

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17157

研究課題名(和文)加齢による疼痛受容機構の変調

研究課題名(英文)Age related modulation of pain acceptance mechanism

研究代表者

浦田 健太郎 (URATA, Kentaro)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60754398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔粘膜の疼痛受容に対する加齢の影響は不明である。近年、中枢性マクローファージであるミクログリアは、神経の興奮性調節に影響を及ぼし、顎顔面領域の疼痛発現に関与する事が報告されている。そこで、ミクログリア性疼痛調節機構に着目した口腔粘膜損傷後の機械痛覚過敏に対する加齢の影響を明らかにするために、老化マウスを用い行動観察実験、免疫組織化学実験及び行動薬理化学実験を行った。実験結果より、加齢は、炎症性あるいは抗炎症性ミクログリアへの性質変化の様相と、各ミクログリアから放出されるサイトカインであるTNF- $\alpha$ やIL-10の発現に影響を及ぼし、口腔粘膜に発症した機械痛覚過敏を増強及び持続する事が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔粘膜の疼痛は患者の苦痛を招く。加齢が疼痛受容機構へ及ぼす影響の検索において、口腔粘膜損傷後に機械痛覚過敏が加齢により増強及び持続するという成果は、高齢者補綴臨床に有用な疼痛治療ガイドラインの作成や、損傷部が治癒したかに見える粘膜に対する疼痛の有無の診査診断に役立つ可能性を学術的意義に持ち、加齢はミクログリア性の疼痛調節に変化を及ぼすという成果は、鎮痛薬の開発に寄与するという学術的意義を持つ。超高齢社会となった現在、健康寿命の延長の為に口腔内に生じる問題の改善が求められており、口腔内の異常な疼痛により咀嚼や嚥下が困難となった患者に対する、その改善の一助となる事を本研究の社会的意義と考える。

研究成果の概要(英文)：The effect of aging on intra-oral mucosal pain acceptance mechanism are not clear. Microglia regulate neuronal excitability and are involved in orofacial pain development. The effects of aging on mechanical allodynia in the intra oral focusing on the microglial pain regulation mechanism were investigated by behavioral observation experiments, immunohistochemistry experiments, and behavioral pharmacological experiments using aged mice. From these experimental results, it was revealed that aging effects property changes to inflammatory or anti-inflammatory microglia and expression of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-10 released from each microglia, and as a result, it was suggested that mechanical hyperalgesia developed after oral mucosal injury was enhanced and sustained.

研究分野：口腔内疼痛

キーワード：加齢 ミクログリア M1 M2 サイトカイン 口腔粘膜 機械痛覚過敏 SAMP8

### 1. 研究開始当初の背景

加齢は神経系に様々な変化を引き起こし侵害情報伝達経路や疼痛調節機構に影響を及ぼすことが知られている。補綴臨床においては、口腔粘膜の潰瘍の有無と疼痛の有無とが相関しない高齢の患者に遭遇することがある。加齢変化による疼痛感受性への影響は、口腔外では、加齢による様々な報告があるが、口腔内に対する加齢の影響は不明な現状である。末梢に侵害刺激が加わると末梢部から一次ニューロンを興奮が伝導し、手足であれば脊髄、顎顔面領域であれば延髄に入力される。そしてシナプスを介し二次ニューロンへと興奮が伝導し視床、大脳皮質へと伝わることで疼痛として認知されるが、近年、この二次ニューロンの興奮性調節に対し、ミクログリア及びミクログリアが放出するサイトカインの関与が注目されている。しかしながら、この調節機構に対する加齢の影響は顎顔面領域では不明な現状である。以上より、口腔内疼痛へのミクログリア性疼痛調節機構に対する加齢性変化の解明は、高齢者歯科治療において大きな福音となることが考えられ、以上を本研究の背景に据えた。

### 2. 研究の目的

本研究では老化モデルマウスを用い、口腔粘膜の炎症誘発後における疼痛受容の変化を正常マウスと比較し、顎顔面領域の侵害情報が入力される延髄の三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc領域)及び上部頸髄(C1/C2領域)でのミクログリアの極性変化及びミクログリアから放出されるサイトカイン発現に対する加齢の影響解析を行い、口腔内疼痛受容機構の加齢性変調の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 口腔粘膜損傷モデルマウスの作成及び機械痛覚過敏発症の加齢の影響の確認

