

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21410

研究課題名(和文)慢性ストレスに起因する神経障害性疼痛増悪のエピジェネティック制御と中枢感作機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation and central sensitization of neuropathic pain exacerbation under chronic stress condition

研究代表者

片桐 綾乃 (KATAGIRI, Ayano)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40731899

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： ストレス状態や神経障害性疼痛発症時の口腔顔面領域からの侵害情報入力における三叉神経節および三叉神経脊髄路核尾側亜核での分子動態変化の解明から疼痛に対する新規治療法確立を目指した。痛覚過敏発症時、三叉神経節ではエピジェネティック制御によりCGRP陽性神経細胞の分子動態が変化し、ERKのリン酸化を介してサテライトグリア細胞の活性化が生じた。そのサテライトグリア細胞活性化の制御にはP2Y受容体が大きく関与することが判明した。さらに、ストレスや神経障害性疼痛発症時には末梢でのTRPV1の発現が変化することにより、侵害情報の上位中枢への伝達が亢進し、神経障害性疼痛の増悪が惹起される可能性が示された。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to elucidate the peripheral and central nervous mechanisms underlying neuropathic tongue pain and chronic stress. The present findings suggest that calcitonin gene-related peptide (CGRP) released from trigeminal ganglion (TG) neurons activates satellite glial cells (SGCs) through extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, resulting in the enhancement of TG neuronal excitability under tongue neuropathic pain. The phenotypic switching of large TG neurons expressing CGRP may account for persistent tongue pain. The functional interaction between SGCs activation via P2Y12R and TG neurons expressing CGRP is a significant contributor to cause neuropathic tongue pain. Our data also suggest that the change in TRPV1 expression via an alteration of epigenetic regulation under the chronic stress or neuropathic pain may cause central sensitization of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons resulting in the exacerbation of tongue neuropathic pain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 神経 グリア機能関連 慢性ストレス カルシトニン遺伝子関連ペプチド リン酸化 細胞外シグナル調節キナーゼ ATP受容体 プロジェクションニューロン

1. 研究開始当初の背景

多くの外科処置を含む歯科臨床では、治療過程で三叉神経損傷を生じ、ときに口腔顔面領域に異常疼痛を発症させる。舌の感覚を支配する舌神経は、その解剖学的な特徴により、下顎智歯の抜歯や下顎骨へのインプラント埋入時に損傷を受けることがあり、その結果、舌に痛覚過敏が発症する。舌は感覚だけでなく、味覚、咀嚼、発音にも関与するため、難治化した舌の持続的な痛みは QOL を大きく低下させる要因となる。また、痛みという感覚は患者の心理状態に大きく左右されることはしばしば経験することであり、ストレスは疼痛の増悪因子となりうる。しかし、神経障害性疼痛とストレスの相互作用がどのように末梢神経系での表現型の変化(エピジェネティック制御)やニューロン グリア機能連関に影響を与えるのか、さらに、中枢神経系の伝達機構メカニズムの関与は不明であり、解明が待たれている。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛モデルラット、慢性ストレスラットを用い、三叉神経支配領域の一次ニューロンが存在する三叉神経節における各種分子の動態変化、表現型の変化(エピジェネティック制御)を解明する。さらに、二次ニューロンの細胞体が存在する三叉神経脊髄路核尾側亜核～上部頸髄の神経細胞に対する DNA メチル化転移酵素阻害の作用、および視床または橋への投射ニューロンにおける疼痛伝達機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) 舌神経圧迫モデル
全身麻酔下にて左側口腔底を約 2 ミリ切開、舌神経を明示後、舌神経を動脈クランプにて 30 g・30 秒圧迫し、縫合した (Katagiri et al. 2012 Mol Pain)
- (2) 強制水泳
直径 30 cm、深さ 20 cm、温度 24 - 26°C の水を張り、10 分間の強制水泳を 3 日続けることで、身体的・心理的なストレスを負荷した。
- (3) 逃避閾値測定
イソフルラン浅麻酔下で舌に機械または熱刺激を加えて、逃避反射閾値を測定した。
- (4) 三叉神経節薬剤投与
全身麻酔下にて頭部をステレオタキシックに固定。頭頂骨の一部(三叉神経節分岐部直上)を切削し、薬剤投与用カニューレを埋入、固定する。31G 注射針を用い、カニューレを通して薬剤を投与した。
- (5) 大槽内薬剤投与
全身麻酔下にて頭部をステレオタキシ

