

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893261

研究課題名(和文) 僧帽筋炎に随伴する顔面部異常疼痛発症に対するp38及びcaspase1の関与

研究課題名(英文) p38 phosphorylation and caspase1 in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory

研究代表者

韓 仁陽(清本聖文)(Han, In Yang)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00712556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：僧帽筋へのCFA投与により、顔面部異所性異常疼痛が生じる事が示唆され、microgliaの活性化とp38MAPKのリン酸化、IL-1 分泌が関与するデータが得られた。p38リン酸化阻害剤を用いた際、microgliaの活性化とp38MAPKのリン酸化、IL-1 分泌、ニューロンの興奮変調が抑制される結果が得られた。

本研究から、僧帽筋炎に随伴する顔面部異常疼痛発症はp38の関与が示唆される。本内容は現在、Molecular Painに投稿中である(5月22日現在)。caspase1については一部結果を得られている。今後、27年度若手研究Bが採択された為、その内容とともに研究を続けていきたい。

研究成果の概要(英文)：Mechanical allodynia in the lateral facial skin was induced following trapezius muscle inflammation, which accompanied microglial activation with p38 phosphorylation and hyperexcitability of wide dynamic range (WDR) neurons in the trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) and upper cervical spinal cord (C1-C2). p38 mitogen-activated protein kinase selective inhibitor administration completely suppressed mechanical allodynia in the lateral facial skin and activation of microglia, Interleukin-1. Moreover, WDR neuronal excitability in Vc and C1-C2 was significantly suppressed by inhibitor. These findings indicate that microglia, activated via p38 phosphorylation, play a pivotal role in WDR neuronal hyperexcitability, which accounts for the mechanical hypersensitivity in the lateral facial skin associated with trapezius muscle inflammation. I submitted these data a paper to Molecular Pain (2015.5.22).

研究分野：生理学

キーワード：microglia p38MAPK IL-1 顎顔面部異常疼痛 異所性異常疼痛 疼痛 関連痛 神経生理学

1. 研究開始当初の背景

頸部筋の慢性的な疲労や炎症により、頸部筋から離れた顎顔面領域に関連痛が生じ、顎顔面部異常疼痛として現れることがある。こうした症状は齶蝕や口腔内の炎症などによる疼痛と誤診することがある。しかしながら、そのメカニズムは不明である。よって、顎顔面部異常疼痛のメカニズムを解明する事は、新規治療法の開発や誤診の防止等に貢献すると考えられる。近年、炎症や神経損傷により活性型マイクログリアが重要な役割を担うことが報告されている (Gao et al., Pharmacol Ther. 2010)。局所の障害により一次神経終末から遊離されたフラクタルカイン(FKN)が、マイクログリア膜上のフラクタルカインレセプター(CX3CR1)に作用し、その活性化が促される。その結果、二次ニューロンの興奮異常を引き起こすことが報告された(Clark et al., Exp Neurol. 2012)。先行研究の下、申請者は、ラットの僧帽筋に起炎物質 complete Freund's adjuvant (CFA) を投与し、顔面部皮膚における異所性異常疼痛のメカニズムを明らかにしてきた (Kiyomoto et al., J. Neurosci. 2013)。本実験においては異所性異常疼痛の分子メカニズムに対する発症・維持をより詳細に研究した。

2. 研究の目的

歯科臨床の場において、顎顔面部異所性異常疼痛を訴える患者に遭遇することがある。そのメカニズムは不明な点が多く、しばしば歯が原因である疼痛と誤診され、適切な治療がなされないことが多い。そこで申請者は僧帽筋炎モデルラットを作製し、行動学的、免疫組織学的および生化学的、電気生理学的手法を用いて、僧帽筋炎に伴う顎顔面部異所性異常疼痛の発症機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、僧帽筋炎により顎顔面部皮膚支配領域において活性化マイクログリアから放出される炎症性サイトカインに關与する p38 および caspase1 の役割を解明することを試みた。まず、僧帽筋炎モデルラットを製作した。SD 系雄性ラット(7w)の背部に皮膚切開を加え、僧帽筋内に complete Freund's adjuvant (CFA) (90 $\mu$ l) を投与したものをモデル群とした。また、生理食塩液 (saline: 90 $\mu$ l) を注入したものをコントロール群とした。研究方法は以下の点を考慮した。

