

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463134

研究課題名(和文) 卵巣摘出動物における神経障害性疼痛の制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the neuropathic pain control mechanism in the ovariectomized rats

研究代表者

杉村 光隆 (SUGIMURA, MITSUTAKA)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90244954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：女性ホルモンであるエストロゲンの神経障害性疼痛に対する修飾作用を卵巣摘出(OVX)ラットを用いて検討した。行動学的手法により、エストロゲンは神経障害性疼痛の急性炎症期には増悪因子として、慢性期には減弱因子として作用することを明らかにした。本研究では、特に急性炎症期におけるエストロゲンの作用に着目し、研究を行った。具体的には、炎症性疼痛に重要な役割を担うカプサイシン受容体であるTRPV1とAN01の発現量に及ぼすエストロゲンの影響を検討した。その結果、エストロゲンがTRPV1やAN01の発現量を亢進させることで、炎症性疼痛を増悪させることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effect of estrogen to the neuropathic pain in the ovariectomized rats. It was revealed by the behavioral approach that estrogen acts as aggravating factors in the acute inflammatory phase of neuropathic pain and as the attenuation factor in the chronic phase. In this study, we particularly focused on the effects of estrogen in the acute inflammatory phase. Specifically, we investigated the effect of estrogen on TRPV1 and AN01 expression level which play an important role in inflammatory pain. As a result, it has been suggested that estrogen exacerbates the inflammatory pain by enhancing the expression of TRPV1 and AN01.

研究分野：歯科麻酔

キーワード：卵巣摘出ラット 神経障害性疼痛 侵害受容性疼痛 TRPV1 AN01 エストロゲン

1. 研究開始当初の背景

更年期障害の原因は、閉経前後に卵巣機能が低下し、エストロゲン (Es) やプロゲステロン (Pg) などの分泌量の低下に加えて、脳下垂体からの性腺刺激ホルモンの分泌が亢進し、女性ホルモンのバランスが乱れることに起因する。一連の変化は自律神経機能や情動にまで影響を及ぼし、うつや不安、ホットフラッシュ (のぼせ、発汗)、冷えなどを主症状とする本障害に悩む女性は多い。

一方、何らかの原因によって知覚神経が障害されると、時に感覚回路網の可塑的变化の結果、難治性の神経障害性疼痛を発症するが、最近の研究では性周期や更年期障害が痛覚閾値を修飾することが報告されている。感覚が繊細な顔面領域を支配する三叉神経では、女性ホルモンの Es 受容体が豊富に存在しており、女性患者における顎関節症の疼痛が Es の変動によって修飾されることは確かである。また、咬筋における炎症性疼痛モデルでの分子生物学的研究では、Es 受容体の一つである G-protein coupled 型 (GPR30) が Es に反応して、侵害受容器活性化の特異的指標である分裂促進因子活性化タンパク質キナーゼ (ERK) を活性化し、咬筋の神経障害性疼痛 (アロディニア) を二次的に惹起すると考えられている。

以上は、顎関節症または咬筋の主に炎症性疼痛に起因するものであるが、歯科ペインクリニック外来で遭遇する口腔顔面領域の神経障害性疼痛には、インプラントや抜歯、抜髄など、歯科的侵襲を契機に発症していながら、長期間の経緯を経た結果、その痛みの原因が特定できず、非定形口腔顔面痛と診断されてしまう場合がある。その頻度は顎関節症や咬筋の炎症性疼痛よりはるかに高く、かつ難治性の症例が多いが、病態は十分解明されていない。この病態解明のため、近年、三叉神経第2枝の眼窩下神経や第3枝の下歯槽神経の結紮あるいは切断による神経障害性疼痛

モデルを用いて、行動学的手法による疼痛評価に加え、分子生物学的的手法によって疼痛感受性の指標となる c-fos タンパクなどの検索が活発に行われている。しかしながら、エストロゲンなどの女性ホルモンの変動と神経障害性疼痛との関連を検討した報告は極めて少なく、特に、三叉神経領域の神経障害性疼痛に関する報告はこれまで認められない。

2. 研究の目的

上述のように女性ホルモンが神経障害性疼痛を修飾する可能性が考えられるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。そこで本研究では、卵巣摘出による更年期様状態の動物モデルの口腔顔面領域に神経障害性疼痛を発症させた場合の痛覚感受性の行動学的変化、および痛み受容に関わるタンパクの発現動態を分子生物学的に検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1: エストロゲンの神経障害性疼痛への修飾作用を行動学的に検討した。17 β -Estradiol 徐放性ベレットを埋入した卵巣摘出 (OVX) ラットに神経障害性疼痛を発症させ、疼痛閾値の経時的变化を観察した。