ックに固定。後頭骨上縁の一部を切削し、薬剤投与用チューブを硬膜下に埋入する。チューブの先端を大槽内に留置した位置で固定した。

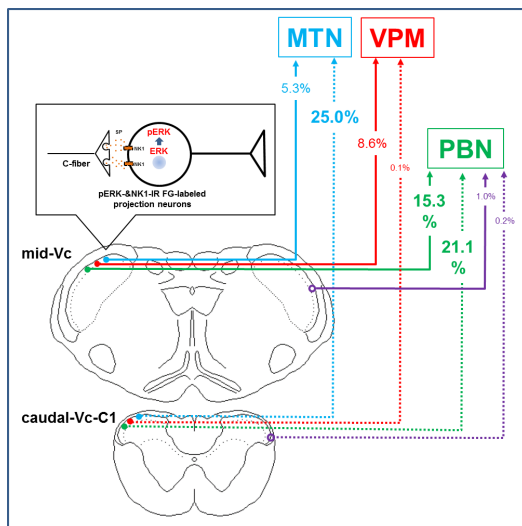
- (6) 逆行性トレーサー注入
全身麻酔下にて頭部をステレオタキシックに固定。視床後内腹側核、視床内側核群、または橋結合腕傍核に逆行性神経トレーサーを注入した。
- (7) 免疫組織学的染色および解析法
各実験のタイムコースに従い、ラットを灌流固定し、三叉神経節または三叉神経脊髄路核～上部頸髄を摘出した。切片を作製の後、蛍光免疫染色を行い、各一次抗体に反応する陽性細胞数を解析した。

4. 研究成果

- (1) 舌神経損傷モデルラットの舌への熱・機械刺激に対する逃避閾値低下が確認された。口腔顔面領域を支配する末梢神経の神経細胞体が存在する三叉神経節での、神経細胞体およびサテライトグリア細胞における各種分子動態の変化を免疫組織学的に解析した。舌神経損傷により、三叉神経節細胞にてカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の発現が増加しただけでなく、CGRP 陽性の大型神経細胞体の割合の増加、即ち表現型の変化(エピジェネティック制御)が生じていることが認められた。また、その変化に対して、サテライトグリア細胞における細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)のリン酸化が寄与することを証明した。続いて、三叉神経節に CGRP 受容体のアンタゴニスト(CGRP8-37)または ERK のリン酸化阻害薬(PD98059)を投与した。その結果、舌への熱・機械刺激に対する逃避閾値の低下が抑制され、三叉神経節における CGRP 陽性細胞の減少、サテライトグリア細胞における ERK のリン酸化抑制、サテライトグリア細胞の活性化の抑制が確認された。さらに、CGRP8-37 の全身投与によっても舌の痛覚過敏抑制が確認された (Katagiri et al. 2017 under revision)。
- (2) 続いて同モデルを用いて、三叉神経節における神経 サテライトグリア細胞機能連関への影響因子を解析した。疼痛を誘発する細胞外プリンヌクレオチド、とくに ADP をリガンドとする G タンパク質共役型受容体(P2YR)のサブタイプは、三叉神経節に存在する。Naive ラットの三叉神経節に ADP を直接投与すると舌への機械及び熱刺激に対する逃避閾値が低下し、三叉神経節での CGRP 産生細胞数増加とサテライトグリア細胞での ERK のリン酸化が確認された。一方、舌神経圧迫モデルラットの三叉神経節に P2YR の1つである P2Y₁₂R の選択的アンタゴニスト(MRS2395)を投与、または naive

ラットの三叉神経節に ADP と MRS2395 を同時投与すると、舌への刺激に対する逃避閾値の低下が抑制され、CGRP 産生細胞数増加と ERK のリン酸化も抑制された。(1)の結果と合わせると、神経障害性疼痛発症時の一次ニューロンにおける CGRP 産生細胞数増加やエピジェネティック変化は SGC での ERK リン酸化と相互作用があり、そのサテライトグリア細胞の活性化には P2Y₁₂R の関与が重要であることが示唆された。

