

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20598

研究課題名(和文) 痛みの神経回路 伝達系と抑制系の相互媒介を単一ニューロンレベルで解析する

研究課題名(英文) Analyzing the interaction between transmission and inhibition systems of pain at the single neuron level

研究代表者

大野 幸 (Ohno, Sachi)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教

研究者番号：00535693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：「痛み」は生体内外からの警告のサインであり必要な感覚であると同時に、生存にとって不利にも働く諸刃の剣である。そのため、生体には痛みの伝達だけではなく、抑制する機能も備わっている。また痛みの感じ方には日内変動があるとする先行研究が発表されたことから、今回の研究で対象とする三叉神経系においても痛みの伝達と抑制に関して日内変動があるのではないかと考えた。マウスの上口唇にホルマリンを皮下注射して急性持続性疼痛モデルを作成し、疼痛の日内変動を検討した。その結果、マウスでは活動期の夜間で痛みが亢進していること、またその原因として痛みの伝達に関わるトランスデューサーの発現量に昼夜差があることが考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、口腔・顔面領域の痛みの感じ方には日内変動があること、日内変動を生み出す原因物質の存在が解明されつつある。今回の結果は、痛みの研究全般における最もベーシックな知見の1つであるとともに、今後の痛みの基礎研究にも影響を与え得るものでもあり、その学術的意義はとても大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)："pain" is a warning sign that informs the damage of the living body, and it is a necessary sensation for us. However, the "pain" that remains after playing a role limits normal activities and is detrimental to survival. In addition, previous studies have reported diurnal variations in pain, suggesting that the trigeminal system targeted in this study may also have diurnal variations in pain transmission and inhibition. We made a model of acute persistent pain by subcutaneously injecting formalin into the upper lip of mice and examined diurnal variation of pain. As a result, it was revealed that the pain was increased in the dark period in the mouse. Furthermore, it is considered that the cause is that there is a diurnal variation in the expression level of transducers involved in pain transmission.

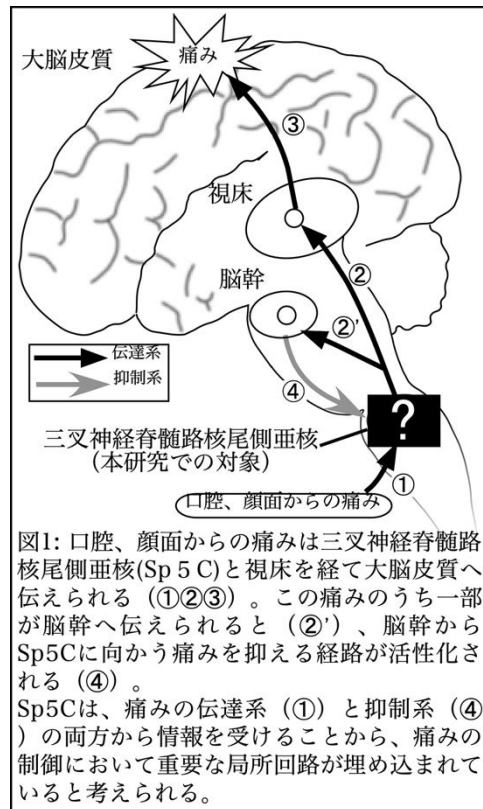
研究分野：歯科麻酔学

キーワード：三叉神経脊髄路核 疼痛 疼痛抑制 日内変動

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「痛み」は生体内外からの警告のサインであり、傷害を受けた生体に安静を促し創傷治癒を早めるためにも必要な感覚である。しかし、目的を達した後も残存する「痛み」は、正常な活動を制限し生存にとって不利にも働く諸刃の剣であるため、生体には痛みを伝える機能だけではなく、抑える機能も備わっている。痛みの神経回路が他の感覚回路と比べてユニークな点は、痛みの伝達と抑制という真逆の機能が1つの感覚を生み出す回路に含まれているところにある。さらに、痛みの感じ方には日内変動があるとする先行研究が発表されたことから、痛みの伝達系と抑制系それぞれにも、1日の中でリズムがあるのではないかと考えた。本研究では時間生物学的手法を取り入れた上で、伝達系と抑制系の相互媒介の要となる回路に的を絞り、ボトムアップ的に痛みのメカニズムを解明することを目的としている(図1)。



