

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18111

研究課題名(和文)酸化ストレスへの脆弱性から探る加齢変化と慢性疼痛の関係性

研究課題名(英文) Fundamental chronic pain study by the investigation of the relationship between aging and oxidative stress

研究代表者

佐藤 仁 (Sato, Hitoshi)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：00594954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛性疾患において侵害刺激の受容に關与するtransient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)の発現量が感覚神経の細胞膜上で上昇した場合を想定し、EGFP-TRPV1を様々なレベルで安定発現する細胞株を使用して実験を行った。TRPV1高発現細胞株はアゴニスト刺激により活性酸素を生じることがわかった。また、三叉神経支配領域に疼痛刺激を与えると、細胞体の多くが存在する三叉神経節において、種々のストレスに迅速に应答する転写因子や、神経細胞の興奮性を示すc-Fosが発現することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

活性酸素種は発現上昇したTRPV1のアゴニスト刺激により感覚神経から過剰に産生され、各組織の加齢に伴う抗酸化作用の低下により、周囲神経組織を障害することが予想される。超高齢化社会を迎えた我が国において高齢者の慢性疼痛への対応は医療経済の面からも急務であり、その病態機序とROSとの関係性が明らかとなったことにより、抗酸化作用を持つ薬剤や化合物の鎮痛効果について新たな知見が加えられた。これらの薬剤や化合物は生体安全性の高いものが多く、本研究結果は慢性疼痛疾患をかかえた高齢者にも安全に使用可能な薬物治療戦略確立への基盤となる。

研究成果の概要(英文)：We prepared a cellline that stably expresses EGFP-TRPV1 at various levels. This cell line is assuming that the expression level of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1), which is involved in the reception of noxious stimuli in chronic pain diseases, is elevated on the cell membrane of sensory nerves. It was found that the TRPV1-highly expressing cell line produces active oxygen by agonist stimulation. In addition, when a pain stimulus is applied to the trigeminal nerve innervation area, transcription factors that rapidly respond to various stresses and c-Fos that shows neuronal excitability are expressed in the trigeminal ganglion where many cell bodies are present.

研究分野：慢性疼痛

キーワード：TRPV1 活性酸素種 三叉神経脊髄路核 三叉神経節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔顎顔面領域には三叉神経痛や神経障害性疼痛、顎関節症、舌痛症など罹患率が加齢により上昇する慢性疼痛疾患が多い。世界に先駆けて超高齢社会に突入した我が国において、これら慢性疼痛疾患への対応は急務である。しかし、加齢による疼痛感受性の変化について明らかな病態機序の報告はなく、効果的かつ安全な薬物治療法も未だ確立はされていない。

Reactive Oxygen Species(ROS)はより反応性の高い化合物に変化した酸素分子の総称で、細胞の重要な構成成分である脂質や核酸を容易に障害する。また酸素消費量の多い神経組織はROSによる酸化ストレスを最も受けやすい組織の一つである。ROSの産生と吸収のバランスは抗酸化酵素によって制御され、三叉神経の末梢支配領域では抗酸化酵素の機能が加齢とともに減弱することが報告された (Baek MK et al. Clin Exp Otorhinolaryngol 2017;10:357-362)。

2. 研究の目的

慢性疼痛性疾患にROSが果たす役割を解明するため、侵害刺激によるROS産生機序、加齢による抗酸化作用の減弱が疼痛感受性の変化や中枢神経組織に及ぼす影響を明らかにする。

3. 研究の方法

1) TRPV1 アゴニスト刺激をおこなった際の感覚神経細胞におけるROS発生機序の解明

慢性疼痛性疾患においてTRPV1の発現量が感覚神経の細胞膜上で上昇した場合を想定し、EGFP-TRPV1を様々なレベルで安定発現するPC12 cell lineを用意する。TRPV1高発現細胞株とTRPV1低発現細胞株をアゴニスト刺激した際に生じるROS量を比較し、TRPV1を介したCa²⁺の流入からROS発生までの細胞内シグナル伝達経路を明らかにする。

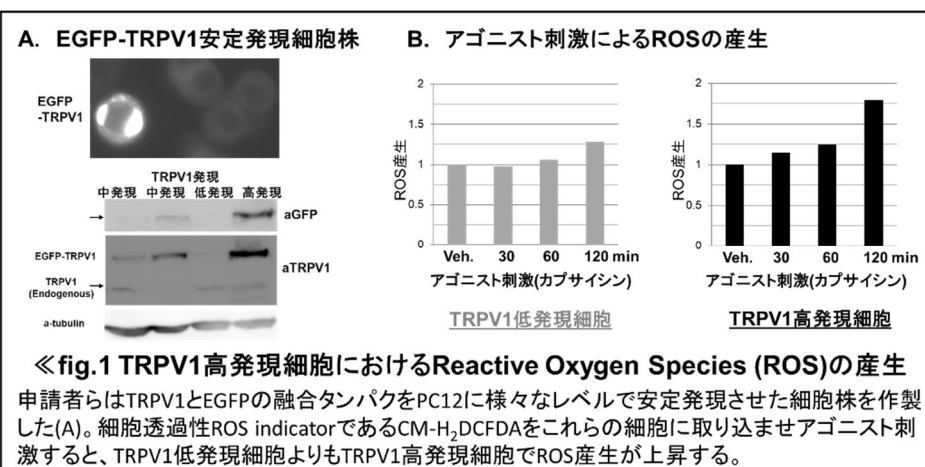
2) 実験動物の疼痛行動と神経組織の酸化損傷の解析

下歯槽神経損傷モデルの疼痛行動を経時的に評価し、三叉神経節や中枢神経組織におけるROS関連タンパク質やグリア細胞の変化を観察する。

4. 研究成果

1) TRPV1 アゴニスト刺激をおこなった際の感覚神経細胞におけるROS発生機序の解明

慢性疼痛性疾患において侵害刺激の受容に關与するtransient receptor potential vanilloid 1(TRPV1)の発現量が感覚神経の細胞膜上で上昇した場合を想定し、EGFP-TRPV1を様々なレベルで安定発現するPC12 cell lineを使用して実験を行った。本研究により、TRPV1高発現細胞株とTRPV1低発現細胞株をアゴニスト刺激した際には、活性酸素種が発生し、アポトーシスが誘導されることが明らかとなった(fig. 1)。



