

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11654

研究課題名（和文）口腔乾燥に起因した病的口腔痛発症機構の総合的理解

研究課題名（英文）Comprehensive understanding of orofacial pain induced by dry mouth

研究代表者

岩田 幸一（IWATA, Koichi）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60160115

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000 円

研究成果の概要（和文）：口腔乾燥症においては口腔内の強い疼痛を引き起こすことが知られている。本プロジェクトでは、舌乾燥モデルラットを用いて、舌痛覚過敏の発症機構の一端を解明することを目的とした。舌乾燥後の、舌痛覚異常発症の有無、三叉神経節における様々な分子動態の検索を図った。舌乾燥後、舌の熱刺激に対しては痛覚過敏を発症せず、機械アロディニアが発症し、この痛覚異常には三叉神経節細胞におけるp38のリン酸化および三叉神経節内に存在する衛星細胞が重要な働きを有することが明らかになった。さらに、このリン酸化p38はTRPチャンネルの一つであるTRPV4発現増加を促進させ、機械痛覚異常を引き起こす可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔乾燥によって引き起こされる口腔痛は、様々な口腔機能に対して障害を引き起こし、QOLの著しい低下を引き起こす可能性がある。本研究はこのような口腔乾燥に起因する舌痛の発症機構の解明を目指すもので、学術的な意義だけでなく、歯科臨床に対しても非常に重要である。本研究プロジェクトでは、舌乾燥によって引き起こされる、舌の異常疼痛の発症に対して、p38のリン酸化を介するTRPV4チャンネルの活性化が関与することを突き止めた。臨床的にはこのpp38-TRPV4の細胞内伝達系を制御することができれば口腔乾燥に起因する口腔痛を治療することが可能であることを示唆しており、学術的にも社会的にも意義がある。

研究成果の概要（英文）：Although xerostomia can cause persistent oral pain, the mechanisms underlying such pain are not well understood. A rat model of dry tongue was used to study the nociceptive reflex and pp38 and TRPV4 expression in trigeminal ganglion (TG) neurons. The head-withdrawal reflex threshold for mechanical stimulation of the tongue was significantly lower in dry-tongue rats. The numbers of TRPV4- and pp38-immunoreactive cells in the TG were significantly higher in dry-tongue rats. Many TRPV4-IR cells were also pp38-immunoreactive. TRPV4 blocker attenuated tongue mechanical hypersensitivity in dry-tongue rats. Intraganglionic injection of a selective p38 MAP kinase inhibitor eliminated tongue hypersensitivity in dry-tongue rats and suppressed TRPV4 expression in TG neurons. The present findings suggest that TRPV4 activation via p38 phosphorylation in TG neurons is involved in mechanical hypersensitivity associated with dry tongue.

研究分野：口腔生理学

キーワード：口腔乾燥 舌痛



様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 1．研究開始当初の背景

日本には約 800 万人のドライアイ患者がいるといわれており、その多くが口腔乾燥の症状を有することが知られている。これらの多くは摂食障害、義歯不適、口臭あるいは口腔粘膜の痛覚過敏など、様々な症状を訴える。このような口腔乾燥症患者に対する治療として、人口唾液を用いた治療や口腔粘膜に対するジェルの塗布などが行われているが、これらはあくまでも対症療法であり根本的な治療法ではないことから、症状を完全に取り除くことは困難である。特に、舌痛を訴える患者の約 24%は口腔乾燥症を発症すると報告されており、これらの患者は舌に痛みがあることから咀嚼機能が障害され、QOL が著しく低下する（日本口腔顔面痛学会誌 2012）。しかしながら、その発症機構が全く明らかにされていないため、治療が非常に困難で臨床の場で大きな問題となっている。そこで、本プロジェクトでは口腔粘膜の乾燥によって引き起こされる異常疼痛の発症機構を明らかにし、口腔乾燥に伴う口腔粘膜の痛覚過敏に対する新たな治療法開発を支援する基礎データを集積することとした。

