

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792258

研究課題名(和文) 口腔顔面領域に発症した異常疼痛治療法開発に向けた末梢神経機構の解明

研究課題名(英文) Peripheral nervous systems for development of new therapy in abnormal orofacial pain

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経損傷により角化細胞からグルタミン酸が放出され、痛覚過敏を発症する。以前我々は、顔面皮膚へのグルタミン酸処置により顔面領域に痛覚過敏が発症することを報告した。しかしながら、末梢のグルタミン酸による痛覚過敏の発症メカニズムは知られていない。そこで、グルタミン酸誘発痛覚過敏におけるTRPチャンネルとPKC epsilonの関与を明らかにするため、ラットを用いた行動実験、免疫組織化学実験および電気生理学実験を行った。実験結果より、グルタミン酸処置により顔面領域に発症した痛覚過敏には、mGluR5を介したPKC epsilon経路のTRPチャンネルの活性化の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Peripheral tissue injury causes glutamate release from keratinocytes, resulting in hyperalgesia. We have reported that peripheral glutamate injection induces thermal hyperalgesia. However, it is still not understood the mechanisms underlying hyperalgesia following peripheral glutamate injection. To clarify the involvement of peripheral TRPA1, TRPV1 and PKC epsilon glutamate-induced hyperalgesia, we performed behavioral testing, immunohistochemistry and neuronal recording using glutamate injected rats. Present findings suggest that TRPA1 or TRPV1 activation through mGluR5 signaling via PKC epsilon is involved in facial thermal and mechanical hyperalgesia.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：神経因性疼痛 痛覚過敏 TRP channel グルタミン酸受容体

## 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において治療が困難な異常疼痛として、口腔顔面領域の神経が抜歯やインプラントなどの歯科手術や種々の疾患によって損傷を受けることによって発症する神経因性疼痛、顎関節症に付随する顎関節痛などがある。現在まで、complete Freund's adjuvant (CFA)、マスタードオイル、ホルマリン、adenosine triphosphate (ATP)、カプサイシン、またはグルタミン酸などの末梢組織への局所注射や末梢神経損傷によって痛覚過敏やアロディニア等の異常疼痛症状を呈する動物モデルの解析が行われ、その異常疼痛発症機構の神経機構が徐々に明らかになりつつある (Iwata et al., J Neurophysiol 82:1244-1253, 1999; Tashiro et al., J neurophysiol、98:3242-3253, 2007; Honda et al., Mol Pain 4:59, 2008; Shinoda et al., Gastroenterology、137:2096-2104, 2009)。

現在、さまざまな侵害刺激を受容するレセプターとして transient receptor potential (TRP) channel family が広く知られている。中でも、カプサイシンや 43 以上の熱刺激を受容する TRP vanilloid 1 (TRPV1) (Voets et al., Nature 430: 748-754, 2004)、マスタードオイルや 15 以下の冷刺激や機械刺激を受容する TRP ankyrin 1 (TRPA1) (Story et al., Cell 112: 819-829, 2003) およびワサビや 28 以下の冷刺激を受容する TRP melastatin 8 (TRPM8) (Dhaka et al., Annu Rev Neurosci 29: 135-161, 2006) が知られている。

末梢組織への侵害刺激による一次ニューロンの興奮は求心性だけでなく軸索反射により、1 次神経終末から calcitonin gene-related peptide (CGRP) やグルタミン酸を放出する。CGRP は血管拡張や血管透過性の亢進を引き起こす。しかしながら末梢に存在する角化細胞やシュワン細胞から放出さ

れたグルタミン酸の役割は不明である。最近、自由神経終末に N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor や  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionate (AMPA) receptor などのグルタミン酸受容体が存在すると確認された。申請者は、顔面皮膚および舌へグルタミン酸を注入したモデルラットを用い、温度刺激に対する疼痛反応を観察した。結果、顔面皮膚へのグルタミン酸注入後の冷刺激に対しては反応の増強は見られなかったが、熱刺激に対する痛覚過敏を観察した。同様に舌へのグルタミン酸注入後の熱・冷刺激に対する痛覚過敏の発症を観察した (Honda et al., Mol Pain 7:75, 2011)。