全身麻酔下にて、老化モデルマウス(SAMP8 雄性マウス 22 週齢)及びコントロールマウス(SAMR1 雄性マウス 22 週齢)の左側上顎口蓋歯槽粘膜部に長さ 5mm 深さ 2mm の切開を加える。切開処置前(Pre)、1日、3日、5日、7日、9日、11日、14日、21日目に、イソフルラン吸入による浅麻酔下にて、機械刺激用デジタルフォンフライを用いた切開部への機械刺激に対する逃避反射閾値を計測し、コントロール群と比較することで加齢変化が及ぼす機械痛覚過敏発症への影響を検討する。

#### (2) 損傷部を支配する Vc 及び C1/C2 領域での加齢変化が及ぼすミクログリアの発現に対する影響解析

各マウスの口蓋歯槽粘膜切開後 3 日目あるいは 11 日目に灌流固定を行い、延髄を摘出する。二次ニューロンが存在する Vc 及び C1/C2 領域にてミクログリアマーカーである Iba1 陽性細胞の発現変化を免疫組織化学的手法にて解析する。

#### (3) 損傷部を支配する Vc 及び C1/C2 領域での加齢変化が及ぼすミクログリアの極性変化に対する影響解析

各マウスの口蓋歯槽粘膜切開後 3 日目あるいは 11 日目に灌流固定を行い、延髄を摘出する。二次ニューロンが存在する Vc 及び C1/C2 領域にてミクログリアマーカーである Iba1 陽性かつ炎症性ミクログリアである M1 ミクログリア(M1)陽性細胞、あるいは Iba1 陽性かつ抗炎症性ミクログリアである M2 ミクログリア(M2)陽性細胞の発現変化を免疫組織化学的手法にて解析する。

#### (4) 損傷部を支配する Vc 及び C1/C2 領域での加齢変化が及ぼす M1 あるいは M2 陽性かつ TNF- $\alpha$ 陽性細胞の発現に対する影響解析

各マウスの口蓋歯槽粘膜切開後 3 日目あるいは 11 日目に灌流固定を行い、延髄を摘出する。二次ニューロンが存在する Vc 及び C1/C2 領域にて M1 あるいは M2 陽性かつ TNF- $\alpha$  陽性細胞、M2 陽性かつ IL-10 陽性細胞の発現変化を免疫組織化学的手法にて解析する。

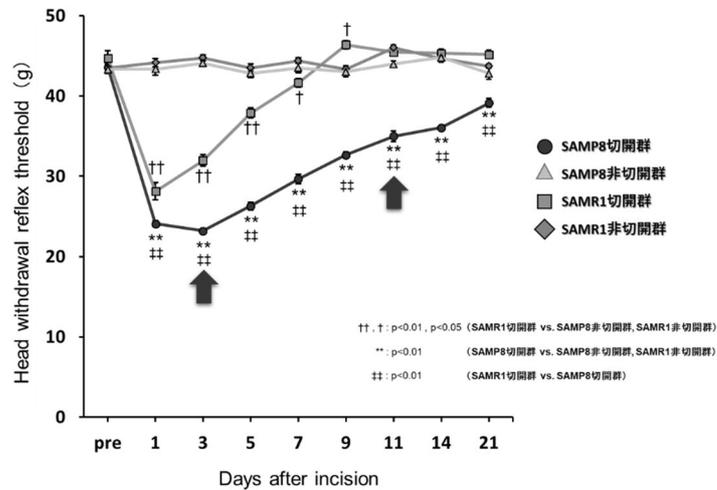
#### (5) TNF- $\alpha$ あるいは IL-10 阻害薬の髄腔内投与による行動薬理的解析

