

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02992

研究課題名(和文) 口腔顔面痛治療に向けたニューロン-グリア シグナルプロセッシング解明

研究課題名(英文) Neuron-glia signal processing for orofacial pain management development

研究代表者

松香 芳三 (MATSUKA, Yoshizo)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授

研究者番号：90243477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：顔や口腔内の痛みの発症メカニズム解明を目的として、研究を実施した。末梢神経節である三叉神経節内において、神経細胞周囲に存在するサテライトグリア細胞が、免疫機能に関連する炎症性サイトカインを遊離することにより、顔や口腔内の痛みが増強する可能性が示唆された。また、サテライトグリア細胞機能を抑制し、サイトカインの遊離を抑制することにより、顔や口腔内の痛みが抑制される可能性が示唆された。以上から、サテライトグリア細胞と神経細胞の関連性が理解できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

局所に原因を認めない難治性慢性の顔や口腔内の痛みを悩んでいる患者は多く、臨床補綴歯科医師の多くが経験している。この病態や痛みのメカニズムは十分には解明されていないため、治療は困難なことが多い。また、これらの顔や口腔内の痛みは高齢者において顕著であり、増加傾向にあるため、治療法の開発は喫緊の課題である。本研究成果は、顔や口腔内の痛みで苦しんでいる患者を救う治療法開発の一助となるものである。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted with the aim of elucidating the onset mechanism of pain in the face and oral cavity. It was suggested that satellite glial cells around nerve cells in the peripheral ganglion, the trigeminal ganglion, may increase pain in the face and oral cavity by releasing inflammatory cytokines related to immune function. It was also suggested that by suppressing satellite glial cell function and suppressing the release of cytokines, pain in the face and oral cavity may be suppressed. From the above, we could understand the relationship between satellite glial cells and nerve cells.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：グリア細胞 口腔顔面痛 痛み サイトカイン 三叉神経節

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### [臨床の問題点]

局所に原因を認めない難治性慢性口腔顎顔面痛は臨床補綴歯科医師の多くが経験する。この病態・痛みメカニズムは十分には解明されていないため、治療は困難なことが多い。また、口腔顔面痛は補綴歯科を受診する高齢者において顕著であり、増加傾向にあるため、治療法の開発は喫緊の課題である。

#### [現状の問題点]

近年の基礎研究では神経細胞周囲に存在するグリア細胞の痛み情報伝達への関与が報告されている<sup>1,2)</sup>。三叉神経節内のサテライトグリア細胞と神経節細胞との相互作用により、痛み情報が増加することが予測されるが、その詳細は不明である。三叉神経節内のサテライトグリア細胞を分離培養し、サイトカインの遊離を計測した研究報告<sup>3)</sup>は見られるものの、口腔顔面痛モデルにおける遊離計測研究はみられない。

以上から、慢性口腔顔面痛モデルの三叉神経節サテライトグリア細胞からのサイトカイン遊離計測、サテライトグリア細胞機能抑制・サイトカイン遊離抑制による痛み行動の変化観察は痛み治療の開発に向けての重要課題である。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は以下のように設定した。三叉神経節細胞を取り囲むサテライトグリア細胞と神経細胞間のニューロン - グリア シグナルプロセッシングの詳細を解明するため、(1) サテライトグリア細胞からのサイトカインの遊離、(2) 三叉神経節へのサイトカイン投与による痛み行動の変化、(3) 口腔顔面痛モデルラットへのグリア細胞機能や神経伝達物質遊離の抑制による痛み行動の変化を計測する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 三叉神経節サテライトグリア細胞からのサイトカイン遊離計測

ラット三叉神経節を摘出後、サテライトグリア細胞を分離培養した。グリア細胞培養条件下にて培養したサテライトグリア細胞に対して、神経伝達物質であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を用いて刺激し、サテライトグリア細胞から培養液中に遊離されるサイトカイン量の変化を検出した。サイトカインの検出はサイトカインアレイにより網羅的に観察した。また、眼窩下神経を結紮した神経障害性疼痛モデルにおけるサテライトグリア細胞の興奮を glial fibrillary acidic protein (GFAP) 染色により確認するとともにサテライトグリア細胞からのサイトカイン遊離量変化を計測した。