まず、口腔粘膜が乾燥状態に陥った場合、乾燥粘膜を支配する末梢神経に対してどのような影響を与えるかを明らかにした。最近の研究で、我々は末梢組織が損傷を受けると損傷組織から NGF が放出され、放出された NGF は神経終末部に存在する NGF の受容体である trophic tyrosine kinase receptor TrkA に結合し神経線維内を中枢へと運ばれ、神経活動に変調を及ぼすことを報告した（Shinoda et al., J Neurosci. 2011）。さらに、歯髄が損傷を受けると、局所において Heat shock protein (HSP) が放出され、三叉神経節まで運ばれ神経節内に放出されることを突き止めた（Ohara et al., J Neuroinflammation. 2014）。また、このような痛覚異常には衛星細胞の活性化も関与することを明らかにし、神経細胞だけでなくグリア細胞も重要な働きを有することを報告した（Kaji et al. Mol Pain. 2016）。これらの結果は、末梢組織が障害されると、障害された細胞から特定の分子が放出され、放出された分子が神経終末部に作用して痛覚過敏が発症する可能性を示している。

ラットを用いたパイロットスタディーでは、舌の乾燥によって舌に強い機械痛覚過敏が生じる。この結果は、これまでに報告した NGF や HSP あるいは何らかの分子が乾燥した粘膜細胞から放出されて神経節細胞に運ばれ、放出される可能性を疑わせる。しかし、実際に口腔粘膜を乾燥することによって、粘膜細胞からどのような分子が放出されるかについては全く不明である。これまでに我々は、口腔内の炎症、あるいは組織損傷に注目し、口腔内および顔面皮膚領域に発症する異常疼痛発症に関する神経機構の解明を進め、神経節細胞に、様々な分子が異なる時間経過で発現することを報告してきた（shinoda et al., Front Neurosci. 2019）。このような異常疼痛発症に関与する分子について、以下に示すメカニズム突き止めた。

すなわち、三叉神経の枝が障害を受けると、障害された神経の中でも、太い神経が異常な興奮性の増加を示した。同時に、神経節細胞においては  $K^+$ チャネルの機能低下、 $Na^+$ チャネルの機能亢進、様々な神経ペプチドや一酸化窒素の合成を誘導し、神経節細胞周囲に存在する衛星細胞においてはプリン受容体発現さらにはカプサイシンの受容体である TRPV1 の合成が促進し、障害を受けた神経節細胞だけでなく、障害を受けていない細神経節細胞の活動性をも増強させることを報告した（Iwata et al., J Dent Anesth Pain Med. 2019）

## 2．研究の目的

シェーグレンをはじめとする様々な原因により口腔粘膜が乾燥すると、口腔感覚の機能異常が誘導されることが知られている。特に、口腔に疼痛が発症すると、痛みにより咀嚼嚥下運動が障害されることから、QOL は著しく低下する。このような口腔乾燥に起因する口腔の異常



疼痛は、その発症メカニズムが不明であることから、適確な治療がなされていないのが現状である。そこで本プロジェクトでは、口腔乾燥モデルラットを作製し、末梢神経系にターゲットを絞って、神経終末部における口腔粘膜細胞と神経終末部の機能連関および三叉神経節細胞の機能変化について解析を行い、口腔乾燥に起因する口腔の異常疼痛発症機構の解明を目的とした。

これまでの我々の研究から、口腔粘膜を乾燥すると、粘膜上皮細胞から様々な分子が放出され、粘膜細胞から放出される分子に対応した受容体発現が亢進し、これに伴って神経線維の興奮性が増強して三叉神経節細胞において TRP チャンネルやその他様々な分子の合成が進み、新設細胞から放出され、周囲に存在する神経節細胞や衛星細胞の活性化を亢進するという仮説を立てた。本研究では、この仮説を証明するために、以下の点を解明することを計画した。口腔乾燥モデルとして舌乾燥モデルラットを作製し、舌に痛覚過敏が発症するかどうかを行動学的手法によって明らかにする。舌乾燥モデルラットの三叉神経節に発現する TRP チャンネル陽性細胞を検索する。舌乾燥ラットの三叉神経節における衛星細胞の活性化の解析を行い、活性型衛星細胞がいかなるメカニズムで神経節細胞活動の変調に関与するかを明らかにする。

