

平成 21 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19592330  
 研究課題名（和文）顎関節痛の末梢感作におけるMAPキナーゼファミリーの役割  
 研究課題名（英文） Role of MAP kinase family in the peripheral sensitization in a model of temporomandibular joint pain  
 研究代表者  
 徳永 敦 (TOKUNAGA ATSUSHI)  
 兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
 研究者番号：70254521

## 研究成果の概要：

「末梢感作」に同期したMAPKのリン酸化と、自発痛ではなく動作に伴う疼痛を特徴とする顎関節の疼痛の関連に着目した研究であり、目的としては顎関節痛モデル動物において1) 痛みを起こす刺激がMAPKを活性化するか。2) MAPK は末梢で何を標的としているのか、さらに3) MAPKを末梢で阻害することで顎関節痛を改善し得るのか、を解明するのが目的である。顎関節痛モデル動物におけるMAPKの活性化の検討するために、起炎剤(complete Freund's adjuvant :CFA)を用いて、顎関節局所の炎症モデルを作成し、滑膜や軟骨での末梢神経終末でMAPK(ERK, p38, JNK)のリン酸化を検討した。リン酸化ERKの染色は、三叉神経節内のサテライト細胞及び小型を中心とした神経細胞に見られた。顎関節炎モデルの炎症側三叉神経節での小型細胞の染色が、反対側に比べて増加しており現在定量化を進めている。

また、炎症痛のメカニズム解明のため、末梢神経の感作機構を探る研究として、PAR2(proteinase activated receptor) による痛みチャネルであるTRPA1の感作機構の実験を施行した。その結果、PAR2の活性化の下流に存在するPKAとPKCのシグナル伝達系の両方がTRPA1の感作メカニズムに重要であることを発見した。この結果は一流国際誌に発表できるよう論文準備中である。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経解剖学、ペインリサーチ

科研費の分科・細目：歯科麻酔学

キーワード：顎関節、炎症痛、MAPキナーゼ、ERK、PAR2、TRPA1

## 1. 研究開始当初の背景

MAPKファミリーであるextracellular signal-regulated kinase (ERK), p38, c-Jun-N-terminal kinase(JNK)は後根神経節

(DRG)や脊髄後角において疼痛伝達に関与するシグナル伝達リン酸化酵素である。これらのMAPKは神経損傷や炎症によってリン酸化することが知られ、疼痛関連遺伝子の発現の

調節を行っている (Ji. et al. Neuron. 2002 22:57-68, Obata. et al. J. Neurosci. 2004 24: 211-22)。

慢性的な病態における定常的なMAPKの活性化は疼痛研究の一つの潮流であり、この下流の遺伝子発現が注目されている。一方、我々はこれまでに遺伝子発現に関係しない末梢の終末において痛みを生じる刺激を行うと、p38とERKのリン酸化が一過性に上昇し、これらの抑制が機械的刺激に対する閾値の低減に関与することを報告した (Dai. et al. Pain. 2004 108:258-66, Mizushima. et al. Pain. 2005 113:51-60.)。末梢の受容体チャンネル分子の活性化にはProtein kinase AやProtein kinase C等の膜直下での働きが主流であったが、これらの活性化に比べて、MAPKの活性化は明瞭に可視化できる。従って、MAPKを対象とする本研究は、より組織学的なアプローチが容易であることが予想される。今回の研究は「末梢感作」に同期したMAPKのリン酸化と、自発痛ではなく動作に伴う疼痛を特徴とする顎関節の疼痛の関連に着目した点において独創的であり、遺伝子発現ではない神経機能に対するMAPKの新たな役割を検討しうる点で疼痛研究の一つのターゲットとして新規性に富んでいる。すなわち、顎関節痛モデル動物において1) 痛みを起す刺激がMAPKを活性化するのか。2) MAPKは末梢で何を標的としているのか、さらに3) MAPKを末梢で阻害することで顎関節痛を改善し得るのか、という3点が本研究の具体的な目標である。