よって、末梢組織への侵害刺激による軸索反射により、一次神経終末から放出されるグルタミン酸が TRP channel (TRPV1、TRPA1) を感作するうえ、再度一次神経終末からグルタミン酸が放出され疼痛を長期継続するネガティブフィードバックの回路が形成される可能性がある。このメカニズムを解明することによりグルタミン酸をターゲットとした新規異常疼痛治療法の足がかりとなるはずであろう。

## 2. 研究の目的

中枢神経におけるグルタミン酸受容体の異常疼痛発症の関与については広く研究され、役割については明らかになりつつある。自由神経終末にグルタミン酸受容体が存在し、末梢組織損傷や炎症により角化細胞、シュワン細胞および血漿からグルタミン酸が放出されることが最近報告されている。しかしながら、末梢神経におけるグルタミン酸受容体の異常疼痛への関与はほとんど明らかにされていない。そこで、口腔顔面領域に発症する異常疼痛の神経機構解明および治療法の開発をめざし、末梢グルタミン酸受容体の役割を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) グルタミン酸投与後の異常疼痛に対する TRP channel または mGluR5 アンタゴニストの効果の解析

イソフルラン (2%) 吸入による浅麻酔下にてラットの層板状筋に筋電図記録用電極を刺入し、顔面皮膚に TRP channel のアンタゴニスト (TRPV1: SB366791、TRPA1: HC-030031) または mGluR5 のアンタゴニスト (MPEP) 処置を行う。同部に 0.5 M グルタミン酸 (10  $\mu$ l, i.sc.) を注入 5 分後に、熱刺激用プローブを用いて熱・冷・機械刺激を与え spike 2 を用いて記録した筋電図より逃避反射閾値を計測し、各アンタゴニストの効果を検討する。

(2) 末梢におけるグルタミン酸受容体と TRP channel の関係の解析

ペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔をした 7 週齢の Sprague-Dawley (SD) 雄性ラットの TG を取り出し、4%パラホルムアルデヒドにより 12 時間固定後クライオスタットにて組織切片を作製する。作製した切片において抗 NMDA および抗 mGluR5 receptor と抗 TRPV1 および抗 TRPA1 channel 一次抗体を用いて免疫染色を行う。

(3) グルタミン酸受容体から TRP channel への細胞内シグナル経路の解明

イソフルラン (2%) 吸入による浅麻酔下にてラットの顔面皮膚に細胞内セカンドメッセンジャーである PKC epsilon のブロッカーを投与し、グルタミン酸投与後の熱・冷・機械刺激に対する逃避反射閾値を計測し、グルタミン酸受容体活性化に伴う TRP channel 活性化の細胞内伝達経路を解明する。

(4) グルタミン酸投与による TG ニューロン活動の変調の解析

ペントバルビタール Na (50 mg/kg, i.p.) で麻酔したラットの頭蓋骨の開放を行う。術後、TG に電極を刺入し顔面皮膚に受容野を持つニューロンを spike 2 を用いた細胞外記録

法により同定する。そのニューロンを保持したまま、顔面皮膚または舌にグルタミン酸を注入し、注入前後での TG ニューロンの活動性の変調を記録する。また、TRP channel のアンタゴニスト処置を行い、TG ニューロン活動の変調を解析する。

