

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11320

研究課題名(和文) 口腔顔面領域のガン性疼痛におけるエンドセリンの役割とその治療法

研究課題名(英文) Role of the endothelin in oral cancer related pain

研究代表者

原野 望 (HARANO, NOZOMU)

九州歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：50423976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ET-1は口腔粘膜炎症において増加するが、口内炎疼痛に関連するかは不明である。本研究ではET-1の関与を調べるために、酢酸誘発潰瘍性口内炎ラットを用いて検討した。潰瘍部を介した細菌侵入後のET-1産生増加は、ETBを介するプロスタノイド産生によるTRPA1活性化を介した自発痛とETA/ETBを介したTRPA1およびTRPV1活性化が関与する機械的アロディニアを誘発する一方、ET-1非依存性経路を介した機械的アロディニアが生じることが示された。これらの結果から、ボセンタンがエンドセリンシグナル伝達遮断薬として潰瘍性口内炎患者に対する有効な鎮痛薬として期待される。

研究成果の概要(英文)：ET-1 is upregulated in oral mucosal inflammation, although it has not been shown to induce pain in oral ulcers. In the present study, we investigated the involvement of ET-1 signaling with oral ulcer-induced pain using our proprietary assay system in conscious rats. ET-1 upregulation following oral bacterial invasion via the ulcerative region elicits TRPA1-mediated spontaneous pain due to ETB receptor-accelerated prostanoid production, and TRPA1- and TRPV1-mediated mechanical allodynia via both ETA and ETB receptors, while ET-1-independent pathways also induce pain in the model. The findings highlight the potential of endothelin signaling blockers as effective analgesics for oral ulcer patients, together with the significant analgesic effects of the clinically available drug bosentan.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：Orofacial pain Oral Pathology Inflammation Neuropharmacology Neuroscience Infectious disease

1. 研究開始当初の背景

再発性アフタ性口内炎患者、義歯や歯科矯正器具の装着患者および化学放射線治療中のがん患者では、潰瘍性口内炎が頻繁に発症し、その痛みが食事の咀嚼や嚥下を妨げ、最終的に患者の QOL が低下する。しかし、潰瘍性口内炎の疼痛発生機序については不明な点が多く、有効な治療法は少ない。これまで我々は潰瘍性口内炎の疼痛メカニズムを解明し、より適切な鎮痛法を探るために、覚醒下ラットにおける新規口内疼痛評価法を開発した。そして、様々な潰瘍性口内炎ラットモデルにおいて、TRPV1, TRPA1, TRPV4 の活性化/感作による COX 依存性自発痛および COX 非依存性機械的アロディニアの発生機序を明らかにした。

ET-1 は 21 個のアミノ酸ペプチドであり、エンドセリン変換酵素、キマーゼ/ネプリライシンによって big ET-1 から変換され、主に血管内皮細胞および上皮細胞に由来する。このペプチドは、潰瘍性口内炎や歯肉炎症により発現が増加し、プロスタノイド産生を促進することが報告されている。ET-1 受容体の ET_A および ET_B は、上皮細胞や炎症細胞だけでなく、末梢感覚神経においても発現する。ET_A の活性化はプロテインキナーゼ C の活性化を介してカブサイシンに対する応答性を増強させ、ET_B の活性化は三叉神経節ニューロンにおける細胞内ストアからの Ca²⁺ 放出を誘導する。ラットの口唇や顎関節へ ET-1 を投与すると、疼痛関連行動が誘発され、また眼窩下神経傷害モデルラットにおいても ET_A および ET_B 受容体を介した機械的および熱アロディニアが生じる。これらのことから、ET-1 シグナル伝達は、口内炎部における COX 依存性または非依存性に疼痛を誘導する可能性がある。

2. 研究の目的

侵害受容性 TRP チャネルを軸とした潰瘍性口内炎誘発疼痛における ET-1 シグナル伝達の関与について検討した。実験には、酢酸誘発潰瘍性口内炎モデルラットを使用した。