#### (2) *in vivo* での三叉神経節への CGRP 投与による痛み行動の変化

口腔顔面痛モデルではないナイーブラットの三叉神経節に CGRP を直接投与することにより、痛み行動に変化が生じるのかを観察した。痛み行動の変化は温熱刺激や冷刺激を顔面部に与えることにより実施した。本システムにおいては、顔面部温冷刺激ボックス内でラットが顔面部皮膚を金属チューブに当てて飲水することにより、電流の導通が生じ、接触時間をコンピュータに記録することが可能である。痛み行動が観察される場合、温冷刺激では接触時間が短くなることが理解されている。CGRP 刺激によりサテライトグリア細胞が興奮していることを GFAP 染色により確認した。また、サイトカインアレイにより、三叉神経節におけるサイトカイン量の変化を観察した。

#### (3) 口腔顔面痛モデルラットへのグリア細胞機能抑制薬あるいは神経伝達物質遊離抑制薬投与による痛み行動の変化計測

眼窩下神経を緩く結紮した口腔顔面痛モデルや CGRP 投与による痛みモデルに対し、炎症性サイトカイン受容体抗体、抗炎症性サイトカイン、グリア細胞機能抑制薬 (ミノサイクリン)、神経伝達物質遊離抑制薬 (ボツリヌス毒素) などを三叉神経節に直接投与することにより、痛み行動が変化するかを観察した。痛み行動の観察には顔面部温冷刺激ボックスあるいは von Frey 機械刺激装置を使用した。また、サイトカイン発現の変化を観察した。

### 4. 研究成果

#### (1) 三叉神経節サテライトグリア細胞からのサイトカイン遊離計測

ラット三叉神経節を摘出後、サテライトグリア細胞を分離培養した。グリア細胞培養条件下にて培養したサテライトグリア細胞に対して、神経伝達物質であるカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を用いて刺激し、サテライトグリア細胞から培養液中に遊離されるサイトカインを検出した。サイトカインの検出はサイトカインアレイにより網羅的に行った。その結果、CXCL9、IL-3 などのサイトカインの遊離は刺激を加えない条件と比較して、増加することが観察された。

また、眼窩下神経を結紮した三叉神経障害性疼痛モデルラットの痛み行動ならびに三叉神経節におけるサイトカインの変化も観察した。機械刺激を加えた時の、ベースラインの頭部逃避閾値は約 110 g であったが、眼窩下神経結紮手術後には約 50g まで有意に低下し、偽手術側と比較して有意に低い結果が認められた。免疫組織化学染色では、手術 1、7、14 日後に偽手術側と比

較して眼窩下神経結紮側の三叉神経節において、GFAP 染色によりサテライトグリア細胞の活性化が観察された。サイトカインアレイを用いて解析すると、CXCL-2、CINC-3、TNF- $\alpha$ 、CINC-2 / $\beta$ 、IL-1 $\alpha$ 、IL-3、IL-17、および IL-4 は、眼窩下神経結紮手術 1 日後に増加し、14 日後に減少した。反対に眼窩下神経結紮手術 1 日後に増加が認められず、14 日後に増加したサイトカインは IL-10 および MIP-3 であった。

