

令和元年5月29日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2018

課題番号：15K15769

研究課題名(和文)唾液由来鎮痛物質による新たな慢性疼痛制御理論の確立

研究課題名(英文)New theory for chronic pain control by saliva-derived antinociceptive modulator.

研究代表者

庄司 憲明(Shoji, Noriaki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70250800

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文): 顎顔面領域慢性疼痛に対する唾液由来鎮痛物質(シアロルフィン)の鎮痛効果を明らかにするため、マウスにナワバリ意識を確立させた後、対面飼育を行った社会心理ストレスモデルを用い実験を行った。シアロルフィン投与により慢性疼痛に対する明らかな鎮痛作用は実証できなかったものの、シアロルフィンのレセプターであるNeprilysinの陽性細胞は形態学的にサテライト細胞またはシュワン細胞であることが示された。シアロルフィンがこれらの細胞のレセプター(Neprilysin)に結合することで生ずるケミカルメディエーターにより三叉神経節ニューロン興奮増強を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛患者は増加傾向にあり社会問題となっているが、治療法は確立されていない。本課題ではこれまで検討されていなかったモルヒネの約3～6倍の鎮痛効果があるとされる唾液由来鎮痛物質(シアロルフィン)の慢性疼痛に対する鎮痛効果を検証した。慢性疼痛モデルにおいてシアロルフィンの明らかな鎮痛効果を確認することができなかったが、シアロルフィンのレセプターであるNeprilysinの陽性細胞が形態学的にサテライト細胞またはシュワン細胞であることを発見した。この知見は三叉神経節ニューロンにおけるシアロルフィンによる鎮痛作用の存在を示唆するもので高い学術的意義を有している。

研究成果の概要(英文): Recently, patients with chronic pain have been increasing and recognized as social issues. This study was designed to determine the effect of sialorphin, which was saliva-derived antinociceptive modulator, on mechanical allodynia using the psychosocial stress mice model. Consequently, immunohistochemistry analysis could suggest the localization of sialorphin receptor in the schwann cells and/or satellite cells, although sialorphin had no obvious inhibitory effect on mechanical allodynia. These results suggested that signal induced by sialorphin could inhibit enhancement of trigeminal excitation.

研究分野：口腔内科学

キーワード：シアロルフィン 社会心理ストレスモデル 機械的アロデニア シアロルフィンレセプター Neprilysin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 最近、非定型歯痛、舌痛症および顎関節症などの慢性疼痛患者は増加傾向にあり社会問題となっている。しかしながら、慢性疼痛に対する治療法は確立されておらず、診断および治療法の開発は急務であり責務である。近年、ラット唾液からモルヒネの約3~6倍の鎮痛効果を持つシアロルフィンが発見された。さらに、2006年、ヒト唾液内からシアロルフィンと同様の鎮痛作用を持つオピオルフィンが発見された。しかしながら、これら唾液由来鎮痛物質が慢性疼痛にもたらす効果についていまだ検討がなされていない。シアロルフィンまたはオピオルフィンに対する慢性疼痛の鎮痛効果を評価するためには適した慢性疼痛モデルの作製が必要である。

(2) 哺乳動物ではストレスに対する内分泌系の防御機構として、視床下部 - 下垂体 - 副腎系 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis : HPA axis) が活性化し副腎皮質ホルモンが分泌される。一方で、生体がストレスに抗することができず恒常性が損なわれた場合、疾病に陥る危険性が生じる。うつ病、神経症、神経性食思不振症などでは、ストレスが疾病の成り立ちに直接関与していることはよく知られているが、高血圧、虚血性心疾患、糖尿病、消化性潰瘍、免疫疾患、さらには悪性腫瘍にいたるまで、ほとんどすべての疾患においてストレスが発症、増悪因子として関与していると考えられている。歯科においても非定型歯痛や舌痛症などの慢性疼痛にストレスが関与することが示され、ストレスと慢性疼痛との密接な関係が知られつつある。

2. 研究の目的

本研究では 幼少期のストレス負荷に起因して慢性疼痛を惹起するモデル(母子分離モデル)および 社会心理ストレスモデル(後述)を用い、機械刺激に対する逃避反射閾値の変化を指標として、シアロルフィンの慢性疼痛に対する鎮痛効果を検討する。

3. 研究の方法

(1)母子分離モデルの作製

慢性疼痛モデルとしてCCI や transection モデルのような末梢神経の損傷モデルが確立されているが、本研究ではストレスにより中枢神経系の可塑的变化を引き起こすと考えられる母子分離モデルを使用した。これは、生後2日から14日目まで毎日180分だけ母子分離することで作製した。このモデルを用い、顎顔面部(口ひげ部)の機械刺激に対する逃避反射閾値を計測した。また生後7、14と21日目に血中Corticosterone量を測定しストレス量を定量した。