3. 研究の方法

使用動物

雄性 Wistar ラット (8-9 週齢) を用い、潰瘍性口内炎モデルを作製した。ラットをペントバルビタール (50mg/kg, 腹腔内投与) で麻酔した。9 mm² の濾紙を 50% 酢酸に浸し、下顎口腔前庭に 30 秒間留置すること

で口内炎を惹起した。

口腔粘膜表面の pH 測定

酢酸処理後の酸性度を確認するために、2% イソフルラン麻酔下にて下顎口腔前庭粘膜表面の pH を、小電極を用いて、ポータブル pH メーターにて測定した。

組織学、免疫組織化学、免疫蛍光染色
酢酸処理後の口内炎重症度を評価するために、HE 切片にて口腔粘膜表面から筋肉層までの垂直的距離を計測した。

口内炎部組織のパラフィン切片についてトルイジンブルー染色を行い、肥満細胞の脱顆粒を評価した。

ET-1 産生を調べるため、免疫組織化学的手法を用いて ET-1 の免疫染色を行った。

潰瘍部を支配する一次感覚神経を標識するために、酢酸処理 2 日前に 50 μL のハミルトンシリンジと 30G の注射針を用いて下顎口腔前庭部に逆行性神経トレーサー FluoroGold (FG, in saline 4%) 10 μL を投与した。FG 投与 4 日目に TG を採取した。ラット一匹あたり TG5 枚の切片における FG 標識細胞および FG 標識 TRPV1 /TRPA1 陽性 (IR) 細胞の総数を算出した。

細菌数カウントおよび酵素結合免疫吸着法

潰瘍性口内炎ラット (酢酸処理 1, 2 日目) 下顎口腔前庭組織を採取し、細菌培養プレートのコロニー形成数 (CFUS) をカウントした。CFUS の数は、組織重量ごとに算出した。

次に、BCA タンパク質アッセイキットを用いて全タンパク質濃度を測定した。上清中の IL-1, IL-10, ET-1, PGE₂, 15d-PGJ₂ および好中球エラスターゼの濃度を ELISA キットでそれぞれ測定した。

定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応
粘膜組織および TG の第 3 枝を採取し、直ちに RNA later に浸け、マイナス 80 で凍結させた。解凍後、ホモジナイズを行い、RNeasy Mini Kit を用いて全 RNA を抽出し、ランダムヘキサマーを用いて逆転写した。THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix を用いて 7300 リアルタイム PCR システムにて cDNA を増幅させた。TRPV1, TRPA1, TRPV4 および β -actin のプライマーセットに加えて、それぞれのプライマーセットを使用した。

薬物投与
 抗菌薬として、スルファメトキサゾール (800 $\mu\text{g/mL}$) とトリメトプリム (400 $\mu\text{g/mL}$) を飲料水に溶解し、酢酸処理の 2 日前から飲水を開始し、4 日間 (酢酸処理 2 日目まで) 継続した。抗炎症薬として、非選択的 COX 阻害薬 インドメタシン (5 mg/5 mL/kg) を腹腔内投与した。薬物投与は酢酸処理 2 日目 (行動実験の 4-6 時間前) に一回行った。潰瘍性口内炎誘発疼痛における ET-1 シグナル伝達の関与を評価するために、ET-1 非選択的受容体拮抗薬であるボセンタン (10 mg/mL/kg, 10% DMSO in saline) を酢酸処理 2 日目 (行動実験の 1 時間前) に尾静脈投与した。

潰瘍性口内炎ラットの局所疼痛メカニズムを調べるために、2% イソフルラン麻酔下 (組織採取および行動試験の 1 時間前) にて以下の薬液 (20 μL) を浸した綿球を潰瘍部に 5 分間留置した。

