

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20378

研究課題名(和文)顎顔面部異常疼痛発症における早期分子シグナルとmicrogliaの関与

研究課題名(英文)The involvement of microglia and early molecular signaling in the jaw face of abnormal pain onset

研究代表者

韓 仁陽(清本聖文)(Han, In Yang)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00712556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床現場では顎顔面部異所性異常を訴える患者に遭遇することがある。原因として顎顔面部炎症や損傷が考えられる。異所性異常疼痛発症に伴う分子メカニズムを解明する為に炎症剤を投与し僧帽筋炎モデルラットを作成した。行動学的観察を15日間行い、4日目において僧帽筋炎モデル群では顎顔面部皮膚の異所性異常疼痛が確認された。また4日目以前より早期段階での疼痛反応の低下が観察された。免疫組織学的な検討において、顎顔面部皮膚の支配部位の脊髄にてマイクログリアの活性化を認めた。研究より疼痛の発現は神経グリア間での情報伝達の可能性が示唆された。残念ながら、早期分子シグナルの同定をすることができず、今後の研究に期待したい。

研究成果の概要(英文)：In clinical practice it may be encountered in patients complaining of maxillofacial part ectopic abnormal. Cervical inflammation and damage are considered as causes. In order to elucidate the molecular mechanism associated with the onset of allodynia, an inflammatory agent was administered to create model rat. Behavioral observation was carried out for 15 days, and on day 4, ectopic abnormal pain of the maxillofacial area skin was confirmed in the model group. The decrease in pain response at an earlier stage than before the 4th day was observed. In the immunohistological study, activation of microglia was recognized in the spinal cord of dominant region of maxillofacial region skin. From the study, it was suggested that there is a possibility of signal transmission between nerve and glia in the development of pain. Unfortunately, this study could not identify early molecular signals and would like to expect further research.

研究分野：口腔生理学

キーワード：microglia 異所性異常疼痛 炎症 口腔顔面痛 allodynia 脊髄 三叉神経

1. 研究開始当初の背景

顎部筋の慢性的な疲労や炎症、また支配神経の損傷等により、離れた顎顔面領域に異所性異常疼痛が生じることがある。こうした症状は、口腔内の疾患(う蝕等)による疼痛と誤診することがあり、しばしば臨床上問題となる。しかしながら、そのメカニズムに関しては完全に理解されていない。顎顔面部異所性異常疼痛のメカニズムを解明することは誤診の防止などに貢献するだけでなく、新規治療法の開発に寄与すると考えられる。また、早期発見につながると考えられる。

近年、炎症や神経損傷にともない、中枢神経におけるマイクログリアの活性化が認められ、その役割が重要であると報告されている(Gao et al., Pharmacol Ther. 2010)。局所の炎症や神経損傷により、ATP、ケモカインやサイトカインが一次神経より放出され、マイクログリアの活性化を導くとされている。

マイクログリアの膜状にはCX3CR1(フラクタルカインレセプター)が存在し、リガンドであるCX3CL1(フラクタルカイン)が作用することで、その結果として二次ニューロンの異常興奮を引き起こすと過去に報告がなされている(Clark et al., Exp Neurol. 2012)。

先行研究において、申請者は、ラットの僧帽筋に起炎物質 CFA(complete Freund's adjuvant)を投与し異所性異常疼痛のメカニズムを研究してきた(Kiyomoto et al., J Neurosci. 2013)。

しかしながら、異所性異常疼痛に発症に伴うCX3CL1(フラクタルカイン)/CX3CR1(フラクタルカインレセプター)のシグナル経路へと至る早期分子メカニズムについては明瞭でない。他の研究者における過去の報告から異所性異常疼痛の早期分子メカニズムにおいてもATP/P2X7 signaling pathway及びCatepsinS(CatS)(Clark et al., Exp Neurol. 2012)の関与が考えられる。

本研究においては、早期分子メカニズムの関連に関して焦点をあてる試みをした。

2. 研究の目的

歯科臨床現場において、しばしば顎顔面部異所性異常疼痛を訴える患者が来院することがある。そのメカニズムには、不明な点が多く、原因の特定に至らず、誤診がなされ、適切な治療がなされないこともある。

申請者は僧帽筋炎モデルラットを制作し、行動学的、免疫学的、検証を加え、僧帽筋炎に伴う顎顔面部異所性異常疼痛の早期発症メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

僧帽筋炎モデルラットを作成した。SD系雄性ラット(7w)の背部に皮膚切開を加え、僧帽筋内にCFA(complete Freund's adjuvant)を90 μ L投与したものをモデル群とした。

また生理食塩水(90 μ L)を投与したものを対照群とした。

研究方法において以下の点を考慮した。

1) 経日的行動学的研究

モデル群と対照群における顎顔面部皮膚における異所性異常疼痛の発現の経日的変化を観察した。発現における早期の変化を含め観察した。

2) 免疫組織化学的研究

顎顔面部皮膚の支配領域における三叉神経脊髄路核及び上部頸髄に対するマイクログリアの活性化を免疫組織学的に検討した。

3) 異所性異常疼痛の発症の早期分子メカニズムの検討

早期分子メカニズムの検討を行うためにATP、CathepsinSの測定を検討し、さらに、以前の研究結果にあるCX3CL1(フラクタルカイン)/CX3CR1(フラクタルカインレセプター)のシグナル経路に関連があるかを検討するためにWestern blotting法を用いたタンパク質の定量化を考慮した。