全身麻酔後、老化モデルとコントロールマウスの後頭部皮膚をハサミにて剥離し埋め込み型浸透圧ポンプ(ALZET)を背部皮下に設置し、ポンプに接続するチューブの先端を髄腔内に設置する。TNF- $\alpha$  あるいは IL-10 阻害薬を髄腔内持続投与し、口蓋切開部への機械刺激に対する逃避閾値を投与後 1日、3日、5日、7日、9日、11日目、14日目、21日目の日程で経日的に計測することにより、TNF- $\alpha$  あるいは IL-10 の機械痛覚過敏発症への関与に対する加齢変化による影響を解析する。

#### 4. 研究成果

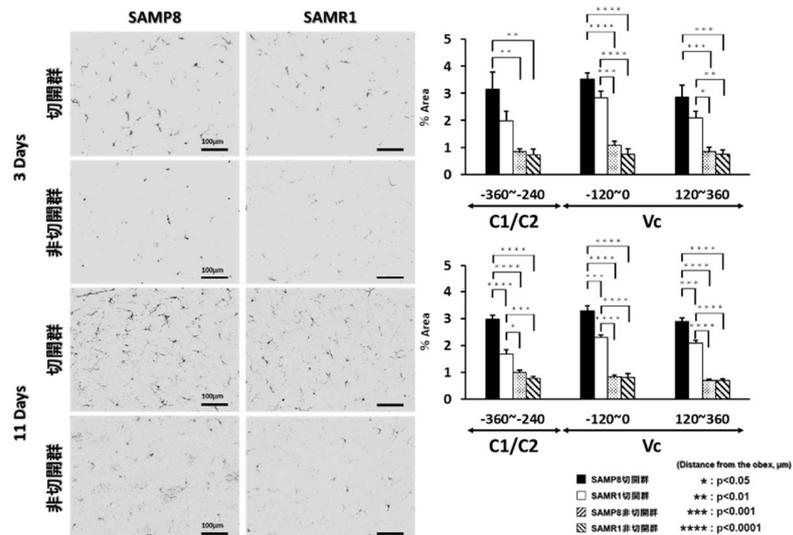
##### (1) 口蓋粘膜切開後の機械痛覚過敏発症に対する加齢の影響

図 1 :  
口蓋粘膜切開後の機械痛覚過敏は、SAMP8 切開群で切開処置後 1 日目から 21 日まで SAMR1 切開群と比較してマウスの逃避反射閾値の有意な低下を認めた。よって、加齢により口蓋粘膜切開後の機械痛覚過敏は増強及び持続することが明らかとなった。



##### (2) 口蓋粘膜損傷後の機械痛覚過敏発症時の Vc 及び C1/C2 領域でのミクログリアの発現に対する加齢の影響

図 2 :  
加齢により、口蓋粘膜損傷後の Vc 及び C1/C2 領域において、活性型ミクログリアの発現の増強が認められた。



##### (3) 機械痛覚過敏発症時の Vc 及び C1/C2 領域の M1, M2 ミクログリア発現への加齢の影響解析

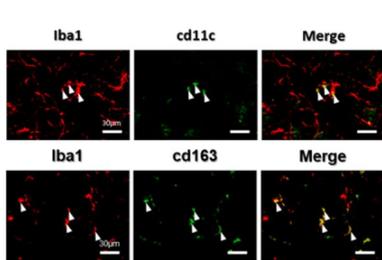
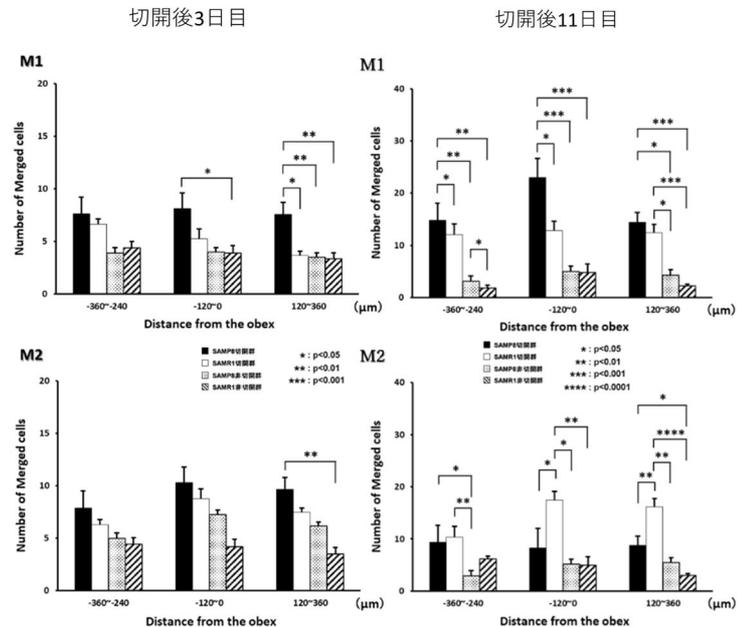