## 2. 研究の目的

### (1) 顎関節痛モデル動物におけるMAPKの活性化の検討

各種起炎剤 (complete Freund's adjuvant : CFA, フォルマリン, カプサイシン) を用いて顎関節局所の炎症モデルを作成し、滑膜や軟骨での末梢神経終末でMAPK (ERK, p38, JNK) のリン酸化を検討する。また、麻酔下で炎症モデル動物で顎関節運動を行い、それによって誘発されるMAPKのリン酸化を比較する。

### (2) MAPKの活性化の上流因子の検討

組織化学的にMAPKのリン酸化がどのようなタイプの神経線維で起きているのかを明らかにする。ターゲットとしては

#### 1, Nerve growth factor (NGF)

→ 受容体として痛覚受容ニューロンに発現しているTyrosine kinase A (TrkA) 陽性ニューロン終末でのMAPKリン酸化

#### 2, ATP及びその代謝物

→ 各種のP2受容体陽性ニューロンでのMAPKリン酸化

### (3) 疼痛とMAPKカスケードとの検討

実際に活性化されているMAPKが同定できた後に、そのタイムコースに合わせて、すで

に確立された阻害剤を投与して実際に痛みが抑制されているかどうかを確認する。

## 3. 研究の方法

### (1) 顎関節痛モデルの作成

起炎剤であるCFAやカプサイシンを使い、炎症のみで誘発される末梢のMAPKを検討する。特異的なリン酸化抗体を用いた免疫組織化学を用いて顎関節滑膜周辺の神経線維・終末構造でのMAPKのリン酸化を確認する。検討するMAPKはERK1/2, p38 JNKを予定している。

### (2) 顎関節痛モデル動物での運動痛の最適化

上記モデルを用いて咬筋の電気刺激、または開創器等による顎の開口刺激で得られる反射性の顎二腹筋の筋電図を疼痛感覚の指標にして顎関節炎症時では顎関節運動によって痛みが増強している事を確認し、痛みを生じさせるために有効な刺激系を確立する。

### (3) 顎関節痛モデルにおける関節運動によるMAPKリン酸化の確認

2) で確認した刺激を用いて顎関節の運動によりリン酸化されるMAPKを免疫組織化学により確認し、炎症状態での発現と比較する。MAPKのリン酸化は、短いタイムコースで推移することが予想されるので、モデル作成から刺激によって誘発されるリン酸化のタイムコースを詳細に検討し、定量する。

### (4) リン酸化MAPKの局在する線維タイプを同定する

免疫組織化学による二重標識を用いてMAPKが局在する線維のタイプを同定する。検討する神経のタイプとしては、1) 有髄線維と無髄線維 2) NGFに感受性をもつか (TrkA陽性線維) 3) ATP受容体を持つか、

の3つを詳細に検討する。

### (5) 三叉神経の投射路におけるMAPKリン酸化の検討

末梢の線維におけるMAPKのリン酸化と対比させるため、三叉神経節においてもMAPKのリン酸化を検討し、末梢線維とどの程度相関するかを確認する。三叉神経節においてはニューロンのタイプがより詳細に分類しやすいので、TrkA, ATP受容体の他、TRPVファミリーとの共存やペプチドとの共存も確認し、顎関節痛モデル動物の顎開閉運動でどのようなニューロンでMAPKが活性化しているかを詳細に検討する。

同時に、脳幹の三叉神経の終末部での二次ニューロンやグリアでのMAPKのリン酸化を検討して、末梢線維のMAPKリン酸化の程度と比較する。

### (6) MAPKの阻害と疼痛との関連を検討

顎関節痛モデル動物を作成し、MAPKの阻害剤を顎関節に投与して開口反射を指標に顎関節運動で誘発される疼痛との関連を検討する。また、上記(1)で確認した発痛増悪因

子となる NGF や ATP を投与したモデル動物に対して末梢投与した MAPK 阻害剤の効果を検討する。また、MAPK の活性化に対して、もっとも作用が大きいと思われる受容体の阻害を行い、顎運動によって誘発される疼痛反射への影響を検討する。