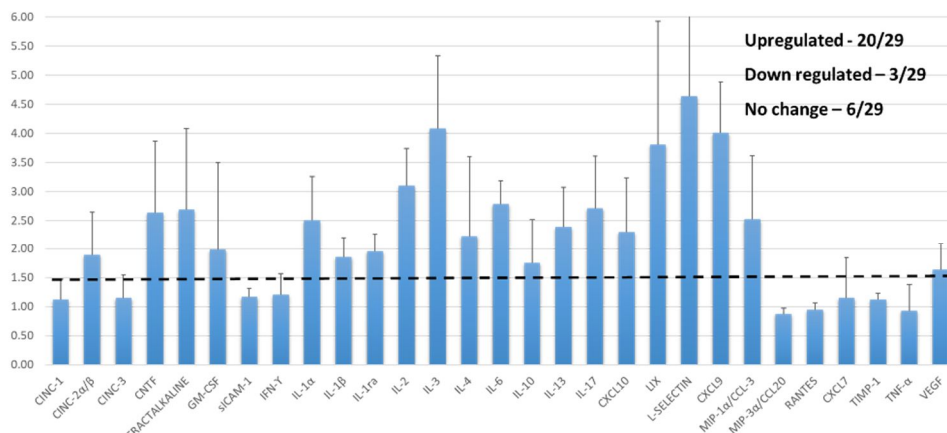


図1 CGRP 投与によるサテライトグリア細胞からのサイトカイン遊離

### (2) *in vivo*での三叉神経節への CGRP 投与による痛み行動の変化

カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) をラット三叉神経節に直接投与し、口腔顔面侵害性疼痛発現とグリア細胞からのサイトカイン遊離の変化を観察した。CGRP をラット三叉神経節に直接投与後、口腔顔面痛評価装置を用いて熱痛覚過敏を評価したところ、投与 6 時間後において、顔面部への 45 ° の刺激により、痛み行動反応の増加が観察された。また、CGRP 投与後、グリア細胞の活性上昇が観察され (GFAP 発現の増加) サイトカインアレイにより炎症性サイトカイン IL-1、抗炎症性サイトカイン IL-1RA、ニューロンの活性化を示す NaV1.7 の mRNA 発現の増加が観察された。

この結果から、三叉神経節内のサテライトグリア細胞がサイトカインを遊離することにより、痛み情報伝達に関連していることが解明され、グリア細胞機能を抑制することによる侵害受容刺激の制御に関する可能性が示唆された。

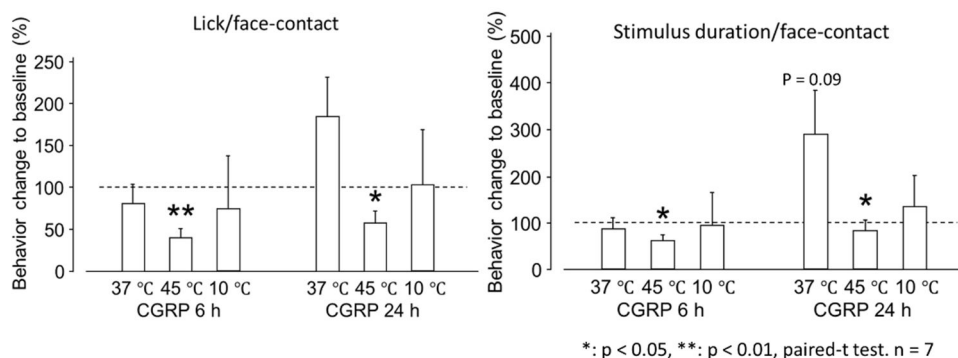


図2 三叉神経節への CGRP 投与による痛み行動の変化

### (3) 口腔顔面痛モデルラットへのグリア細胞機能抑制薬あるいは神経伝達物質遊離抑制薬投与による痛み行動の変化計測

眼窩下神経結紮モデルラットの三叉神経節に炎症性サイトカイン受容体抗体、抗炎症性サイトカイン、神経伝達物質遊離抑制薬を直接投与し、ラットの痛み行動変化を観察した。また、CGRP を三叉神経節に投与することにより、口腔顔面痛を誘発させたラットの三叉神経節にグリア細胞機能抑制薬を直接投与した場合の痛み行動の変化を観察した。