1. 疼痛行動解析及び延髄及び上部頸髄におけるマイクログリアおよび p38 リン酸化に対する阻害剤の効果解析する。

2. マイクログリアでの IL-1 $\beta$ 合成に対する p38 リン酸化および caspase1 活性化阻害の効果解析する。

3. 延髄および上部頸髄のニューロン興奮性の変調に対する p38 リン酸化阻害の効果の

解析する。

4. マイクログリアからの IL-1 $\beta$ 放出量の経時的变化を解析する。

4. 研究成果

異所性異常疼痛の分子メカニズムを解明する為に、ラットの僧帽筋に起炎物質である CFA(90 $\mu$ l) を投与し、僧帽筋炎モデルラットを作成した。また、比較対象として、同部位に生理食塩(Saline; 90 $\mu$ l) を投与したものをコントロール群とした。

1. 僧帽筋への CFA 投与における顎顔面部皮膚の疼痛行動(機械的頭部疼痛閾値)解析

疼痛行動観察は、von Frey filament を用いて顔面部皮膚へ機械刺激を与え、経日的な頭部逃避反射閾値を測定した。CFA を投与したものは、投与後1日目で、機械的頭部逃避閾値の低下を見て、4日目まで減少した。その後、閾値は元に戻り始め15日目においては、手術前とほとんど変わらなかった。また、生理食塩水を投与した群と比較した際、CFA 投与後4日目で、最も有意な差を認めた。よってこの後の実験は4日目を中心として使用した(図1)。このことから、CFA を僧帽筋に投与することによって顎顔面部皮膚の機械的痛覚過敏が生じる事が提示された。

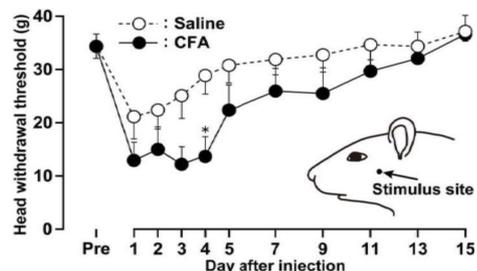


図1 僧帽筋CFA投与後の頭部逃避閾値の経日的変化

2. 延髄及び上部頸髄における活性化マイクログリアおよび p38 リン酸化の解析

次に、顔面部皮膚の支配領域である延髄及び上部頸髄のマイクログリアの活性化について検討した。CFA 投与4日目のものでは、マイクログリアの活性化が写真上で確認できた(図2A, B)。一方、生理食塩水を投与した群では、マイクログリアの活性化をほとんど認めなかった(図2C)。さらに CFA 投与15日目においては、マイクログリアの活性化を

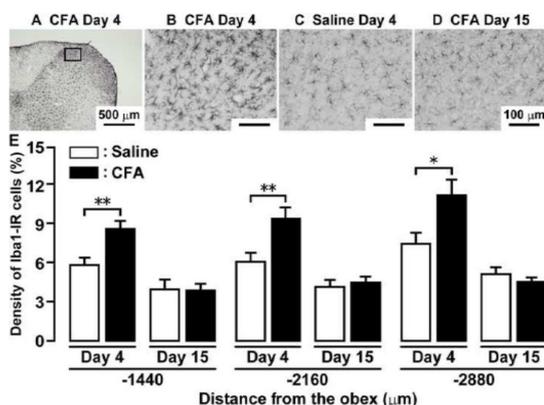


図2 僧帽筋CFA投与による顔面部領域のマイクログリア活性化

認めなかった(図2D)。解析した際、CFA投与4日目は生理食塩水投与4日目と比較して有意差を認め、一方で、15日目においては両者に差を認めなかった(図2E)。本結果より、僧帽筋へのCFA投与により発症する顎顔面の機械的痛覚過敏はマイクログリアの活性化が関与していると示唆された。さらに申請者は、炎症性サイトカインの合成経路が、顔面部異所性異常疼痛に関与すると考えられるp38に着目した。これを証明するために、p38リン酸化(pp38)の局在性とその関与について研究を行った。pp38は延髄及び上部頸髄においてマイクログリアに特異的に発現していることを、蛍光免疫染色を用いて観察した(図3A)。さらにウェスタンブロッティング法を用い、pp38の有意な増加があることを確認し