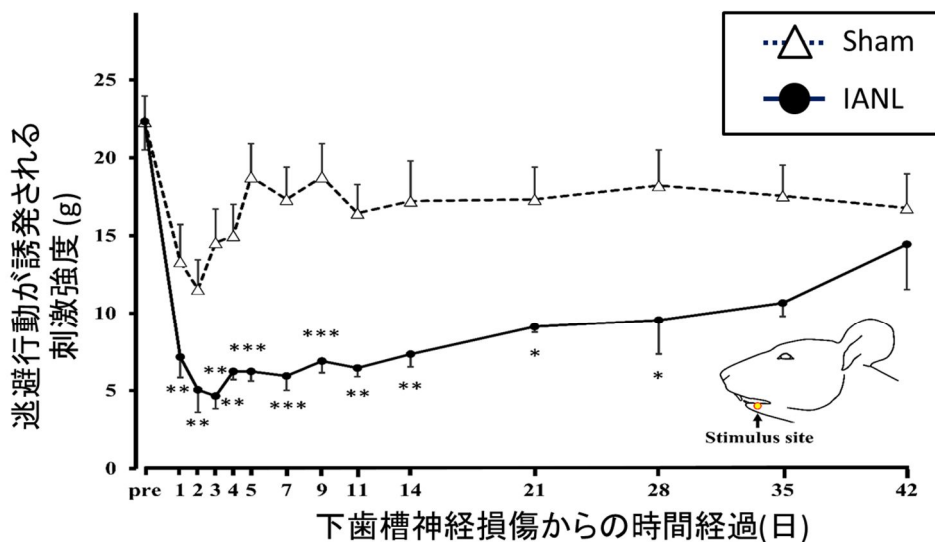
さらに本研究では、アポトーシス誘導の際に誘導される MAP キナーゼ、特に c-Jun N-terminal kinase(JNK)のリン酸化の上流および下流に存在するシグナル伝達経路につき解析を行った。活性酸素種発生後に生じる TRPV1 高発現細胞株のアポトーシスは、pan-caspase inhibitor である Z-VAD-FMK の投与により抑制される。本研究により、リン酸化された JNK の下流において caspase-2 が活性化されている可能性が考えられた。

また、実験動物を用いて、三叉神経支配領域に対する刺激を行った際に、細胞体の多くが存在する三叉神経節において、種々のストレスに迅速に応答する転写因子 Activating transcription factor 3(ATF3)や、神経細胞の興奮性を示す c-Fos が発現することが明らかとなった。それらの転写因子やタンパク質の発現は、疼痛行動に関連する可能性が示唆された。

2) 実験動物の疼痛行動と神経組織の酸化損傷の解析

下歯槽神経損傷モデルラット(以下、IANL 群)は、SD ラットの歯槽神経を剖出し、同神経を 8-0 ナイロン糸で緩く結紮した。Sham 群は剖出した下歯槽神経を結紮せずに閉創した。手術後は 42 日間、ラットのオトガイ部において、機械的刺激に対する感覚閾値を記録した。また、免疫組織化学的手法により、三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)において、神経細胞が興奮状態にあることを示す c-Fos タンパクの陽性細胞数や、神経膠細胞(ミクログリア、アストロサイト)の細胞数や形態変化を評価した。術後 5 日目において、IANL 群では Sham 群に比べ、機械的刺激に対する感覚閾値が有意に低下していた(fig. 2)。また、Vc 領域における c-Fos やミクログリア、アストロサイトの陽性細胞数は有意に増加していた。術後 42 日目では、IANL 群の機械的刺激に対する閾値は、Sham 群と同程度に回復し、c-Fos やミクログリア、アストロサイトの陽性細胞数に有意差は認められなかった。本研究では、下歯槽神経の損傷後、オトガイ部に一過性の知覚異常が生じ、それと同調するように、中枢神経組織にも可逆的な変化が生じることが示された。

➤ fig. 2 オトガイ部に生じる異常感覚の経日的変化



2-way repeated-measures analysis of variance Bonferroni test

* $P < .05$; ** $P < .01$; *** $P < .001$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kiyomoto Masaaki, Shirota Tatsuo, Moriya Takashi, Sato Hitoshi, Nakamura Shiro, Inoue Tomio	4. 巻 76
2. 論文標題 Experimental Study on Involvement of the Central Nervous System in Inferior Alveolar Nerve Damage-Associated Hyperalgesia of the Mental Region	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 2089.e1 ~ 2089.e8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.joms.2018.06.021	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤 仁, 稲田大佳暢, 守谷 崇, 代田達夫
2. 発表標題 下歯槽神経損傷後に生じる知覚異常と中枢神経組織の経日的変化
3. 学会等名 第64回公益社団法人 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 仁
2. 発表標題 顎関節症の痛みの慢性化 - 中枢性感作を生じたら? -
3. 学会等名 第32回一般社団法人日本顎関節学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hitoshi Sato
2. 発表標題 Pathophysiological overlaps between temporomandibular disorders and tension-type headache
3. 学会等名 BIT' 8th World Congress of NeuroTalk（招待講演）（国際学会）
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
--	---------------------------	-----------------------	----