投与により舌背の熱痛覚過敏が抑制された。さらに、TNBS 投与後、舌投射三叉神経節ニューロンの capsaicin に対する反応性が増大することをパッチクランプ法にて明らかにした。以上の結果から、TNBS 舌背投与により生じる舌背の熱痛覚過敏は、舌背粘膜で増加する Artemin による舌投射ニューロンにおける TRPV1 の増加が関与していることが示唆された。

CFA を歯髓腔にペーパーポイントにて刺激して 3 日後、浅麻酔下にて隣在歯髓腔

にカプサイシンを投与し、疼痛関連反応(咬筋筋電図)を記録したところ、vehicle(veh)群と比較して、CFA群では有意に疼痛関連反応が増強していた。

三叉神経節 枝領域において、CFA群では、神経節細胞のうち約12%がpERK陽性を示した。これに対し、veh群では約6%がpERK陽性を示した。M1のFG陽性TG細胞のうちM2のカプサイシン刺激によって、CFA群では約38%、veh群では約20%がpERK陽性を示した。カプサイシン刺激を行わないcontrol群では約4%であった。以上の結果から、以下のメカニズムが示唆された。(1) 歯髄炎を引き起こした歯髄を支配するTG細胞が隣在歯をも同時に支配しており、隣在歯における侵害情報伝達が亢進される。(2) 炎症を引き起こした歯髄を支配するTG細胞が、隣接した他の歯髄を支配するTG細胞になんらかの情報伝達を行い、興奮性の変化を引き起こす。

次に、あらかじめ逆行性トレーサーであるフルオロゴールド(FG)を隣在歯に投与しておき、CFAを歯髄腔にペーパーポイントにて刺激して3日後、FG陽性のTRPV1陽性細胞の発現様式を免疫組織化学的に検索した。CFA処置により、TGにおいてFG陽性のTRPV1陽性細胞が増加していることが確認された。さらに、FG陽性細胞のうち活性化satellite glial cellsに囲まれている細胞は、CFA処置により有意に増加した。また、活性化satellite glial cellsの阻害剤であるFluorocitrateを三叉神経節内に投与すると、CFAの歯髄腔刺激3日後、浅麻酔下にて隣在歯歯髄腔にカプサイシンを投与し、疼痛関連反応を記録したところ、CFA群はveh群と比較して、有意差を認めなかった。よって、口腔顔面痛の発症には、三叉神経節におけるsatellite glial cellsの活性化によるTRPV1の増加が関与していることが示された。

歯髄に起炎物質であるCFAを投与し仮封を行って歯髄炎モデルラットを作製し、舌に引き起こされた関連痛について行動学的、形態学的、薬理学的および分子生物学的手法を用いて解析を行った。歯髄および舌を支配する感覚神経は、ともに三叉神経節第 枝領域である。そこで、歯髄炎ラットの三叉神経節細胞および星状細胞に発現するTLR4を免疫組織学的に同定し、その発現頻度および分布を明らかにした。さらに、三叉神経節細胞に発現したTLR4の活性化をブロックすることにより、TLR4が神経活動に対し強い変調作用を示すことを明らかにした。また、同時に行動学的実験を行うことによって、TLR4のブロックが実際の疼痛行動を強く抑制することを見出した。さらに、TLR4の内因子リガンドとして知られているHSP70の免疫組織化学的検索および歯髄内投与を行い、実際に疼痛行動が亢進することを確認した。また、

歯髄炎の発症によって、末梢においてHSP70が遊離し三叉神経節に運ばれることを明らかにした。一方、舌を支配するTG細胞において、TLR4の合成が亢進するかどうかを明らかにするため、異所性痛覚過敏が発症すると考えられる舌に神経トレーサーであるFGを微量投与し、神経節細胞の分布およびラベルされた細胞におけるTLR4およびHSP70が発現することを明らかにした。以上の結果から、歯髄炎が発症すると、HSP70は歯髄組織に発現し、三叉神経節細胞体に軸索輸送される。その後、輸送されたHSP70は歯髄を支配しているTG神経細胞体から細胞外に放出され、舌を支配しているTG神経細胞のTLR4と結合し、舌を支配しているTG神経細胞の興奮性が増強された。ゆえに、HSP70/TLR4 signaling pathwayにより舌の異所性痛覚過敏発症が誘発された。

下歯槽神経切断後1日目より14日目までHWTは有意に低下した。下歯槽神経切断後8日目、三叉神経節においてCx43陽性Satellite cellの活性化が認められ、Cx43発現量が増加した。さらに、Gap27の三叉神経節内への持続投与により、下歯槽神経切断によるSatellite cellの活性化およびHWTの低下が抑制された。