2. 研究の目的

本研究では、口腔・顔面領域の痛みが中枢神経へ伝えられる入り口にあたる三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)に着目した。その理由として、Sp5Cのニューロンは1次ニューロンから痛み伝達のシグナルだけではなく、脳幹大縫線核のセロトニン作動性ニューロンや青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンなどから痛み抑制のシグナルも受けとっていることが挙げられる。また、痛みが日内変動があるとすると、伝達系と抑制系のそれぞれの日内変動の相互作用の結果が痛みの日内変動として表出したと考えられるため、まずはそれぞれの日内変動について検討する必要がある。

そこで本研究では

- (1) 三叉神経領域の痛みが日内変動があるかを検討
- (2) 要となるSp5Cに着目し、痛みの伝達と抑制に関与すると考えられる物質を検索し、それぞれの日内変動を検討
- (3) 痛みに関わる局所回路の解明を目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 三叉神経支配領域の痛覚日内変動の解析

10週齢の雄性マウス(C57BL/6J Jms Slc、日本SLC)を、室温 23 ± 1 の静穏な施設で自由摂食・自由給水とし、12時間ごとの明・暗期サイクル(明期;6-18時、暗期;18-6時)で少なくとも10日間飼育する。

実験用マウスを実験ケージに1匹ずつ入れて30分の馴化後、用手的に左側上口唇(三叉神経第二枝領域)にホルマリン(5%、 $10 \mu\text{l}$)を皮下注射する。

ホルマリン投与後、速やかに実験ケージに戻し、45分間ビデオによる録画を行う。疼痛関連行動の回数や持続時間を、急性期と持続期の2相(phase I;0-9分、phase II;10-45分)に

分けて評価する。

当該マウスを灌流固定し、脳を取り出した後、凍結スライス切片を作成し、免疫組織化学染色により c-Fos 陽性細胞数をカウントする。

この行程を、明期-生食群、明期-ホルマリン群、暗期-生食群、暗期-ホルマリン群の4群に分けて解析を行う。

(2) 痛みの伝達に関する transducer および transmitter の検索

10 週齢の雄性マウス (C57BL/6J Jms Slc、日本 SLC) を、室温 23 ± 1 の静穏な施設で自由摂食・自由給水とし、12 時間ごとの明・暗期サイクル (明期; 6-18 時、暗期; 18-6 時) で少なくとも 10 日間飼育する。

マウスより三叉神経節を摘出し、transducer (TRPV1・P2X3・TRPA1・Piezo2) および transmitter (グルタミン酸・サブスタンス P・カルシウム関連ペプチド) mRNA の経時変化を網羅的にリアルタイム PCR で定量解析し、日内変動を認めるものを検索する。

(3) 疼痛抑制に関する物質の検索

10 週齢の雄性マウス (C57BL/6J Jms Slc、日本 SLC) を、室温 23 ± 1 の静穏な施設で自由摂食・自由給水とし、12 時間ごとの明・暗期サイクル (明期; 6-18 時、暗期; 18-6 時) で少なくとも 10 日間飼育する。

Sp5C を摘出し、セロトニンやノルアドレナリンなど疼痛抑制に関与する物質量をウェスタンブロットングにより定量解析を行う。

(4) Sp5C を構成するニューロンの化学的マーカーを用いた分類

当研究で得られた形態学的所見を、これまでの薬理学的、生理学的あるいは分子生物学的研究などで得られた所見と照らし合わせ、Sp5C の痛みの神経回路における機能を検討する。

4. 研究成果

本研究は、一部においてまだ遂行中であり、未発表データを多く含むため、公表できる部分についてのみ記載を行った。

(0) 時間生物学的実験を遂行するための環境整備

研究施設の整備

マウスが活動期の暗期に光暴露されると、それだけで体内時計は狂い、いわゆる時差ボケの状態となる。この時差ボケマウスを用いて本研究を遂行しても全く意味をなさない。このような状況を回避するため、当研究室が単独で使用できる動物飼育・実験室を確保し、明期と暗期を 12 時間周期で自動的に切り替え厳密に管理を行なえるよう環境を整えた。

研究設備

さらに、コフィンと呼ばれるマウスのケージを収納する大型の暗箱を自作して設置した。これにより、この箱に付属するライトのオンオフ時間を調整することで、中で飼育されているマウスは、外界の時間に関係なく体内時間を調整することが可能となった。つまり、この箱がない場合、夜間の実験は夜間に行わなければならないが、実験者にとって大変な負担となっていたが、マウスの昼夜を実際の外環境と逆転させて維持させておくことで、実験者は昼間に実験が遂行できるようになった。

