

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11746

研究課題名(和文) 口の痛みと意欲低下の関連 動物実験系の確立とエピジェネティクス修飾の可能性

研究課題名(英文) The relation between oro-facial pain and depressive symptom Establishment of an animal experimental system and the possibility of epigenetic modification

研究代表者

佐藤 由美子 (Sato, Yumiko)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：70709857

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顔面領域の処置で神経障害を発症することがあり、難治性の神経障害性疼痛により抑うつ症状を合併する患者も少なくない。本研究では神経損傷モデル動物を用いて口腔顔面部の神経障害性疼痛と意欲低下の関連を評価するシステムを確立し、疼痛と情動の関連について免疫組織学的手法を用いて検索した。また、遺伝子発現におけるエピジェネティクス修飾の可能性についての検証も試みた。

下歯槽神経損傷モデル動物では疼痛により脳内報酬系におけるFosタンパク発現が増加しており、口腔顔面領域の慢性疼痛と情動の関連が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性疼痛の治療についてはまだ有効な治療法が確立されたとは言えず、今後さらなる開発が望まれている。

本研究により口腔顔面領域の難治性疼痛への脳内報酬系の関与が推察された。これまで慢性疼痛における抑うつ状態では、うつ病と同じように脳内の報酬系の機能低下が認められると報告されている。また、うつ病においては脳内報酬系のミクログリア活性が上昇するとも言われている。本研究により、今後、口腔顔面領域の難治性疼痛に対しミクログリア活性を制御する薬剤を開発・導入する可能性への1つの示唆となりえるのではないかと考えている。

研究成果の概要(英文)：Neuropathy can develop during procedures in the oro-facial area, and many patients have depressive symptoms due to intractable neuropathic pain. In this study, we evaluated the association between neuropathic pain in the oro-facial area and low motivation using animal models. Furthermore, we used immunohistological techniques to search for associations between pain and emotion, attempted to test the possibility of epigenetic modifications in gene expression. In animal models of inferior alveolar nerve injury, Fos protein expression in the brain's reward system was increased in response to pain, suggesting an association between chronic pain in the orofacial region and emotions.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### 口腔顔面の慢性疼痛と心理的要因について

神経障害性疼痛が慢性化し難治性となると心因性疼痛の要素が増す。痛みによるうつ状態と行動への意欲低下は、“痛みの破局的思考”につながる可能性があり、疼痛のため何もできない状態がさらに痛みを悪化させる“負のスパイラル”に陥る。

痛みの部位により日常生活への影響度は異なり、特に口腔顔面領域の感覚異常は、会話、摂食、髭剃りや化粧品といった整容が困難となり、長時間続くことで患者に強い心理的苦痛と社会的支障をきたすことが報告されている(Sandstedt and Soerensen J. Oral Maxillofac Surg. 1995)。痛みの原因の多くは埋伏智歯抜歯、腫瘍切除、外科的矯正や歯内療法といった口腔顔面領域の処置に起因する神経障害性疼痛である。特に、歯科インプラント埋入に伴う神経障害の増加は、近年問題となっている。

#### 痛みと報酬系の関わりについて

痛みと意欲低下の関係は、行動科学的にはモチベーションの低下を、神経科学的には脳内報酬系の機能低下を強く示唆する。脳内報酬系回路は、中脳辺縁系を中心とするドーパミン神経系からなり、中脳の腹側被蓋野から側坐核への経路だけでなく、扁桃核、海馬、大脳の前頭前野へも投射している。

報酬系には中脳腹側被蓋野から側坐核への VTA-NAc 系を賦活する正の強化に働くシステム(1)に対し、これを抑制して負の強化に働くシステム(2)と、VTA-NAc が関与する逃走・闘争・すくみ反応を起こすシステム(3)がある。先行研究では痛み信号が中枢神経系に入力すると、(1)~(3)のシステム全てに作用することが示唆されている。(Navratilova PNAS 2012)。また、慢性疼痛の半数近くにうつ傾向を認めると言われており、報酬系は痛みに関連した系であるとも考えられている(Stratinaki PNAS 2013)。

その背景因子に神経炎症があるとされ、抗うつ薬やある種の抗生剤・抗炎症剤は脳内報酬系を正常化させる作用がある可能性が示唆された。しかし、これらの薬剤を神経損傷早期に作用させることで神経障害性疼痛から心因性疼痛へと増悪する過程を予防できるかという点に関しては、その可能性をわずかに示した研究があるのみである(Burke Brain Behav Immun. 2014)。

#### 痛みと脳内報酬系のエピジェネティクス修飾について

エピジェネティクス修飾とは DNA の塩基配列の変化を伴わずに遺伝子発現を制御・伝達するシステムであり、主なメカニズムとしては DNA のメチル化とヒストン修飾がある。近年、慢性疼痛が脳での遺伝子発現に対し、エピジェネティックに影響を及ぼすことが示唆され注目されるようになった。ラットのストレスモデルではエピジェネティクス修飾の 1 つである DNA のメチル化促進によりうつ状態が引き起こされることが明らかにされた(Imai J. Neurosci 2011)。急性痛が慢性痛へと移行し、持続する痛みでうつ症状を引き起こすという過程において、神経は可塑的变化を起こし、その変化にエピジェネティクス修飾が関与していると予想されるが、“いつ、どのようにして、どこでエピジェネティクス修飾が起きているのか?”ということについて不明な点も多い。そのため、これらを解明することで早期からの適切な薬物投与が可能となり、機能障害を予防できると考える。