以上の結果から、下歯槽神経切断により顔面部に発症する機械痛覚過敏には、三叉神経節内のCx43を介したSatellite cellの活性化が関与することが示唆された。

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)

Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K. (2015) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. J Dent Res. 94(3):446-54. doi:10.1177/0022034514565645. 査読有

Matsuka Y, Iwata K, Terayama R, Imamura Y, Maruhama K, Shinoda M, Tsuboi Y, Kondo M, Honda K, Katagiri A, Sugimoto T. (2014) Basic research and clinical investigations of the neural basis of orofacial pain. J. Oral Biosci. 57(1) 27-36. doi:10.1016/j.job.2014.09.001. 査読有

Shinoda M, Iwata K. (2013) Neural Communication in Trigeminal ganglion Contributes Ectopic Orofacial Pain. J. Oral Biosci. 55 (4) 165-168. doi:10.1016/j.job.2013.06.003. 査読有

Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle BJ, Urata K, Iwata K. (2013) Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. PLoS One. 8(1):e52840. doi:10.1371/journal.pone.0052840. 査読有

Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K. (2013) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. J Neuroinflammation. 10(1):139. doi:10.1186/1742-2094-10-139. 査読有

〔学会発表〕(10件)

篠田 雅路 (2015年3月22日) Involvement of intra-trigeminal ganglionic communication in ectopic orofacial pain 第92回日本生理学会大会シンポジウム 神戸国際会議場(兵庫県神戸市)
Shinoda M, Katagiri A, Honda K, Iwata K. (2014年10月9日) Contribution of Artemin signaling in tongue trigeminal sensory neurons to non-inflammatory tongue pain. The 15th world congress on pain, Buenos Aires, Argentina.
浦田健太郎、篠田雅路、岩田幸一 (2014年9月26日) 口腔内外における切開処置後の温熱および機械痛覚過敏に対する TRPV1 と TRPA1 の関与 第56回歯科基礎医学会学術大会 福岡国際会議場(福岡県福岡市)
Urata K, Shinoda M, Lee J, Gionhaku N, Iwata K. (2013年11月11日) TRPV1 and TRPV2 are differentially involved in oral persistent pain associated with mucosal injury. Neuroscience 2013, San Diego, USA.

梶佳織、篠田雅路、清水典佳、岩田幸一 (2013年9月21日) 下歯槽神経損傷後に発症する顔面部異所性痛覚過敏に対する Connexin43 の関与 第55回歯科基礎医学会学術大会 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
篠田雅路 (2013年9月20日) 顎顔面口腔領域における異所性痛覚過敏の末梢神経機構 第55回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジウム 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
篠田雅路 (2013年9月20日) 舌痛症における Artemin の役割 第55回歯科基礎医学会学術大会サテライトシンポジ

ウム 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)
Shinoda M, Katagiri A, Honda K, Iwata K. (2013年5月24日) Artemin signaling contributes to the tongue pain in burning mouth syndrome mice. The 4th International Congress on Neuropathic Pain. Toronto Canada
浦田健太郎、篠田雅路、大原絹代、鈴木安住、祇園白信仁、岩田幸一 (2013年3月28日) 口腔粘膜外傷後の持続痛における TRPV2 の関与 第90回日本生理学会大会 タワーホール船堀(東京都江戸川区)
大原絹代、清水康平、篠田雅路、岩田幸一 (2012年9月20日) CFA誘導性歯髄炎により発症する舌の機械痛覚過敏に対する Toll-like Receptor4 の関与 第35回日本神経科学大会 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

〔図書〕(計 1件)

岩田幸一、富永真琴、篠田雅路、古江秀昌、歌大介、秋元望、柿木隆介、井関雅子、山本隆充、川嶋文人、幾島賢治、幾島嘉浩、幾島将貴 (2014) 疼痛研究の最前線 ファインケミカル シーエムシー出版 43(1) 73頁(12-16頁)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
日本大学歯学部生理学講座 HP
<http://nusd-physiology.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：20362238

(2) 研究分担者

岩田 幸一 (IWATA, Koichi)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：60160115

浅野 正岳 (ASANO, Masatake)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：10231896

田邊 奈津子 (TANABE, Natsuko)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：10409097

(3) 連携研究者

鈴木 郁子 (SUZUKI, Ikuko)
日本大学・歯学部・助手
研究者番号：60459906

(平成26年3月31日付で退職)

本田 訓也 (HONDA, Kuniya)
日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー
研究者番号：20548945

尾曲 大輔 (OMAGARI, Daisuke)
日本大学・歯学部・専修研究員
研究者番号：10608699