- (3) 二次ニューロン（三叉神経脊髄路核尾側亜核）でのエピジェネティック制御について行動薬理的に検討した。神経損傷モデルラットの大槽内に DNA メチル化転移酵素阻害剤を投与すると逃避閾値低下が有意に抑制された。従って、神経障害性疼痛には末梢神経系の三叉神経節、中枢神経系の三叉神経脊髄路核尾側亜核の両者でのエピジェネティック制御が機能していることが推察された。
- (4) カプサイシン刺激によって興奮する C 線維を介する、三叉神経脊髄路核尾側亜核から視床後腹側内側核または橋結合腕傍核へ至る投射ニューロン上での ERK のリン酸化の割合を解析した。結果を下図に示す (Saito, Katagiri et al. 2017 Exp Neurol)



- (5) さらに、神経障害性疼痛の増悪に関わる重要な因子の 1 つと考えられる身体的・心理的ストレス（強制水泳）を負荷すると、口腔内へのカプサイシン刺激（C 線維刺激）に対する嫌悪反応が生じることが分かった。

(1)-(5)の結果より、身体的・心理的ストレス状態や神経障害性疼痛発症時の三叉神経節では神経細胞体のエピジェネティック制御により CGRP 陽性細胞の分子動態が変化し、ERK のリン酸化を介してサテライトグリア細胞の活性化が生じた。そのサテライトグリア細胞活性化の制御には P2Y 受容体が大き

く関与することが分かった。さらに、慢性ストレスや神経障害性疼痛発症時には口腔内の TRPV1 の発現が変化することにより、侵害刺激の中枢への情報伝達機構が増強され、神経障害性疼痛の増悪が惹起される可能性が示された。

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 9 件)

1. Saito H, Katagiri A, Okada S, Mikuzuki L, Kubo A, Suzuki T, Ohara K, Lee J, Gionhaku N, Inuma T, Bereiter DA, Iwata K. Ascending projections of nociceptive neurons from trigeminal subnucleus caudalis: A population approach. *Exp Neurol*. 2017;293:124-136. doi: 10.1016/j.expneurol.2017.03.024. 査読有
2. 片桐 綾乃, 岡田 真治, 美久月 瑠宇, 岩田 幸一. 特集『世界のトップを走る日本のドライアイ最前線』 感覚異常の動物モデルと行動学的評価法 あたらしい眼科 *Atarashii Ganka (J. Eye)* Vol. 34 No. 3 page 335-339 2017 査読なし
3. Kubo A, Shinoda M, Katagiri A, Takeda M, Suzuki T, Asaka J, Yeomans D, Iwata K. Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury via vasopressin 1A receptors of the rat trigeminal ganglia. *Pain*. 2017;158(4):649-659. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000808. 査読有
4. Tsuboi Y, Honda K, Bae YC, Shinoda M, Kondo M, Katagiri A, Echizenya S, Kamakura S, Lee J, Iwata K. Morphological and functional changes in regenerated primary afferent fibres following mental and inferior alveolar nerve transection. *Eur J Pain*. 2015;19(9):1258-1266. doi: 10.1002/ejp.650. 査読有
5. Okamoto K, Katagiri A, Rahman M, Thompson R, Bereiter DA. Inhibition of temporomandibular joint input to medullary dorsal horn neurons by 5HT₃ receptor antagonist in female rats. *Neuroscience*. 2015;299:35-44. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.037. 査読有
6. Rahman M, Okamoto K, Thompson R, Katagiri A, Bereiter DA. Sensitization of trigeminal brainstem pathways in a model for tear deficient dry eye. *Pain*. 2015;156(5):942-950. doi: 10.1097/j.pain.000000000000135. 査読有

7. Katagiri A, Thompson R, Rahman M, Okamoto M, Bereiter DA. Evidence for TRPA1 involvement in central neural mechanisms in a rat model of dry eye. *Neuroscience*. 2015;290:204-213. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.01.046. 査読有
8. Watanabe M, Umezaki Y, Miura A, Shinohara Y, Yoshikawa T, Sakuma T, Shitano C, Katagiri A, Takenoshita M, Toriihara A, Uezato A, Nishikawa T, Motomura H, Toyofuku A. Comparison of cerebral blood flow in oral somatic delusion in patients with and without a history of depression: a comparative case series. *BMC Psychiatry*. 2015;15:42. doi: 10.1186/s12888-015-0422-0. 査読有
9. Watanabe M, Umezaki Y, Suzuki S, Miura A, Shinohara Y, Yoshikawa T, Sakuma T, Shitano C, Katagiri A, Sato Y, Takenoshita M, Toyofuku A. Psychiatric comorbidities and psychopharmacological outcomes of phantom bite syndrome. *Journal of Psychosomatic Research*, 2015;78(3):255-259. doi: 10.1016/j.jpsychores.2014.11.010. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