図 3 :  
ミクログリアマーカー (Iba1) 陽性かつ M1 マーカー (cd11c) あるいは M2 マーカー (cd163) 共陽性細胞の発現解析では、切開後 3 日目及び 11 日目では、Vc 及び C1/C2 領域において、加齢により M1 発現の増加が増強し、M2 発現の増加は影響を受けないことが明らかとなった。



(4) 機械痛覚過敏発症時の Vc 及び C1/C2 領域における M1, M2 放出性 TNF- $\alpha$  発現への加齢の影響解析

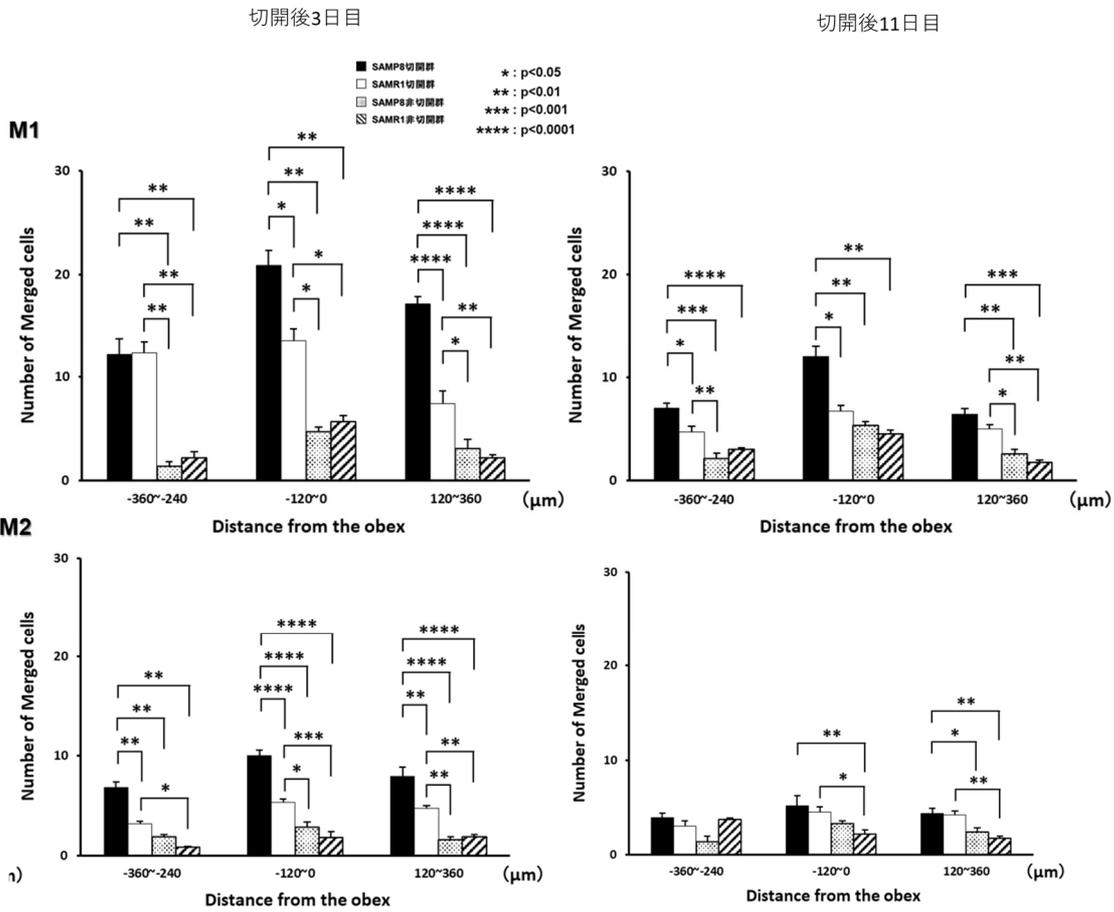


図 4 :