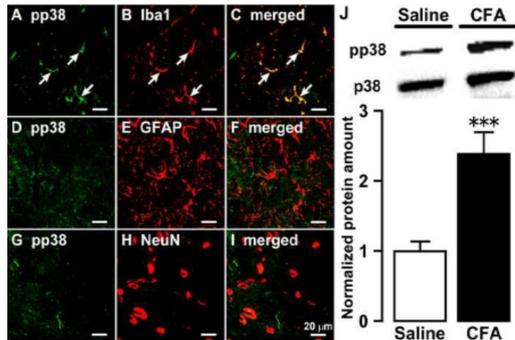


図3 pp38の局在性とCFA投与によるpp38の変化量

た(図3B)。一連の結果から顎顔面の異所性異常疼痛は、マイクログリアの pp38 の関与が示唆された。

### 3. p38 リン酸化阻害剤を用いた際の疼痛行動及び活性型マイクログリアの変化

次に、僧帽筋へのCFA投与により生じた顎顔面の疼痛行動に対してp38のリン酸化が関与しているのかをさらに詳細に調べた。これには、p38リン酸化阻害剤であるSB203580を使用した。SB203580を髄腔内投与し僧帽筋にCFAを投与した群では、CFAを投与したのみの群と比較してp38リン酸化の有意な抑制が認められた(図4A)。さらに、疼痛行動も抑制され(図4B)、マイクログリア活性化の抑制も認められた(図4D-F)。一連の結果よりp38リン酸化が顎顔面部皮膚の異所性異常疼痛発症に関与すると考えられる。

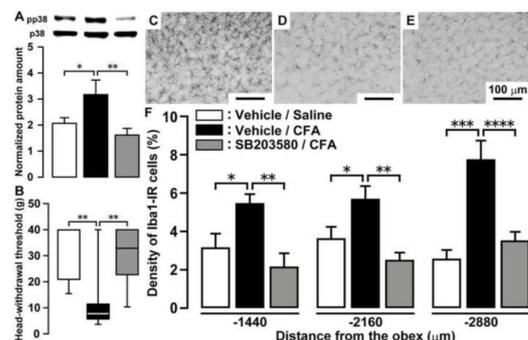


図4 p38阻害剤による頭部逃避閾値とマイクログリア活性化の抑制

### 4. マイクログリアでの IL-1 $\beta$ 合成に対する p38 リン酸化阻害の効果

申請者は過去に、僧帽筋炎モデルにおいて、

延髄及び上部頸髄に存在するマイクログリアでは、IL-1 $\beta$ の合成が促進されることを突き止めた(Kiyomoto et al., J. Neurosci. 2013)。

より詳細を確認するために、IL-1 $\beta$ とp38リン酸化との関連を研究にて今回、明らかにした。SB203580を投与し僧帽筋にCFAを投与した群のIL-1 $\beta$ 量を検討し、比較した。結果は、SB203580を投与した群では、IL-1 $\beta$ の有意な低下が認められた。このことから、p38のリン酸化におけるIL-1 $\beta$ の合成が僧帽筋CFA投与により発症する異所性異常疼痛に関与することが示唆される(図5)。

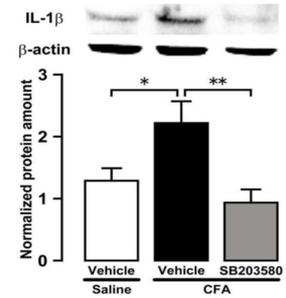


図5 p38阻害剤によるIL-1 $\beta$ の定量低下

### 5. 延髄・上部頸髄におけるニューロンの興奮性変調に対するリン酸化阻害剤の効果

SB203580を用いて顔面部に侵害刺激を加えた時のニューロン活動を細胞外記録にて記録した。ニューロンの興奮性の変化は、CFAを僧帽筋に投与した群では、高く認められた。一方、SB203580を投与し僧帽筋へCFAを投与したものではニューロンの興奮性が抑制された(図6A-C)。

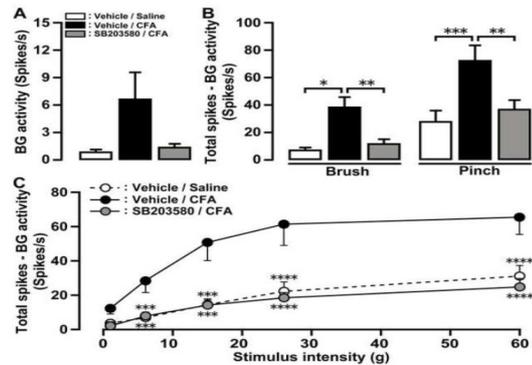


図6 p38阻害剤によるニューロン興奮性の変化

本研究より、僧帽筋へのCFA投与による顎顔面部異所性異常疼痛はマイクログリアのp38リン酸化が関与し、さらに活性型マイクログリアよりIL-1 $\beta$ が分泌されることで生じる可能性が示唆された(図7)。