#### 4. 研究成果

顎関節炎は、CFA と生理食塩水を 1:1 で混合したものを顎関節腔に注入することによって励起した。また、三叉神経節内の神経細胞のうち、顎関節を支配する神経細胞をラベルするために顎関節腔内へ FluoroGold (FG) を注入した。三叉神経節摘出は CFA 注入後 3 日後とし、摘出直前に運動時痛を与えた。運動時痛は、ペントバルビタール麻酔下において顎関節を人為的に動かすことで与えた。最大開口位まで開口と閉口を 2 秒に 1 回、2 分間、60 回繰り返した。生理食塩水のみを注入したラットに比べて CFA を注入したラットは顎運動時に逃避と抵抗の行動がみられ、炎症による運動時痛が起こっているものと考えられた。顎運動を与えた直後にラットを PBS と 1%PFA/PBS で灌流固定し、三叉神経節を摘出した。4%PFA で後固定、30%Sucrose で置換した後包埋し、7 $\mu$ m 厚の切片にして抗リン酸化 ERK 抗体で免疫染色した。

当初は、ペントバルビタールで麻酔したラットの頭頂部を剃毛、皮膚と左側頭筋を切開し、左顎関節を露出させて顎関節腔に CFA を 50 $\mu$ l 注入したが、この方法では FG と CFA をほぼ同時に注入することになるため、CFA、FG 共に漏出し、一定量の注入が出来ない。そこで FG は CFA 注入の 2 日前に、切開することなく皮膚の上から手探りで顎関節腔まで針を刺して注入することとした。

リン酸化 ERK の染色は、三叉神経節内のサテライト細胞及び小型を中心とした神経細胞に見られた。顎関節炎モデルの炎症側三叉神経節での小型細胞の染色が、反対側に比べて多いような心象は受けるものの、これについては陽性細胞数を計測する必要がある。またリン酸化 ERK 陽性神経細胞が顎関節支配神経細胞であるかどうか、これについても FG との二重染色像において数を計測する必要がある。しかし得られた FG 陽性細胞像からは、三叉神経節内における顎関節支配神経細胞の存在比率はそれほど高くはないことがうかがえるため、正確に陽性細胞比率を測定するためにはさらに実験数を増やす必要がある。

末梢神経の感作機構の解明の研究として、PAR2 (proteinase activated receptor) による痛みチャネルである TRPA1 の感作機構の実験を施行した。その結果、PAR2 の活性化の下流に存在する PKA と PKC のシグナル伝達系の両方が TRPA1 の感作メカニズムに重要であ

ることを発見した。この結果は一流国際誌に発表できるよう論文準備中である。

#### 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 17 件)

- ①. Miyoshi, K., Obata, K., Kondo, T., Okamura, H. and Noguchi, K. (2008) IL-18-mediated microglia/astrocyte interaction in the spinal cord enhances neuropathic pain processing after nerve injury. *J. Neurosci.*, 28, 12775-12787. 査読有
- ②. Fukuoka, T., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Obata, K., Dai, Y. and Noguchi, K. (2008) Comparative study of the distribution of the alpha-subunits of voltage-gated sodium channels in normal and axotomized rat dorsal root ganglion neurons. *J. Comp. Neurol.*, 10, 510, 188-206. 査読有
- ③. Katsura, H., Obata, K., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2008) Transforming growth factor-activated kinase 1 induced in spinal astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity after nerve injury. *Glia*, 56, 723-733. 査読有
- ④. Kobayashi, K., Yamanaka, H., Fukuoka, T., Dai, Y., Obata, K. and Noguchi, K. (2008) P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J. Neurosci.*, 12, 28, 2892-902. 査読有
- ⑤. Wang, S., Dai, Y., Fukuoka, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Cui, X., Tominaga, M. and Noguchi, K. (2008) Phospholipase C and protein kinase A mediate bradykinin sensitization of TRPA1: a molecular mechanism of inflammatory pain. *Brain*. 131(Pt 5):1241-1251. 査読有