眼窩下神経結紮モデルの三叉神経節に炎症性サイトカイン受容体抗体 (抗 CXCL2 抗体)、抗炎症性サイトカイン (IL-10)、神経伝達物質遊離抑制薬 (ボツリヌス毒素) を直接投与することにより、軽減していた頭部逃避閾値は回復した。このことから、神経障害性疼痛が軽減されたことが理解できた。また、グリア細胞機能抑制作用のあるミノサイクリンを CGRP による顔面痛誘発モデルラットの三叉神経節に投与することにより、CGRP で誘発された痛み行動反応が軽減されるとともに、グリア細胞の活性ならびに IL-1 および IL-6 の mRNA 発現量が減少した。

以上から、グリア細胞機能を抑制することにより、神経障害性疼痛を軽減することが可能であることが示唆された。

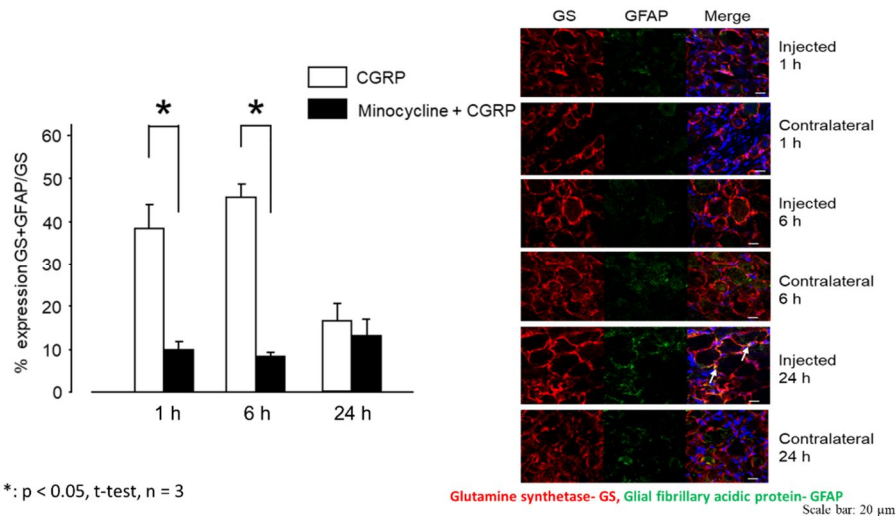


図3 三叉神経節へのミノサイクリン投与によるグリア細胞の活性化の軽減

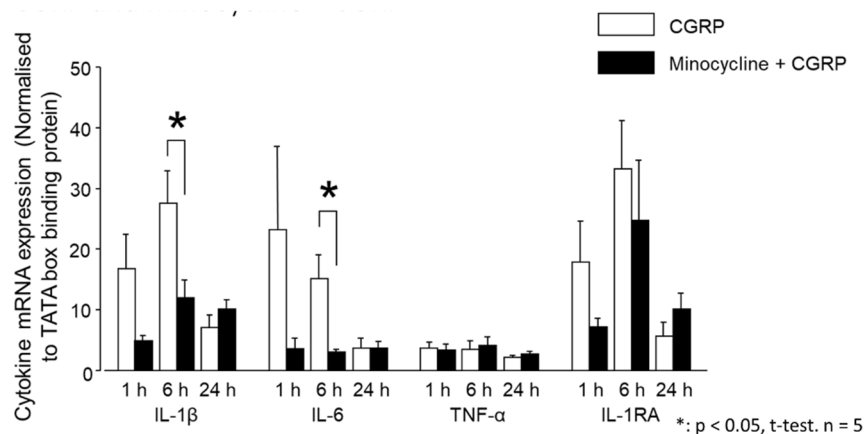


図4 三叉神経節へのミノサイクリン投与による遺伝子発現の変化

<引用文献>

1. Marinelli S, Vacca V, Ricordy R, Ugenti C, Tata AM, Luvisetto S, Pavone F. The analgesic effect on neuropathic pain of retrogradely transported botulinum neurotoxin A involves Schwann cells and astrocytes. PLoS One 7:e47977. 2012.
2. Ferrari LF, Lotufo CM, Araldi D, Rodrigues MA, Macedo LP, Ferreira SH, Parada CM. Inflammatory sensitization of nociceptors depends on activation of NMDA receptors in DRG satellite cells. Proc Natl Acad Sci USA 111:18363-18368, 2014.
3. Ceruti S, Villa G, Fumagalli M, Colombo L, Magni G, Zanardelli M, Fabbretti E, Verderio C, van den Maagdenberg AMJM, Nistri A, Abbracchio MP. Calcitonin gene-related peptide-mediated enhancement of purinergic neuron/glia communication by the algogenic factor bradykinin in mouse trigeminal ganglia from wild-type and R192Q Cav2.1 Knock-in mice: implications for basic mechanisms of migraine pain. J Neurosci 31:3638-3649, 2011.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Liu Y, Xia L, Kano F, Hashimoto N, Matsuka Y, Yamamoto A, Tanaka E	4. 巻 34
2. 論文標題 Low-intensity pulsed ultrasound ameliorates neuropathic pain induced by partial sciatic nerve ligation via regulating macrophage polarization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Health and Biosciences	6. 最初と最後の頁 11~18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.20738/johb.34.1_11	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Waskitho A, Yamamoto Y, Raman S, Kano F, Yan H, Raju R, Afroz S, Morita T, Ikutame D, Okura K, Oshima M, Yamamoto A, Baba O, Matsuka Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Peripherally administered botulinum toxin type A localizes bilaterally in trigeminal ganglia of animal model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/toxins13100704	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Afroz Shaista, Arakaki Rieko, Iwasa Takuma, Waskitho Arief, Oshima Masamitsu, Matsuka Yoshizo	4. 巻 21