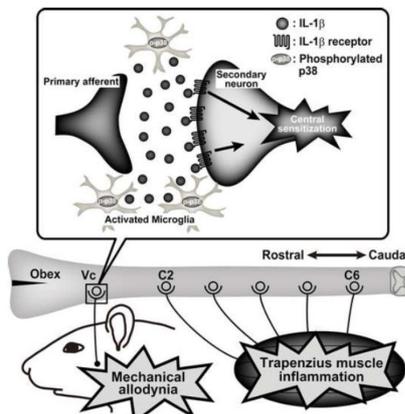
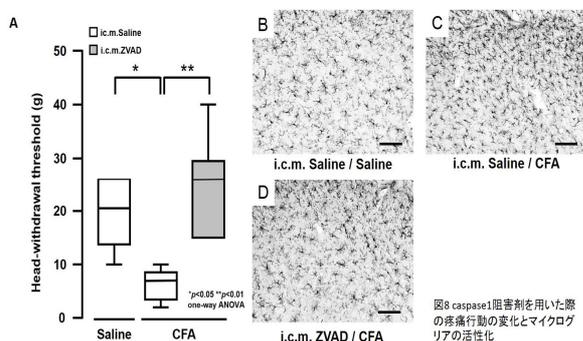


図7 異所性異常疼痛発症のメカニズム

本内容は p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats のタイトルで、Molecular Pain に現在(2015年5月26日)投稿中である。

また、caspase1 関連の実験に関して報告する。同様に僧帽筋へ CFA 投与しモデルラットを製作した。顎顔面部皮膚に von Frey filament を用いて疼痛行動の観察を行い、支配領域に当たる延髄・上部頸髄のマイクログリアの活性化を観察した。pp38 の実験結果と先行研究の報告から、申請者は IL-1 $\beta$  の合成経路に着目した。先行研究にて、IL-1 $\beta$  は pro-IL-1 $\beta$  を経て分泌され、その過程で caspase1 の影響を受けるとされる。本実験では、caspase1 の阻害剤である Z-VAD を用いた。

その結果、顎顔面部の異所性異常疼痛は抑制されたが、マイクログリアの活性化は抑制されなかった(図 8)。



このことから、caspase1 は僧帽筋への CFA 投与による顎顔面部の異所性異常疼痛の発症に関与するが、マイクログリアの活性化に影響は与えないことが示唆される。また異所性異常疼痛の維持には IL-1 $\beta$  の影響が強く考えられるがより詳細な実験が必要である。具体的には今後、顎顔面部皮膚支配領域の延髄・上部脊髄において caspase1 の特異的局在性を蛍光免疫染色にて評価する、または、caspase1 の阻害剤 Z-VAD を用いた際の IL-1 $\beta$  の定量を行う必要がある。いずれにせよ本研究結果も、異所性異常疼痛への分子メカニズム解明に役立つと考えられる。本内容に関しては、何らかの形で継続していく考えである。

若手スタートアップにおける一連の研究結果より pp38 が異所性異常疼痛の発症に関与し、さらにそれに伴い分泌される IL-1 $\beta$  によって、その維持が寄与される可能性が示唆された。

本研究内容が、顎顔面領域に発症する関連痛発症のメカニズムの基礎的研究を進展させ、臨床応用を念頭においた EBM に基づいた治療法開発の足がかりを作る一つの結果となると考えられる。

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 0 件)

Molecular Pain に現在(2015年5月26日)投稿中

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 中村史朗, 長田翔子, 望月文子, 中山希世美, 清本聖文, 山本松男, 井上富雄, 咬筋運動ニューロン樹状突起での入力情報処理機構の生後変化, 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月27日, 福岡
2. Nagata S, Nakamura S, Mochizuki A, Nakayama K, Kiyomoto M, Yamamoto M, Inoue T, Developmental changes of dendritic properties in rat jaw-closing motoneurons, 第62回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2014年12月4日, 大阪市
3. Kiyomoto Masaaki, Shinoda Msasamichi, Iwata Koichi, Inoue Tomio, Involvement of Fractalkine (FKN) in ectopic orofacial pain induced by trapezius inflammation, 第92回日本生理学会, 2015年3月23日, 神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔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

昭和大学歯学部口腔生理学講座

<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/index.html>

日本大学歯学部口腔診断学講座

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/g.oral-diagnostic-sciences/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

韓 仁陽(清本 聖文) (KIYOMOTO, Masaaki)  
昭和大学歯学部口腔生理学講座・助教  
研究者番号：00712556

(2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

井上 富雄 (INOUE, Tomio)  
昭和大学歯学部口腔生理学講座・教授  
研究者番号：70184760

岩田 幸一 (IWATA, Kouichi)  
日本大学歯学部口腔生理学講座・教授  
研究者番号：60160115

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)  
日本大学歯学部口腔生理学講座・准教授  
研究者番号：20362238

中村 史郎 (NAKAMURA, Shiro)  
昭和大学歯学部口腔生理学講座・講師  
研究者番号：60384187

望月 文子 (MOCHIZUKI, Ayako)  
昭和大学歯学部口腔生理学講座・助教  
研究者番号：10453648

中山 希世美 (NAKAYAMA, Kiyomi)  
昭和大学歯学部口腔生理学講座・助教  
研究者番号：10453648