(2)社会心理ストレスモデルの作製

2匹のマウスを、ステンレス製の仕切り板で2つに区切ったケージに1匹ずつ入れ単独飼育を行うことで、マウスにナワバリ意識を確立させた後、仕切り板を外して2匹の対面飼育を行った。マウスは互いを侵入者とみなすが、これらマウスは2匹とも居住者でもあるため、仕切り板を外した直後に2匹の間では互いのニオイを嗅ぐ、追いかける、一方が他方に乗りかかる、などの行動が観察され、2匹の間には優劣の関係が成立する。その後2匹のマウスはどちらも外傷を負うことなく普通に生活し、体重の減少なども認められない。このモデルについて、顎顔面部(口ひげ部)への機械刺激に対する逃避反射閾値を計測した。また血中Corticosterone量を測定し視床下部 - 下垂体 - 副腎(HPA)軸の活性化を確認した。

また、シアロルフィンのレセプターであるNepri lysinの局在について免疫組織化学的に検討した。すなわち、4%PFAにて灌流固定後に三叉神経節を取り出し20%スクロースに12時間浸漬し、ティッシュテックで包埋後、クライオスタットで15 μ mの凍結切片を作製した。Nepri lysin抗体(AF1126)は15 μ g/mLの濃度で、その他、Iba1抗体(ab178846)は1:1000の濃度で4%NDSを含んだ0.3%tritonX diluted in 0.01 M PBS にインキュベート(4で12時間)した。その後、Alexa Fluor 488 conjugated donkey anti rabbit IgG (1:100 diluted in 0.01 M PBS; Thermo Fisher Scientific) と Alexa Fluor 568 conjugated donkey anti goat IgG (1:100 diluted in 0.01 M PBS; Thermo Fisher Scientific) にインキュベート(室温で2時間)し、洗浄後に観察した。

4. 研究成果

(1)母子分離モデル

Fig.1のとおり、生後8週目に、顎顔面部(口ひげ部)の機械刺激に対する逃避反射閾値が低下し、mechanical allodyniaが発症した。

Fig.2Aのとおり、生後7、14および21日目に血中Corticosterone量を測定したところ、有意に母子分離(MS)群の方がコントロール(Naive)群より増加した。

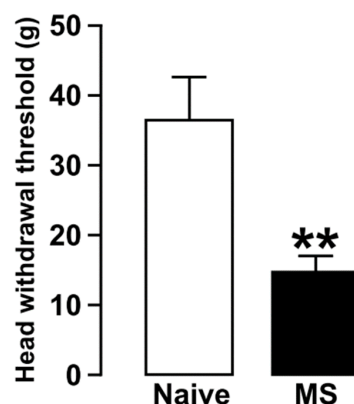


Fig. 1 逃避反射閾値の観察
Naive: 母子分離なし
MS: 母子分離あり
縦軸: 逃避反射閾値(g)

さらに Fig.2B のとおり、Corticosterone antagonist である (ミフェプリストン (mifepristone; RU-486) 投与により、母子分離 (MS) 群の mechanical allodynia が抑制された。

しかしながら、母子分離 (MS) 群にシアロルフィンを投与したが mechanical allodynia が抑制されずシアロルフィンの明らかな鎮痛効果は確認できなかった。

(2) 社会心理ストレスモデル

Fig.3 のとおり、顎顔面部 (口ひげ部) の機械刺激に対する逃避反射閾値を計測したところ、対面飼育後に閾値が有意に低下した。

Fig.4 のとおり、閾値が低下した Day 24 にシアロルフィンのレセプターである Neprilysin を免疫染色したところ三叉神経節ニューロンに発現はみられず、Iba 1 (macrophage のマーカー) との共存も見られなかった。一方で、Neprilysin 陽性細胞は形態学的にサテライト細胞またはシュワン細胞であることが想定された。よって、シアロルフィンはサテライト細胞またはシュワン細胞にあるレセプター (Neprilysin) に結合し、そのシグナルによってサテライト細胞またはシュワン細胞から放出され