口腔粘膜における ET-1 誘発痛のメカニズムを調べるために、100 μM の ET1 または ET_B 受容体選択的作動薬 ET-3 (10 μL in saline) を、50 μL ハミルトンシリンジと 30G の注射針を用いて、2% イソフルラン麻酔下にて下顎口腔前庭部に粘膜下投与した。局所塗布と同濃度の SB-366791 (TRPV1), HC-030031 (TRPA1 拮抗薬) および RN-1734 (TRPV4 拮抗薬) を、各 TRP チャネル活性化をブロックするために ET-1 または ET-3 と共投与し潰瘍性口内炎ラットにおける TRPV1 感受性について調べるために、口腔内滴下法を用いて覚醒下ラットの口腔粘膜に TRPV1 活性化薬 CPS (100 μM in 0.1% DMSO 含有水) を滴下した。術者の左手にラットを保持し、人差し指を用いてラットの下顎口腔粘膜を露出した。そして露出粘膜に向けてプラスチックスポイトを用いて CPS 溶液を滴下した。

疼痛関連行動の測定

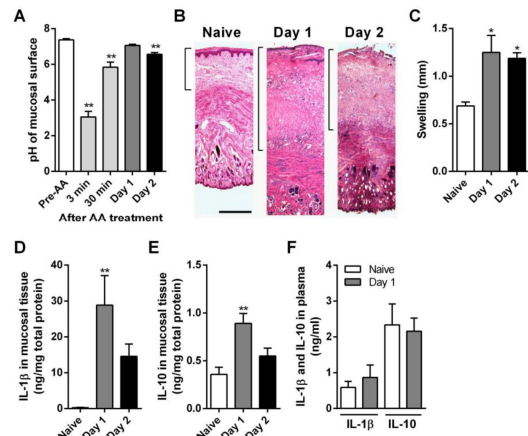
自発痛および CPS 誘発痛の指標であるラビング行動 (口舐め行動) を測定した。16:00-18:00 の間に自発痛および CPS 誘発痛の評価としてそれぞれ 10 分間または 3 分間、ラビング時間を測定した。

口腔粘膜への機械的刺激に対する逃避閾値は、フォンフライフィラメント (0.1, 0.12, 0.2 および 0.3 g の自作フィラメントを含むフィラメント 0.02-0.4g) を用いて測定した。Naive および潰瘍性口内炎ラットの口腔粘膜に機械的刺激を加え、機械逃避閾値

は、アップダウン法に従い逃避行動を示す最低値として定義した。各測定は 3-4 分間隔で 5 回繰り返し、測定値は最大値と最小値を除いた 3 回分の平均値を算出した。

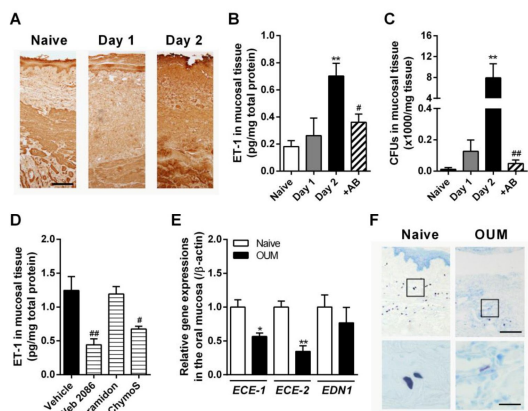
4. 研究成果

口腔粘膜への酢酸処理後の病態



酢酸処理 3 分後の粘膜表面は強酸性 ($\approx \text{pH} 3$) であったが、30 分後では弱酸性 ($\approx \text{pH} 6$) を示した。酢酸処理 1 日目には正常レベルに回復したが、酢酸処理 2 日目には pH がわずかに低下した (A)。酢酸処理 1 日目の組織学的観察により、粘膜層の肥厚および所々での基底層の消失が認められた。酢酸処理 2 日目には基底層が剥離し、潰瘍形成が認められた (B)。筋肉層と粘膜表面間の距離は、酢酸処理 1, 2 日目に有意に拡大した (C)。潰瘍部の炎症性サイトカイン IL-1 と抗炎症性サイトカイン IL-10 の濃度は酢酸処理 1 日目に有意に増加し、2 日目では徐々にベースラインに戻った (D, E)。IL-10 の濃度は、IL-1 の濃度よりも低かった。さらに潰瘍部とは異なり、酢酸処理 1 日目の血漿中 IL-1 と IL-10 の濃度は変化しなかった (F)。よってサイトカインレベルは全身には変化しないことが示唆された。