4. 研究成果

1) 僧帽筋への炎症剤投与における顎顔面部皮膚の疼痛行動の解析

CFA(complete Freund's adjuvant)を90 μ L投与したモデル群と生理食塩水90 μ Lを投与した対照群の機械的逃避閾値に対する経日的行動観察を行った。Von Frey filamentを用いて15日間観察を行った。

結果、4日目においてモデル群で逃避閾値の有意な低下を認めた。また、モデル群においては術後すぐに逃避閾値の低下が認められた(図1)。低下していた閾値は15日目において戻り、生理食塩水と比較してほとんど変化なかった。

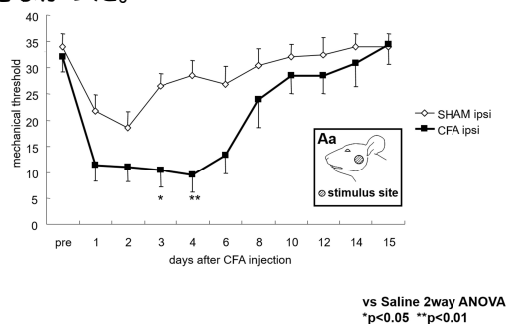


図1: 顎顔面部皮膚の疼痛行動の解析

2) 僧帽筋へのCFA投与後における顎顔面部支配領域に対する延髄および上部頸髄のマイクログリアの活性化における解析

顎顔面部支配領域である延髄(三叉神経尾側亜核)および上部頸髄におけるマイクログリアの活性化を検討した。

術後4日目に於いて、マイクログリアの有意な活性化が認められた。さらに術後15日目においては、CFAを投与しているモデル群と生理食塩水を投与している対照群におい

て、その活性化に差を認めなかった。

本結果より僧帽筋へCFAを投与することによって発症する機械的痛覚過敏は、活性型マイクログリアが関与する可能性が示唆された(図2)。

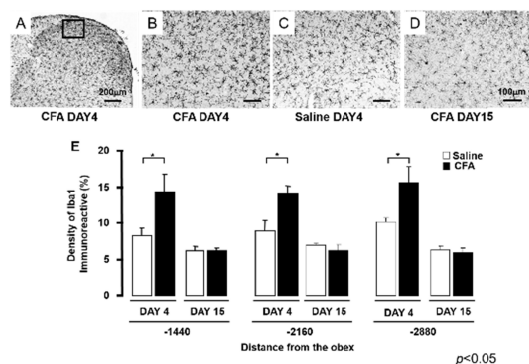


図2: 延髄および上部頸髄のマイクログリアの活性化における解析

3) 異所性異常疼痛の発症における早期分子メカニズムの検討

異所性異常疼痛の早期分子メカニズムに関連するATP/P2X7 signaling pathway及びCatepsinS (CatS) (Clark et al., Exp Neurol. 2012)に関してフォーカスを当てる試みをした。過去の研究報告よりATPとCatSの経路の関与が考えられ、顎顔面部の異所性異常疼痛の発症早期にも関連があると予想された。

Western blotting法に於いてATPやCathSのタンパク質の定量を行うことを考慮したが、Western blotting法における確認へと至らず、早期分子シグナルにおける同定を得ることができなかった。

尚、異所性異常疼痛発症後の中枢神経系マイクログリアにおけるサイトカイン分泌に伴うマイクログリアのp38MAPK合成経路に関係した研究結果に伴う論文の発表を行った(Kiyomoto M et al., Mol Pain. 2015)。

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 1件)

Kiyomoto M, Shinoda M, Honda K, Nakaya Y, Dezawa K, Katagiri A, Kamakura S, Inoue T, Iwata K.

p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats. Mol Pain. 2015 Aug 12; 11: 48. doi:10.1186/s12990-015-0053-y(査読有)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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
昭和大学歯学部口腔生理学講座
<http://www10.showa-u.ac.jp/~oralphys/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者
韓 仁陽(清本 聖文)(KIYOMOTO, Masaaki)
昭和大学歯学部口腔生理学講座・助教
研究者番号: 00712556

(2)研究分担者
()

研究者番号:

(3)連携研究者
()

研究者番号:

(4)研究協力者
井上 富雄(INOUE, Tomio)
昭和大学歯学部口腔生理学講座・教授
研究者番号: 70184760

岩田 幸一(IWATA, Kouichi)
日本大学歯学部口腔生理学講座・教授
研究者番号: 60160115

篠田 雅路(SHINODA, Masamichi)
日本大学歯学部口腔生理学講座・准教授
研究者番号: 20362238

中村 史郎(NAKAMURA, Shiro)
昭和大学歯学部口腔生理学講座・准教授

研究者番号：60384187

望月 文子 (MOCHIZUKI, Ayako)
昭和大学歯学部口腔生理学講座・助教
研究者番号：10453648

中山 希世美 (NAKAYAMA, Kiyomi)
昭和大学歯学部口腔生理学講座・講師
研究者番号：10453648