### 3．研究の方法

#### (1) 舌乾燥モデルラットの作製

舌乾燥モデルラットを作製し、舌に痛覚過敏が発症するかどうかを、逃避閾値を測定することによって明らかにした。舌乾燥モデルは舌を毎日1時間、ガス麻酔下で空气中に放置することによって作製した。パイロットスタディーの結果から、舌乾燥をスタートさせてから3日目から機械刺激に対する閾値が低下しており、これを参考に経日変化を詳細に解析した。また、温度刺激に対する逃避反射閾値の経日変化についても解析を行った。さらに、本プロジェクトでは舌乾燥を停止してからの逃避閾値の変化についても解析し、乾燥を止めることによって閾値の回復があるかどうかについても明確にした。

#### (2) 三叉神経節に発現した TRP チャンネルの同定

舌乾燥によって三叉神経節に発現する TRP チャンネルの同定を行った。TRP タンパクを発現する三叉神経節細胞を同定するため、あらかじめ舌に逆行性トレーサーである 0.3% Fluorogold を投与し、舌への侵害刺激に対する反射閾値が最も低い値を示したタイムポイントにおいて、口腔粘膜、舌神経、三叉神経節を摘出し、免疫組織化学的手法を用いて各組織における異常疼痛制御に重要である TRP チャンネルタンパク陽性細胞数の変化を解析する。我々のこれまでの研究から、口腔内および顔面皮膚領域に発症する異常疼痛の発症には三叉神経節内における神経節細胞とグリア細胞の相互作用が非常に重要であることが解明されているので (Batbold et al., J Neuroinflammation. 2013), 特に、この点に注目して解析を行った。さらに、同定された受容体タンパクに対するブロッカーおよび阻害薬を三叉神経節に直接投与することによって、逃避反射閾値がどのような影響を受けるかについても解析し、ターゲットとなる受容体が実際に痛覚過敏の発症に関与するかどうかを明らかにした。

#### (3) 舌乾燥ラットの三叉神経節における衛星細胞の活性化

舌乾燥後に(2)で舌痛に関連すると思われる神経-グリア機能連関シグナル分子の同定を行うが、実際にその分子が神経細胞外またはグリア細胞外に放出されるのかは不明である。そこで、乾燥舌に投射するニューロンの周囲に存在する衛星細胞の活性化が見られるかどうかについて、免疫組織学的に解析した。



#### 4．研究成果

ラットを2%イソフルランで浅く麻酔し、毎日2時間外気中に保持することによって舌を乾燥させ、舌乾燥ラットを作製した。舌乾燥をスタートしてから、舌を機械刺激することによって引き起こされる頭部ひっこめ反射閾値を測定すると、舌乾燥後3日目から有意な頭部ひっこめ反射閾値の低下を認めた。この頭部ひっこめ反射閾値の低下は舌の乾燥をスタートさせてから14日以上続いた。また、我々は同ラットの舌に熱刺激および冷刺激を与え、頭部ひっこめ反射閾値を行った。その結果、熱刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値は舌の乾燥によって有意な変化を示さなかった。一方、冷刺激に対しては有意な閾値の低下を認めた。

さらに、舌乾燥7日目にラットを灌流固定し、三叉神経節を取りだし、連続組織切片を作製し、TRPV1、TRPV4 およびリン酸化 p38 (pp38) の免疫染色を施し、それぞれの抗体に対して陽性を示す細胞数を算出した。その結果、TRPV1 陽性細胞数は舌乾燥ラットとシャムラットの間で有意な違いを認めなかった。一方、TRPV4 陽性細胞数は舌乾燥ラットの方が有意に大きい値を示した。この結果から、舌乾燥ラットの舌の機械刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値の低下には TRPV4 が関与する可能性を示している。これに対し、TRPV1 陽性細胞数に変化が見られなかったことと、熱刺激に対する頭部ひっこめ反射閾値において乾燥ラットとシャムラットの間には有意差は認められなかったという結果には、一貫性がある。さらに、pp38 陽性細胞数は舌乾燥ラットにおいてシャムに比べ有意に多く検出された。また、p38 のリン酸化阻害剤を三叉神経節に投与することによって TRPV4 の合成が阻害され、同時に舌の機械刺激による頭部ひっこめ反射閾値の有意な上昇を認めた。以上の結果から、おそらく何らかの刺激が三叉神経節細胞に作用することによって、p38 のリン酸化を介した TRPV4 の合成が促進する可能性があると考えられる。