2. 論文標題 Role of CGRP in Neuroimmune Interaction via NF- B Signaling Genes in Glial Cells of Trigeminal Ganglia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21176005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Abe Susumu, Miyagi Akane, Yoshinaga Kaoru, Matsuka Yoshizo, Matsumoto Fumihiko, Uyama Emi, Suzuki Yoshitaka, Oshima Masamitsu, Okura Kazuo, Tanaka Eiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Immediate Effect of Masticatory Muscle Activity with Transcutaneous Electrical Nerve Stimulation in Muscle Pain of Temporomandibular Disorders Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Medicine	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/jcm9103330	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shimada Akiko, Ishigaki Shoichi, Matsuka Yoshizo, Komiyama Osamu, Torisu Tetsuro, Oono Yuka, Sato Hitoshi, Naganawa Takuya, Mine Atsushi, Yamazaki Yoko, Okura Kazuo, Sakuma Yasushi, Sasaki Keiichi	4. 巻 46
2. 論文標題 Effects of exercise therapy on painful temporomandibular disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 475 ~ 481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.12770	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Padilla Mariela, Matsuka Yoshizo	4. 巻 11
2. 論文標題 Neuropathic pain: the evidence behind the facts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Revista iDental, ULACIT-Costa Rica	6. 最初と最後の頁 1659 ~ 4916
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsuka Yoshizo, Afroz Shaista, Dalanon Junhel C., Iwasa Takuma, Waskitho Arief, Oshima Masamitsu	4. 巻 108
2. 論文標題 The role of chemical transmitters in neuron-glia interaction and pain in sensory ganglion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience & Biobehavioral Reviews	6. 最初と最後の頁 393 ~ 399
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neubiorev.2019.11.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Afroz Shaista, Arakaki Rieko, Iwasa Takuma, Oshima Masamitsu, Hosoki Maki, Inoue Miho, Baba Otto, Okayama Yoshihiro, Matsuka Yoshizo	4. 巻 20
2. 論文標題 CGRP Induces Differential Regulation of Cytokines from Satellite Glial Cells in Trigeminal Ganglia and Orofacial Nociception	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20030711	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa Takuma, Afroz Shaista, Inoue Miho, Arakaki Rieko, Oshima Masamitsu, Raju Resmi, Waskitho Arief, Inoue Masahisa, Baba Otto, Matsuka Yoshizo	4. 巻 703
2. 論文標題 IL-10 and CXCL2 in trigeminal ganglia in neuropathic pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 132 ~ 138
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2019.03.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 S.Raman, A.Waskitho, K.Okura, D.Ikutame, M.Oshima, Y.Matsuka
2. 発表標題 Evaluation of tetrahydrobiopterin pathway in orofacial pain model
3. 学会等名 徳島大学脳科学クラスターミニトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A.Waskitho, Y.Yamamoto, S.Raman, F.Kano, H.Yan, K.Okura, D.Ikutame, M.Oshima, O.Baba, A.Yamamoto, Y.Matsuka
2. 発表標題 Bilateral botulinum toxin type A effect on orofacial neuropathic pain of animal model
3. 学会等名 徳島大学脳科学クラスターミニトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Chavan P, Chikahisa S, Dalanon J, Okura K, Matsuka Y