潰瘍部における ET-1 の発現

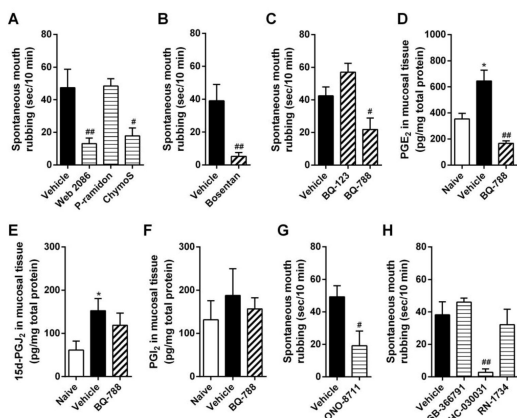


酢酸処理 2 日目において潰瘍部全体で ET-1 陽性像が認められた (A)。また、潰

瘍部組織中の ET-1 量も有意に増加した (B)。潰瘍部における CFU₅ 数も有意に増加した (C)。この ET-1 濃度と CFU₅ の増加は抗菌薬前処置によって抑制されたことから、ET-1 産生は酢酸処理 2 日目の潰瘍部における細菌侵入によって引き起こされることが示唆された。

血小板活性化因子受容体拮抗薬 Web2086 とキマーゼ阻害薬キモスタチンの潰瘍部への局所塗布により、潰瘍部 ET-1 量は有意に抑制されたが、ECE/ネプリライシン阻害薬のホスホラミドン塗布では変化しなかった (D)。口腔粘膜における 2 つの ECE サブタイプである ECE-1 と ECE-2 の mRNA 量は、潰瘍性口内炎ラットにおいて有意に減少したが、一方で ET-1 前駆体遺伝子 EDN1 に変化はなかった (E)。肥満細胞はキマーゼを小胞内に持っているため、肥満細胞の細胞内顆粒を識別するトルイジンブルー染色を行った。潰瘍部のほぼすべてのトルイジンブルー陽性細胞は小さくなっており、肥満細胞が脱顆粒したことが示唆された。一方、Naive ラットにおいては、脱顆粒像はほとんど見られなかった (F)。

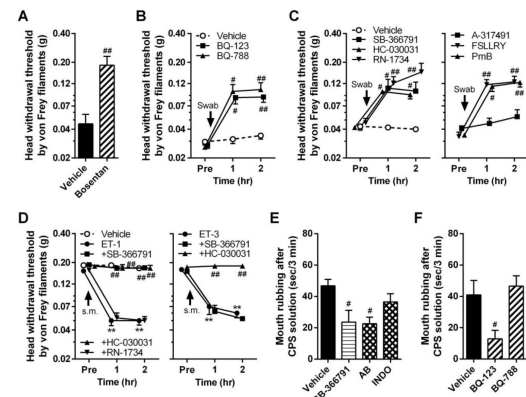
自発痛の発症メカニズム



潰瘍性口内炎ラットにおける自発ラビング時間の延長は、Web 2086 とキモスタチンの局所塗布によって有意に抑制されたが、ホスホラミドン塗布では変化しなかった (A)。ET-1 非選択的受容体拮抗薬であるボセンタンの尾静脈投与と ET_B 受容体拮抗薬 BQ-788 の局所塗布により、自発ラビング時間は有意に抑制したが (B) ET_A 受容体拮抗薬 BQ-123 の局所塗布では変化しなかった (C)。潰瘍性口内炎ラットにおける潰瘍部の PGE₂ と 15d-PGJ₂ 量は Naive ラットと比較して有意に増加していた (D, E) が PGE₂ は変化しなかった (F)。PGE₂ の増加は、BQ-788 の局所塗布によって Vehicle 群と比較して有意に減少した (D) が、15d-PGJ₂ と PGE₂ は変化しなかった (E, F)。PGE₂ 受容体 EP₁ 拮抗薬 ONO-8711 と TRPA1 拮抗薬 HC-030031 の局所塗布により、延長した自発ラビング時間が有意に抑制された (G, H)。しかし、TRPV1 拮