最近の我々の研究で、三叉神経損傷により三叉神経節内に存在する衛星細胞の活性化が亢進することが明らかになっており、同モデルラットの三叉神経節においても衛星細胞の活性化が誘導され、この衛星細胞によって三叉神経節細胞が刺激を受ける可能性がある。そこで、さらに、我々はこのモデル動物の三叉神経節における衛星細胞の活性化について、免疫組織学的に解析を行った。その結果、同モデルラットの三叉神経節では、三叉神経第 1 枝から 3 枝にかけて広い領域で、衛星細胞の活性化が引き起こされることが判明した。これまでの研究により、活性化型衛星細胞からは各種サイトカインが放出され、このサイトカインによって三叉神経節細胞の活動性が増加することが分かっている。おそらく衛星細胞の活性化を介したメカニズムによって三叉神経節細胞内における p38 のリン酸化が亢進し、TRPV4 の合成が進むことによって乾燥舌に機械痛覚過敏が発症するものと考えられた。

#### <引用文献>

Shinoda M, Asano M, Omagari D, Honda K, Hitomi S, Katagiri A, Iwata K. (2011) Nerve growth factor contribution via transient receptor potential vanilloid 1 to ectopic orofacial pain. *J Neurosci.* 31(19):7145-55.

Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, Ogiso B, Omagari D, Asano M, Tsuboi Y, Shinoda M, Iwata K. (2013) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation.* 10:139.

Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N, Iwata K. (2016) Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury. *Mol Pain.* 8;12. pii:



1744806916633704.

Shinoda M, Kubo A, Hayashi Y, Iwata K.(2019) Peripheral and Central Mechanisms of Persistent Orofacial Pain. *Front Neurosci.* 13:1227.

Iwata K, Shinoda M. (2019) Role of neuron and non-neuronal cell communication in persistent orofacial pain. *J Dent Anesth Pain Med.*19(2):77-82.



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Iwata Koichi, Katagiri Ayano, Shinoda Masamichi	4. 巻 59
2. 論文標題 Neuron-glia interaction is a key mechanism underlying persistent orofacial pain	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 173 ~ 175
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnurd.16-0858	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 Urata K, Shinoda M, Ikutame D, Iinuma T, Iwata K	4. 巻 24
2. 論文標題 Involvement of transient receptor potential vanilloid 2 in intra-oral incisional pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 1093 ~ 1100
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/odi.12853	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 Kubo Asako, Shinoda Masamichi, Katagiri Ayano, Takeda Mamoru, Suzuki Tatsuro, Asaka Junichi, Yeomans David C., Iwata Koichi	4. 巻 158
2. 論文標題 Oxytocin alleviates orofacial mechanical hypersensitivity associated with infraorbital nerve injury through vasopressin-1A receptors of the rat trigeminal ganglia	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PAIN	6. 最初と最後の頁 649 ~ 659
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/j.pain.0000000000000808	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 該当する

1. 著者名 Maruno M, Shinoda M, Honda K, Ito R, Urata K, Watanabe M, Okada S, Lee J, Gionhaku N, Iwata K.	4. 巻 31
2. 論文標題 Phosphorylation of p38 in Trigeminal Ganglion Neurons Contributes to Tongue Heat Hypersensitivity in Mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Oral Facial Pain Headache.	6. 最初と最後の頁 372 ~ 380
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11607/ofph.1849.	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 陳睿妍，篠田雅路，岩田幸一
2. 発表標題 舌乾燥症による舌痛覚過敏の末梢神経機構
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
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
研究 分担者	中西 博  (NAKANISHI Hiroshi)  (20155774)	安田女子大学・薬学部・教授   (35408)	
研究 分担者	篠田 雅路  (SHINODA Masamichi)  (20362238)	日本大学・歯学部・准教授   (32665)	