### 2. 研究の目的

口腔顔面部における慢性疼痛と症状の関連を評価できるシステムを確立し、口腔顔面部の痛みと脳内報酬系の関連および神経炎症を担う細胞の動態、および遺伝子発現におけるエピジェネティクス修飾の可能性について探求を行う。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル動物

6 週齢の SD 系雄性ラットを用い、下歯槽神経損傷モデルを作成した。

咬筋を切開して下顎骨外側を切削して下歯槽神経を露出のち、最後方臼歯と下顎孔の midpoint で神経を部分断裂させた。

#### (2) 行動実験

自発行動下の動物に対しオペラント条件付けを行い、報酬への行動を自動測定することにより疼痛関連行動の定量化を行った。実験装置として Florida 大学で開発された OPAD システムを応用し用いた。コンデンスミルクで正の条件付けを行い、ラットは温度刺激の提示部位に下顎を接触させることでこの報酬を得るように設定した。刺激温度は 630 秒の時系列内で変化させた。温度を 33 から 47 まで上昇させ、47 を維持した後、7 まで下降させ維持した。その後再び 33 へと戻した。温度刺激部位への接触時間 (Ct) とミルク摂取時間 (Lt) を計測し、報酬取得成功率に相当する Lt/Ct を算出した。測定は術前および術後 1~2 週後に計測した。

#### (3) 免疫組織染色

下歯槽神経モデル動物を術後 1 週間目に 4% paraformaldehyde 溶液を用いて灌流固定を行った。全脳を摘出し同じ固定液で 24 時間後固定を行い、50  $\mu$ m の凍結切片を作製した。1% normal horse serum でブロッキング後、mouse anti-C-fos monoclonal antibody (1:250 SantaCruz Biotechnology Inc.) で 24 時間反応させた。続いて Biotinylated anti-mouse IgG (1: Vector labs.) で 90 分インキュベーションし、Vectastain ABC kit (Vector labs.) を用いて 90 分反応させた。発色には DAB/硫酸ニッケルアンモニウム溶液を使用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 行動実験

Lt と Lt/Ct は疼痛モデル群で有意に減少した。温度別比較では、33-38 と 38-42 への上昇では両群に差はなく、術後群では 42-47 で Lt が減少、47 維持では Lt と Ct とともに減少した。

侵害受容器が応答するとされるよりも低い温度条件では接触刺激と同等の刺激が下顎に加えられたと考えられ、両群に差異はなかった。一方、温度が上昇した条件では高温に対する過敏反応により報酬への負の強化が作用したことが計測されたと考えられた。

本研究でのモデル動物は神経損傷後に神経障害性疼痛を生じていると考えられている。本行動実験は口腔顔面領域のラット自発行動下での疼痛関連行動を定量的に計測できるものと思われた。

##### (2) 免疫染色組織化学的実験

下歯槽神経モデル動物では、損傷後 7 日目で、脳内報酬系への Fos タンパク発現が認められた。扁桃体での Fos タンパク発現は ipsi lateral 側と比較して contralateral 側で強く、三叉神経系の痛みと情動が関連していることが示唆された。2018 年、Midia らは坐骨神経 CCI モデルを用いて扁桃体での Fos タンパク発現を検索し、疼痛と抑うつ行動の関連を報告した。本研究から、三叉神経領域の疼痛により脳内報酬系の Fos タンパク発現が見られたことで、この領域の疼痛と情動の関連が示唆された



Fig.1 扁桃体における Fos タンパク発現

矢印はおおよその扁桃体の位置を示しており、Fos タンパク発現が多く見られている。

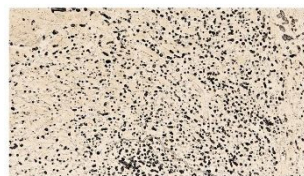


Fig.2 同部の強拡大像

また意欲低下におけるエピジェネティクス修飾の関与を検証するため、脳内報酬系において免疫組織学的手法を用いた DNA メチルトランスフェラーゼ発現の可視化が可能かどうか試行したがうまくいかなかった。そのため蛍光  $Ca^{2+}$  センサーを用いた神経活動のイメージングを検討しているが、新型コロナウイルス流行の影響により、動物の搬入およびセットアップが困難であった。現在ようやく再開し、実験を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 照光 真
2. 発表標題 オペラント条件付けによる自発行動したラットの疼痛関連行動の計測
3. 学会等名 第44回日本歯科麻酔学会学術大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	吉川 博之 (Yoshikawa Hiroyuki) (20547575)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	
研究分担者	瀬尾 憲司 (Seo Kenji) (40242440)	新潟大学・医歯学系・教授  (13101)	
研究分担者	照光 真 (Terumitus Makoto) (60401767)	北海道医療大学・歯学部・教授  (30110)	