(1) 三叉神経支配領域の痛覚日内変動の解析

三叉神経第2枝領域にホルマリン注射し痛みの昼夜差を検討した結果、夜間での痛み関連行動の亢進（図2A）や、三叉神経脊髄路核尾側亜核における c-fos 発現の夜間での亢進（図2B,C）を認めた。

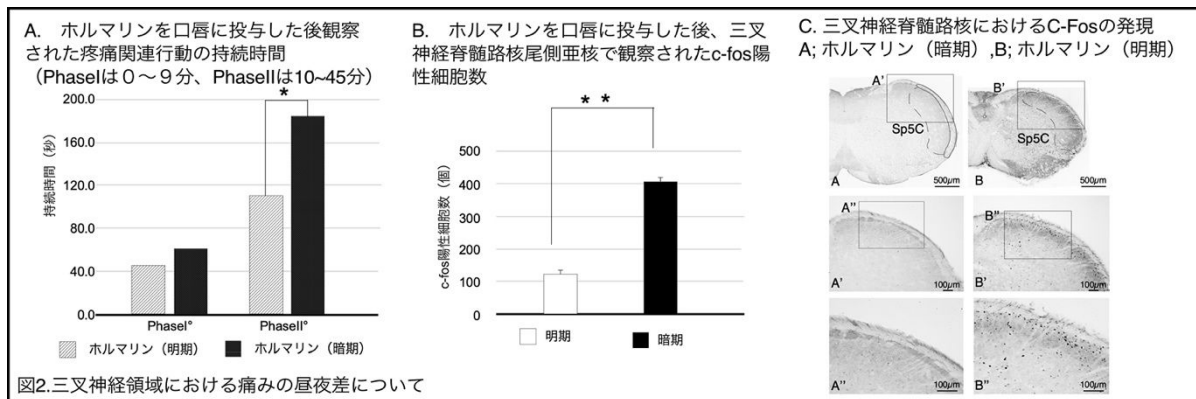


図2.三叉神経領域における痛みの昼夜差について

これらの結果より、三叉神経領域の疼痛に関しては、活動期である暗期により亢進している、ということがわかった (unpublished data)。

(2) 痛みの伝達に関係する transducer および transmitter の検索

痛みの伝達に関する transducer として先行研究より CGRP, TRPA1, TRPV, Piezo, P2RX3 をピックアップし、それぞれの遺伝子発現を定量 PCR で調べたところ、TRPA1 と Piezo に関しては、明期に比べて暗期で有意に高いことがわかった (unpublished data)。

(3) (4) に関しては、現在遂行中である。

抑制系に関与すると考えられる物質についても同様に検索を行っているところであり、今後はこれまでの結果を踏まえて Sp5C 内の局所回路とともに解明していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Seki H, Tanaka YR, Furuta T, Hioki H,	4. 巻 525(18)
2. 論文標題 Dorsal and ventral parts of thalamic nucleus submedialis project to different areas of rat orbitofrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 3821-3839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/cne.24306. Epub 2017 Sep 12.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Goto T, Hioki H.	4. 巻 525(1)
2. 論文標題 Individual mediodorsal thalamic neurons project to multiple areas of the rat prefrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 166-185
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/cne.24054. Epub 2016 Jul 14.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 新納彩子, 大野 幸, 青山歌奈絵, 山形和彰, 杉村光隆.
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第15回環境生理プレコングレス
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新納彩子, 大野 幸, 青山歌奈絵, 山形和彰, 杉村光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第47回日本歯科麻酔学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako Niiro, Sachi Ohno, Saori sako, kazuaki Yamagata, Ryogo Sendo, Kanae Aoyama, Mitsutaka Sugimura
2. 発表標題 An analysis of diurnal variation in pain sensitivity in trigeminal areas using an animal model of acute and persistent pain.
3. 学会等名 IFDAS 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大野 幸、新納彩子、千堂良造、杉村光隆
2. 発表標題 三叉神経節における時計遺伝子の発現について
3. 学会等名 日本歯科麻酔学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大野 幸、高須奈々、杉村光隆、中村 涉
2. 発表標題 摂食タイミングを制御するサーカディアンリズム
3. 学会等名 第12回環境生理学プレコンgres
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----