実験 2: 実験 1 よりエストロゲンは神経障害性疼痛発症初期の急性炎症期には増悪因子として、慢性期では減弱因子として作用することが明らかとなった。このため、実験 2 では発症初期の急性炎症期を想定し、エストロゲンの作用を行動学的、免疫組織学的手法を用いて検討した。

実験 3: 実験 2 の結果より、エストロゲンは急性炎症期の症状を一次感覚ニューロンまたは脊髄の後角に相当する三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) で修飾する可能性が示された。このため実験 3 では三叉神経節で炎症性

疼痛に重要な役割を担うとされるカプサイシン受容体の Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) と TRPV1 と共役するとされる Anoctamin1 (ANO1) の発現量に及ぼすエストロゲンの作用を分子生物学的手法により検討した。

4. 研究成果

実験 1

神経障害性疼痛に対するエストロゲンの修飾作用を行動学的に検討した。ラットの卵巢を摘出し (OVX)、OVX 後 7 日後に 17 β -Estradiol 徐放性ペレットを埋入する群 (OVX+E 群) と非埋入群 (OVX 群) のモデル動物を作製した。いずれの群も OVX14 日後に左側の眼窩下神経を結紮し、神経障害疼痛を発症させ、Von Frey Test で疼痛閾値の経時的变化を観察した。その結果、OVX+E 群は OVX 群と比べ、結紮 3 日後では疼痛閾値が有意に低下するが、結紮 28 日後では逆に閾値が有意に上昇することが明らかとなった。このことから、エストロゲンは神経障害性疼痛発症初期の急性炎症期では増悪因子として、慢性期では減弱因子として作用する可能性が示された。

実験 2

実験 1 の結果より神経障害性疼痛発症初期でのエストロゲンの作用を、行動学的、免疫組織学的手法を用いて検討した。OVX ラットに OVX12 日、13 日目後に高容量 (40 μ g; HE 群) または低容量 (4 μ g; LE 群) を 2 日間連続単回投与し、OVX14 日後に実験を行った。行動学的検討は eye wipe test を行った。ラットの左側眼球に vehicle または 1mM のカプサイシン溶液を滴下し、疼痛関連行動を 5 分間観察した。その結果、HE 群の方が LE 群に比べ、疼痛関連行動時間が有意に延長した。以上のことから、エストロゲンは急性炎症期の症状を増悪することを確認した。

次に急性炎症期に対するエストロゲンの作用部位を検討するため、Vc で c-Fos 蛋白の免疫染色を行った。左側眼球に vehicle, 1mM または 10mM のカプサイシン溶液を滴下、2 時間後に灌流固定し、通法に従い c-Fos 蛋白の免疫染色を行った。その結果 HE 群の方が三叉神経脊髄路核尾側亜核・頸髄境界部 (Vc/C1) で c-Fos 陽性細胞が有意に多かった。以上より、神経障害性疼痛発症初期 (急性炎症期) でのエストロゲンの作用部位は Vc/C1 または一次感覚ニューロンであることが示唆された。

実験 3

実験 2 の結果より、一次感覚ニューロンに対するエストロゲンの作用を検討するため、ラットの三叉神経節を摘出し、カプサイシン受容体である TRPV1 及び TRPV1 と共役する ANO1 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR を用いて HE 群と LE 群で比較検討した。その結果、いずれの mRNA 発現量も HE 群の方が有意に多かった。以上より、エストロゲンは TRPV1 や ANO1 といった侵害受容体の発現を亢進させることで、神経障害性疼痛発症初期 (急性炎症期) での症状を亢進させることが示唆された。

今後は Vc でのエストロゲン作用部位の特定や、慢性期におけるエストロゲンの影響を検討していく予定である。

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)

[学会発表](計 2 件)

1. 山形 和彰, 杉村 光隆, 吉田 好紀, 丹羽均ら: ラット三叉神経節で TRPV1, ANO1 発現量に及ぼすエストロゲンの影響, 第 43 回歯科麻酔学会学術集会, 2015.10.31, 東京

2. 山形 和彰, 杉村 光隆, 吉田 好紀, 丹羽均ら: 卵巢摘出ラットに発症させたカプサイシン誘発性口腔顔面痛に対するエストロゲンの影響, 第 42 回歯科麻酔学会学術集会, 2014.10.11, 新潟

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉村 光隆 (Mitsutaka Sugimura)

鹿児島大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：90244954

(2)研究分担者

丹羽 均 (Hitoshi Niwa)

大阪大学・大学院・歯学研究科 教授

研究者番号：30218250