1. Saito H, Katagiri A, Gionhaku N, Iwata K. ERK phosphorylation in medulla and upper cervical cord neurons projecting to thalamus and parabrachial nucleus in rats. The 16th International Association for the Study of Pain 平成 28 年 9 月 26 日～30 日 パシフィック横浜 (神奈川県横浜市)
2. Katagiri A, Okada S, Saito H, Mikuzuki L, Toyofuku A, Iwata K. Satellite glial cell activation in lingual neuropathic pain via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation is associated with phenotypic change in trigeminal ganglion neurons. The 16th International Association for the Study of Pain 平成 28 年 9 月 26 日～30 日 パシフィック横浜 (神奈川県横浜市)
3. 片桐 綾乃, 岩田 幸一. 舌痛発症の末梢神経機構 Neuron-glia interaction in trigeminal ganglion for tongue pain. 第 21 回 口腔顔面痛学会 平成 28 年 9 月 24 日～25 日 神奈川県歯科医師会 (神奈川県横浜市)
4. 美久月 瑠宇, 片桐 綾乃, 豊福 明, 岩田 幸一. 舌神経損傷後痛に対する三叉神経節 CGRP 陽性細胞の表現型変化と神経 グリア機能連関の関与 第 21 回 口腔顔面痛学会 平成 28 年 9 月 24 日～25 日 神奈川県歯科医師会 (神奈川県横浜市)
5. 岡田 真治, 斎藤 弘人, 片桐 綾乃,

岩田 幸一. 三叉神経脊髄路核および上部頸髄投射ニューロンにおける Extracellular Signal-regulated Kinase のリン酸化および Neurokinin 1 発現 第 21 回 口腔顔面痛学会 平成 28 年 9 月 24 日～25 日 神奈川県歯科医師会 (神奈川県横浜市)

6. Katagiri A, Saito H, Iwata K. ERK phosphorylation of thalamic and parabrachial projection neurons in medulla and upper cervical cord is involved in orofacial nociception in rats. The 39th The Japan Neuroscience Society 平成 28 年 7 月 20 日～22 日 パシフィック横浜 (神奈川県横浜市)
7. 斎藤 弘人, 片桐 綾乃, 岩田 幸一. 三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄で検出された投射ニューロンにおける Extracellular Signal-regulated Kinase のリン酸化 痛みの病態生理と神経・分子機構研究会 平成 28 年 12 月 17 日 生理学研究所 (愛知県岡崎市)
8. Katagiri A, Saito H, Ohara K, Toyofuku A, Iwata K. Satellite glial cell activation via extracellular signal-regulated kinase phosphorylation, associated with phenotypic change in trigeminal ganglion neurons, is involved in lingual neuropathic pain. Society for Neuroscience 平成 27 年 10 月 17 日～21 日 Chicago (USA)
9. 斎藤 弘人, 片桐 綾乃, 岩田 幸一. Phosphorylation of Extracellular Signal-regulated Kinase in Vc-C1 neurons projecting lateral and medial thalamic nuclei 第 57 回 歯科基礎医学会 平成 27 年 9 月 12 日～13 日 朱鷺メッセ (新潟県新潟市)
10. Katagiri A, Iwata K. Posterior hypothalamic modulation of ocular-responsive trigeminal subnucleus caudalis neurons is mediated by Orexin-A and Orexin1 receptors in rat. The 38th The Japan Neuroscience Society 平成 27 年 7 月 28 日～31 日 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)
11. 片桐 綾乃, 豊福 明. 三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄に分布する視床投射ニューロンにおける Extracellular Signal-regulated Kinase のリン酸化 第 30 回 日本歯科心身医学会総会・学術大会 平成 27 年 7 月 18 日～19 日 東京医科歯科大学 M&D タワー (東京都文京区)

〔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

片桐 綾乃 (KATAGIRI, Ayano)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：40731899

(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

()