2. 発表標題 Effects of a dual orexin receptor antagonist drug on nociceptive behavior in predictable chronic mild stress: an animal study
3. 学会等名 Asian Academy of Orofacial Pain and Temporomandibular Disorders (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Swarna R, Waskitho A, Oshima M, Matsuka Y
2. 発表標題 Tetrahydrobiopterin pathway: A therapeutic target for neuropathic pain model
3. 学会等名 Japanese Association for Dental Research
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岩浅匠真, 井上美穂, R.Raju, 大島正充, 松香芳三
2. 発表標題 IL-10は神経障害性疼痛を抑制する
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 S.Laksmi, A.Waskitho, R.Raju, Y.Matsuka
2. 発表標題 Evaluation of BH4 pathway in chronic pain model
3. 学会等名 徳島大学脳科学クラスターミニリトリート
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 P.Chavan, S.Chikahisa, J.Dalanon, K.Okura, Y.Matsuka
2. 発表標題 Effects of dual orexin receptor antagonist drug on nociceptive behavior in predictable chronic mild stress mouse model
3. 学会等名 徳島大学脳科学クラスターミニリトリート
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 山本由弥子, A.Waskitho, H.Yan, R.Raju, S.L.Raman, 美間健彦, 後藤和義, 横田憲治, 松下 治, 松香芳三
2. 発表標題 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルにおいて片側に投与されたA型ボツリヌス神経毒素の両側性の鎮痛効果
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Matsuka Yoshizo
2. 発表標題 Diagnosis and management of occlusal discomfort (occlusal dysesthesia)
3. 学会等名 Philippine Dental Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Afroz Shaista, Arakaki Rie, Iwasa Takuma, Oshima Masamitsu, Hosoki Maki, Inoue Miho, Baba Otto, Okayama Yoshihiro, Matsuka Yoshizo
2. 発表標題 Orofacial nociception due to glial expressed cytokines in trigeminal ganglia
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Afroz Shaista, Arakaki Rie, Iwasa Takuma, Oshima Masamitsu, Baba Otto, Matsuka Yoshizo
2. 発表標題 Orofacial pain due to glial expressed cytokines in trigeminal ganglion
3. 学会等名 Dentisphere (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩浅匠真, S.Afroz, J.Danalon, 大島正充, 大倉一夫, 井上美穂, 松香芳三
2. 発表標題 三叉神経痛モデルラットにおける炎症性サイトカインの変動解析
3. 学会等名 日本顎関節学会・日本口腔顔面痛学会・日本歯科心身医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshizo Matsuka
2. 発表標題 Basic pain mechanisms and management of orofacial pain and temporomandibular disorders
3. 学会等名 Indian Prosthodontic Society (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshizo Matsuka
2. 発表標題 Neurotransmitters in orofacial pain transmission mechanisms
3. 学会等名 Philippine Dental Association (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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	大島 正充  (OSHIMA Masamitsu)  (00548307)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・准教授   (16101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	山本 由弥子  (YAMAMOTO Yumiko)  (20403496)	岡山大学・医歯薬学域・助教    (15301)	
研究分担者	岩田 幸一  (IWATA Koichi)  (60160115)	日本大学・歯学部・特任教授    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関