### 4. 研究成果

(1) グルタミン酸投与後の異常疼痛に対する TRP channel または mGluR5 アンタゴニストの効果の解析

図 1 TRPA1 アンタゴニスト投与によりグルタミン酸投与後の冷・機械刺激に対する痛覚過敏の回復が認められた。

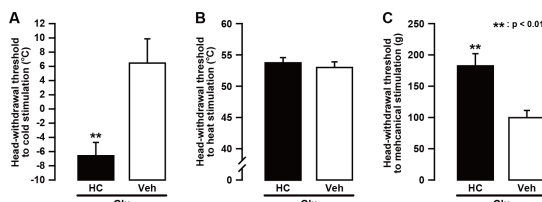


図 2 TRPV1 アンタゴニスト投与によりグルタミン酸投与後の熱・機械刺激に対する痛覚過敏の回復が認められた。

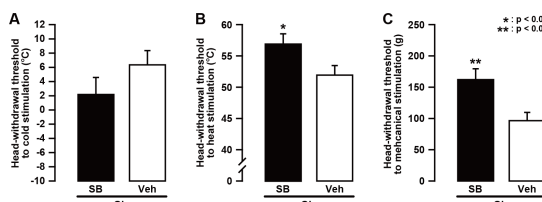
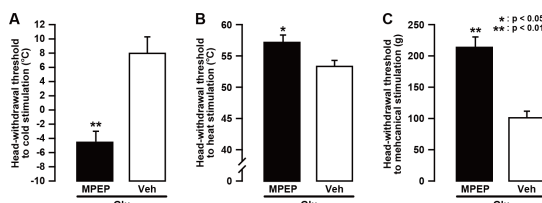


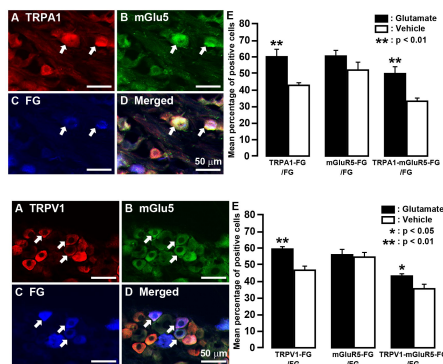
図 3 mGluR5 アンタゴニスト投与によりグルタミン酸投与後の熱・冷・機械刺激に対する痛覚過敏の回復が認められた。



(2) 末梢におけるグルタミン酸受容体と TRP channel の関係の解析

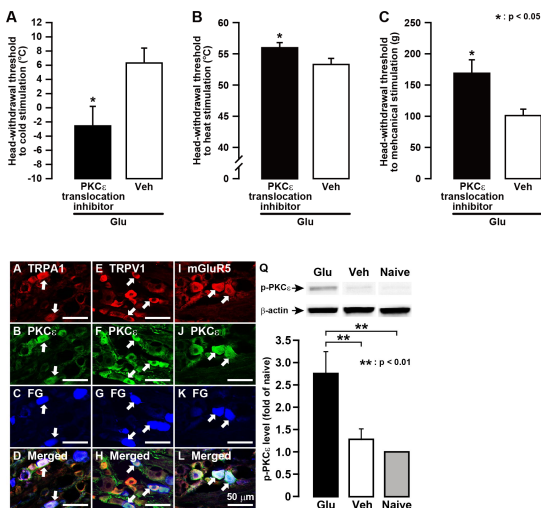
図 4, 5 顔面皮膚を支配している TG ニュー

ロンにおいて TRPA1 または TRPV1 と mGluR5 の共存が認められた。



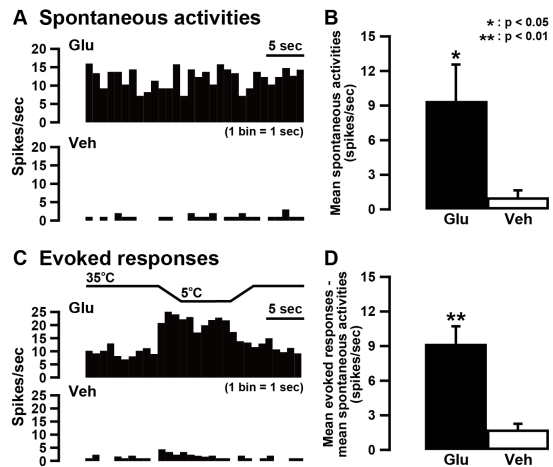
(3) グルタミン酸受容体から TRP channel への細胞内シグナル経路の解明