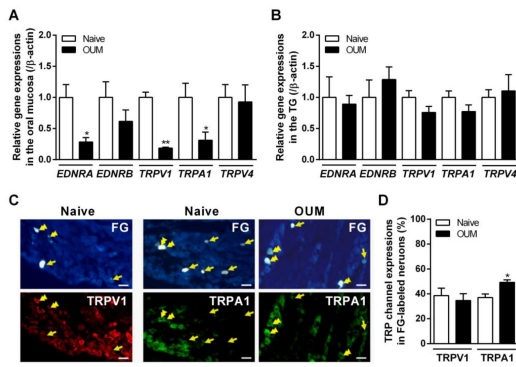
抗薬 SB-366791 と TRPV4 拮抗薬 RN-1734 の塗布では、変化しなかった。

機械的アロディニアの発症メカニズム



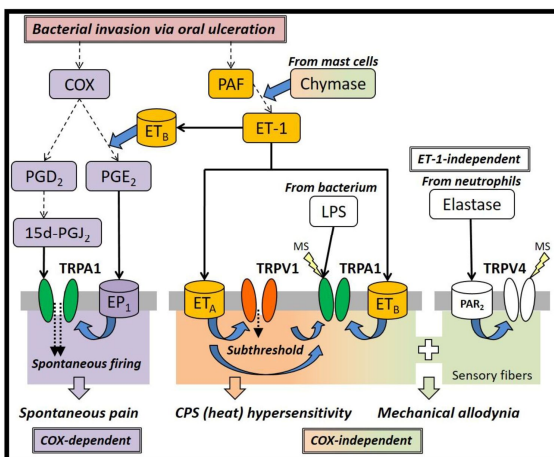
ボセンタンの尾静脈投与と BQ-123 および BQ-788 の局所塗布により、OUM ラットで機械逃避閾値の低下が抑制した (A, B)。HC030031、SB-366791 および RN-1734 の局所塗布もまた、機械逃避閾値の低下を抑制した。本研究において、P2X3 拮抗薬 A-317491 の局所塗布では、機械逃避閾値に変化は認められなかった。ポリミキシン B (リポ多糖拮抗薬) と FSLRY-NH₂ (PAR₂ 拮抗薬) の局所塗布は、潰瘍性口内炎ラットにおける機械逃避閾値の低下を有意に改善した (C)。ET-1 および ETB の特異的作動薬である ET-3 を Naive ラットの下顎口腔前庭に粘膜下投与した。その結果、ET-1 と ET-3 とともに機械逃避閾値を有意に低下させ (D)、口腔粘膜における ETA/ETB 活性化による機械的アロディニアの発生を示した。ET-1 誘発性機械的アロディニアは、RN-1734 では阻害されず (D)、SB-366791 と HC-030031 によって阻害されたことから、TRPV1/TRPA1 が関与することが示唆された。また、ET-3 誘発性機械的アロディニアは、HC030031 でのみ抑制されたことから (D)、TRPA1 が関与することが示唆された。CPS 溶液滴下後のラビング行動は、SB-366791 の局所塗布と抗菌薬による前処理で有意に抑制された。しかし、インドメタシン前処理 (E) では抑制されなかった。BQ123 は CPS 誘発ラビング行動を有意に抑制したが、BQ-788 では抑制しなかった (F)。