M1 あるいは M2 陽性かつ TNF- $\alpha$  陽性共陽性細胞の発現解析において、切開後 3 日目では、加齢により M1 および M2 における TNF- $\alpha$  発現増加が増強した。切開後 11 日目では、M1/TNF- $\alpha$  発現増加が加齢により増強し、M2/TNF- $\alpha$  は影響を認めなかった。

(5) 口蓋粘膜損傷後の機械アロディニア増強に対する TNF- $\alpha$  あるいは IL-10 中和抗体髄腔内持続投与の効果

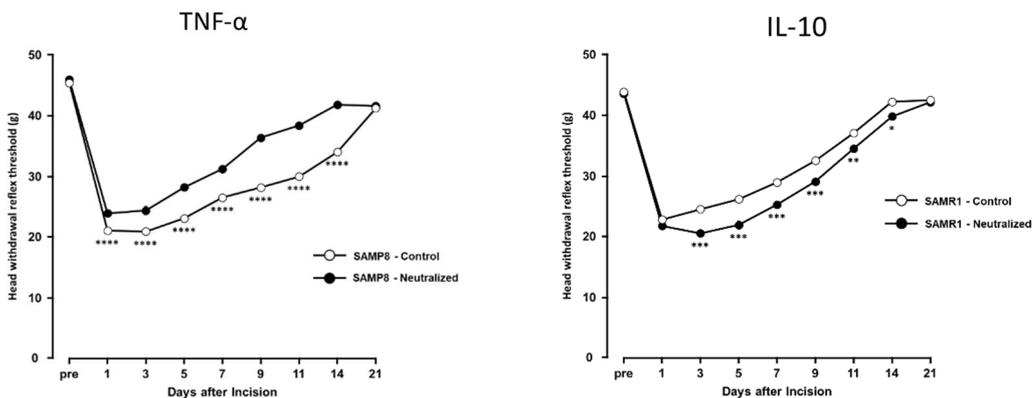


図 5 :

TNF- $\alpha$  中和抗体髄腔内持続投与によって、加齢による口蓋粘膜損傷後の機械アロディニア増強の抑制が認められた。また若齢群である SAMR1 に IL-10 中和抗体を髄腔内持続投与したところ、機械アロディニアが増強した。よって、口蓋粘膜損傷後の機械痛覚過敏の増強には TNF- $\alpha$  が、また、機械痛覚過敏の持続の抑制には IL-10 が関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 篠田雅路, 岩田幸一
2. 発表標題 口腔粘膜切開後の三叉神経脊髄路角尾側亜核におけるミクログリア極性転換に対する老化の影響
3. 学会等名 第12回三叉神経領域の感覚-運動統合機構研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 篠田雅路, 岩田幸一, 飯沼利光
2. 発表標題 口腔粘膜切開後の三叉神経脊髄路角尾側亜核におけるミクログリア極性転換に対する老化の影響
3. 学会等名 日本大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 大音樹, 篠田雅路, 岩田幸一, 飯沼利光
2. 発表標題 口腔粘膜損傷後の三叉神経脊髄路角尾側亜核におけるM1/M2ミクログリア極性転換の加齢変化
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 大音樹, 西尾健介, 池田貴之, 伊藤智加, 高津匡樹, 伊藤克紀, 山崎彰啓, 飯沼利光
2. 発表標題 口腔内疼痛受容機構に対する加齢の影響
3. 学会等名 日本補綴歯科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 生田目大介, 浦田健太郎, 篠田雅路, 岩田幸一
2. 発表標題 口腔粘膜切開後の機械痛覚過敏発症機構に対する老化の影響
3. 学会等名 日本口腔顔面痛学会
4. 発表年 2019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
--	---------------------------	-----------------------	----