図 6, 7 PKC epsilon インヒビター投与によりグルタミン酸投与後の熱・冷・機械刺激に対する痛覚過敏の回復が認められた。また、顔面皮膚を支配している TG ニューロンにおいて TRPA1、TRPV1 または mGluR5 と PKC epsilon が共存し、PKC epsilon のリン酸化が亢進していた。



(4) グルタミン酸投与による TG ニューロン活動の変調の解析

図 8 グルタミン酸持続投与により顔面皮膚を支配している TG ニューロン活動が亢進していた。



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8件)

1. Sugiyama T, Shinoda M, Watase T, Honda K, Ito R, Kaji K, Urata K, Lee J, Ohara K, Takahashi O, Echizenya S, Iwata K (2013) Nitric oxide signaling contributes to ectopic orofacial neuropathic pain. J Dent Res. 92:1113-1117. 査読有

2. Noma N, Shinoda M, Honda K, Kiyomoto M, Dezawa K, Nakaya Y, Komiyama O, Imamura Y, Iwata K (2013) Interaction of IL-1β and P2X3 Receptor in Pathologic Masseter Muscle Pain. J Dent Res. 92:456-460. 査読有

3. Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K (2013). Involvement of ERK Phosphorylation of Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis Neurons in Thermal Hypersensitivity in Rats with Infraorbital Nerve Injury. PLoS One. 8:e57278. 査読有

4. 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:e52840. 査読有

5. Liu MG, Matsuura S, Shinoda M, Honda K, Suzuki I, Shibuta K, Tamagawa T, Katagiri A, Kiyomoto M, Ohara K, Furukawa A, Urata K, Iwata K (2012). Metabotropic glutamate receptor 5 contributes to inflammatory tongue pain via extracellular signal-regulated kinase signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord. J Neuroinflammation. 27:258. 査読有

6. Yasuda M, Shinoda M, Kiyomoto M, Honda K, Suzuki A, Tamagawa T, Kaji K, Kimoto S, Iwata K (2012). P2X3 receptor mediates ectopic mechanical allodynia with inflamed lower lip in mice. Neurosci Lett. 528:67-72. 査読有

7. Miyamoto M, Tsuboi Y, Honda K, Kobayashi M, Takamiya K, Haganir RL, Kondo M, Shinoda M, Sessle BJ, Katagiri A, Kita D, Suzuki I, Oi Y, Iwata K (2012) Involvement of AMPA Receptor GluR2 and GluR3 Trafficking in Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis and C1/C2 Neurons in Acute-Facial Inflammatory Pain. PLoS One. 7:e44055. 査読有

8. Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K (2012) Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical

spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. Brain Res. 1451:74-86. 査読有

〔学会発表〕(計3件)

1. 本田訓也、岩田幸一  
末梢の代謝型グルタミン酸受容体活性化により誘発される痛覚過敏に対する TRP channel の関与  
第91回日本生理学会、2014年3月18日、鹿児島

2. Kuniya Honda, Masamichi Shinoda and Koichi Iwata  
Activation of peripheral mGluR5 contributes thermal and mechanical hyperalgesia via TRPA1 and TRPV1.  
8th Congress of the European Federation of IASP Chapters, October 11, 2013, Florence, Italy

3. Kuniya Honda, Eriko Tachi, Kaori Kaji, Takaaki Tamagawa, Masamichi Shinoda and Koichi Iwata  
Peripheral glutamate receptors contribute cold hyperalgesia via TRPA1 mechanisms.  
Neuroscience 2012 October 15, New Orleans

〔図書〕(計1件)

1. 岩田幸一、本田訓也、篠田雅路 (2012). 骨痛の基本的メカニズムが骨転移のバイオロジーとマネジメント、医薬ジャーナル社、242-247.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 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 件）

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

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：