るケミカルメディエーターにより

三叉神経節ニューロン興奮増強を抑制する結果、顎顔面領域の異常疼痛を抑制する可能性がある。

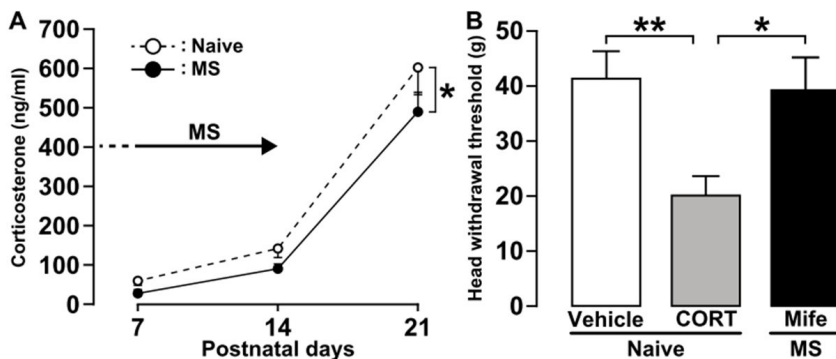


Fig. 2

A 母子分離とストレス量

Naive: 母子分離なし、MS: 母子分離あり、横軸: 出生後日数、縦軸: コルチコステロン量

B 逃避反射閾値の観察

Naive: 母子分離なし、MS: 母子分離あり、Vehicle: 溶媒 CORT: コルチコステロン、Mife: ミフェプリストン 縦軸: 逃避反射閾値 (g)

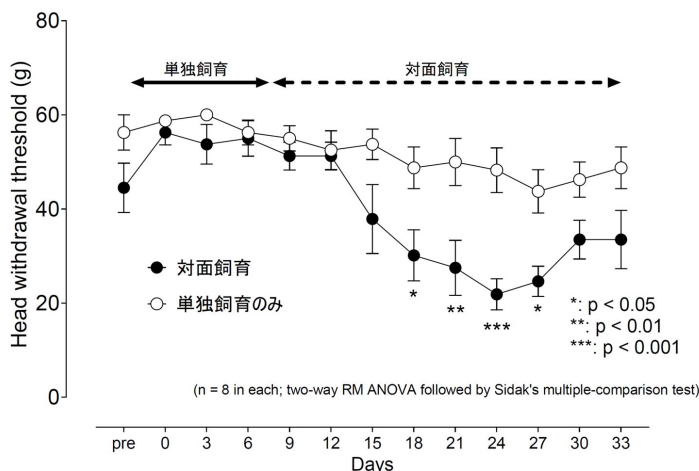
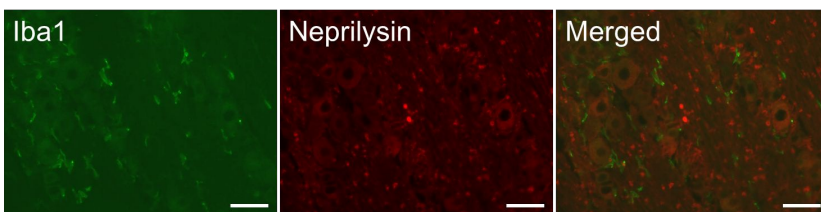


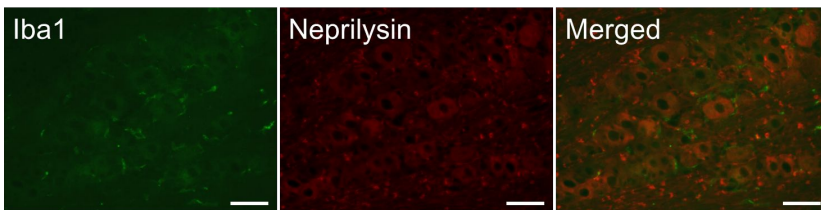
Fig. 3 逃避反射閾値の観察

横軸: 日数、縦軸: 逃避反射閾値 (g)

ストレス (+)



ストレス (-)



Scale bar: 50 μm

Fig. 4 三叉神経節の免疫組織化学的検討

Iba 1 (macrophage のマーカー)、Neprilysin (シアロルフィンのレセプター)

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yasuda M, Shinoda M, Honda K, Fujita M, Kawata A, Nagashima H, Watanabe M, Shoji N, Takahashi O, Kimoto S, Iwata K. Maternal Separation Induces Orofacial Mechanical Allodynia in Adulthood. J Dent Res. 2016 Sep;95(10):1191-7. doi: 10.1177/0022034516661159.

〔学会発表〕(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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：笹野 高嗣

ローマ字氏名：(SASANO, takashi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科(研究院)

職名：教授

研究者番号(8桁)：10125560

研究分担者氏名：西岡 貴志

ローマ字氏名：(NISHIOKA, takashi)

所属研究機関名：東北大学

部局名：歯学研究科(研究院)

職名：助教

研究者番号(8桁)：50641875

研究分担者氏名：篠田 雅路

ローマ字氏名：(SHINODA, masamichi)

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：20362238

(2)研究協力者

研究協力者氏名：土谷 昌広

ローマ字氏名：(TSUCHIYA, masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。