口腔粘膜と TG における ET 受容体および TRP チャンネルの発現レベル



ET_A 遺伝子 EDNRA および TRPV1 と TRPA1 は、健常口腔粘膜に比べて潰瘍部で有意に低かったが、ET_B 遺伝子 EDNRB および TRPV4 に差は認められなかった (A)。TG ニューロンの第 3 枝領域においては、これらの遺伝子の発現量に差は認められなかった (B)。口腔粘膜部を支配する FG 標識 TG ニューロンの約 40% が TRPV1 および TRPA1 陽性であった (C, D)。健常粘膜と潰瘍部をそれぞれ支配している FG 標識 TG ニューロンのうち TRPV1 発現細胞の数に差はなかったが、TRPA1 発現細胞数は、潰瘍性口内炎部支配 TG ニューロンにおいて有意に高く、TRPA1 発現細胞数の増加を示した (C, D)。

潰瘍性口内炎誘発性疼痛発症メカニズムの概略図



酢酸処理 2 日目の潰瘍部における細菌侵入後、血小板活性化因子 (PAF) やシクロオキシゲナーゼ (COX) を介したプロスタノイド産生により誘発される肥満細胞から放出されるキマーゼによって ET-1 が合成される。潰瘍部の ET_B 受容体は、PGE₂ 合成に関連し、その結果、EP1 受容体活性化を介して末梢感覚神経線維上の TRPA1 活性化が起こる。PGD₂ から変換された 15d-PGJ₂ は、末梢感覚神経線維上の TRPA1 を直接活性化する。これらの COX 依存性の経路は、TRPA1 活性化の自発痛誘発 (紫色) に寄与する。COX 非依存性経路として、ET-1 は末梢感覚神経線維上の ET_A および ET_B 受容体を直接刺激する。

TG 上のこれらの ET-1 受容体活性化は、CPS 誘発痛および TRPV1 または TRPA1 活性化機械的アロディニアに寄与する。機械的アロディニア誘発 (白) のための ET-1 非依存性経路として、LPS による直接的 TRPA1 活性化経路と好中球エラスターゼによる TRPV4 の間接的な活性化経路が考えられる。TRPA1 および TRPV4 は、機械的刺激 (MS) によって活性化される。

【結論】

- 潰瘍部を介した細菌侵入後の ET-1 産生増加は ET_B を介するプロスタノイド産生による TRPA1 活性化を介した自発痛と ET_A/ET_B を介した TRPA1 および TRPV1 活性化が関与する機械的アロディニアを誘発する一方、ET-1 非依存性経路を介した機械的アロディニアが生じる。
- 現在臨床で使用されているボセンタンがエンドセリンシグナル伝達遮断薬として潰瘍性口内炎患者に対する有効な鎮痛薬として使用されることが期待される。

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 3 件)

Yamaguchi K, Ono K, Hitomi S, Ito M, Nodai T, Goto T, Harano N, Watanabe S, Inoue H, Miyano K, Uezono Y, Matoba M, Inenaga K, Distinct TRPV1- and TRPA1-based mechanisms underlying enhancement of oral ulcerative mucositis-induced pain by 5-fluorouracil, Pain, 157, 5, 1004-1020, 2016

Misa Ito, Kentaro Ono, Suzuro Hitomi, Tomotaka Nodai, Teppei Sago, Kiichiro Yamaguchi, Nozomu Harano, Kaori Gunjigake, Ryuji Hosokawa, Tatsuo Kawamoto and Kiyotoshi Inenaga, Prostanoid-dependent spontaneous pain and PAR2-dependent mechanical allodynia following oral mucosal trauma: Involvement of TRPV1, TRPA1, and TRPV4, Mol Pain, 13, 1-17, 2017

Nodai T, Hitomi S, Ono K, Masaki C, Harano N, Morii A, Sago-Ito M, Ujihara I, Hibino T, Terawaki K, Omiya Y, Hosokawa R, Inenaga K: Endothelin-1 Elicits TRP-Mediated Pain in an Acid-Induced Oral Ulcer Model, J Dent Res. 2018

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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

原野 望 (HARANO NOZOMU)
九州歯科大学歯学部・講師
研究者番号：50423976

(2) 研究分担者

小野 堅太郎 (ONO KENTARO)
九州歯科大学歯学部・教授
研究者番号：40316154

人見 涼露 (HITOMI SUZURO)
九州歯科大学歯学部・講師
研究者番号：70548924

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()