⑥. Obata, K., Katsura, H., Miyoshi, K., Kondo, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., Akira, S. and Noguchi, K. (2008) Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J. Neurochem.*, 105, 2249-2259. 査読有

⑦. Sakurai, J., Obata, K., Ozaki, N., Tokunaga, A., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Kondo, T., Miyoshi, K., Sugiura, Y., Matsumoto, T., Miwa, H. and Noguchi, K. (2008) Activation of extracellular signal-regulated protein kinase in sensory neurons after noxious gastric distention and its involvement in acute visceral pain in rats. *Gastroenterology*. 134(4):1094-103. 査読有

⑧. Cui, XY., Dai, Y., Wang, SL., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Chen, J. and Noguchi, K. (2008) Differential activation of p38 and extracellular signal-regulated kinase in spinal cord in a model of bee venom-induced inflammation and hyperalgesia. *Mol Pain*. 30:4(1):17. 査読有

⑨. Dai, Y., Wang, S., Tominaga, M., Yamamoto, S., Fukuoka, T., Higashi, T., Kobayashi, K., Obata, K., Yamanaka, H. and Noguchi, K. (2007) Sensitization of TRPA1 by PAR2 contributes to the sensation of inflammatory pain. *J. Clin. Invest.*, 117, 1979-1987. 査読有

⑩. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Activation of fibroblast growth factor receptor by axotomy, through downstream p38 in dorsal root ganglion, contributes to neuropathic pain. *Neuroscience*, 150, 202-211. 査読有

⑪. Fukui, T., Dai, Y., Iwata, K., Kamo, H.,

Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Wang, S., Cui, X., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Frequency-dependent ERK phosphorylation in spinal neurons by electric stimulation of the sciatic nerve and the role in electrophysiological activity. *Mol. Pain*, 3, 18. 査読有

⑫. Katsura, H., Obata, K., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Sakagami, M. and Noguchi, K. (2007) Activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in primary afferent neurons contributes to heat and cold hyperalgesia after inflammation. *J. Neurochem.*, 102, 1614-1624. 査読有

⑬. Obata, K., Katsura, H., Mizushima, T., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T. and Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. *J. Neurochem.*, 102, 1569-1584. 査読有

⑭. Mizushima, T., Obata, K., Katsura, H., Sakurai, J., Kobayashi, K., Yamanaka, H., Dai, Y., Fukuoka, T., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Intensity-dependent activation of extracellular signal-regulated protein kinases 5 in sensory neurons contributes to pain hypersensitivity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 321, 28-34. 査読有

⑮. Kozai, T., Yamanaka, H., Dai, Y., Obata, K., Kobayashi, K., Mashimo, T. and Noguchi, K. (2007) Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. *Glia*, 55, 595-603. 査読有

- ⑩. Yamanaka, H., Obata, K., Kobayashi, K., Dai, Y., Fukuoka, T., and Noguchi, K. (2007) Alternation of the cell adhesion molecule L1 expression in a specific subset of primary afferent neurons contributes to neuropathic pain. *Eur. J. Neurosci*, 25, 1097-1111. 査読有
- ⑪. Ogura, H., Tachibana, T., Yamanaka, H., Kobayashi, K., Obata, K., Dai, Y., Yoshiya, S. and Noguchi, K. (2007) Axotomy increases plasma membrane Ca<sup>2+</sup> pump isoform4 in primary afferent neurons. *Neuroreport*, 18, 17-22. 査読有

〔学会発表〕（計 7 件）

- ① Noguchi, K. (2008) MAP kinase regulation of pain: peripheral, central and glial mechanisms. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, UK.
- ② Noguchi, K. (2008) TRP channels and nociception. (Workshops) 12th World Congress on Pain, 8.17-22, Glasgow, UK.
- ③ Noguchi, K. (2008) Neuropathic pain mechanisms: TRP family and signal transduction molecules. (Plenary lecture) NeuPSIG satellite to the Glasgow 2008 World Congress on Pain, 8.13-15, London, UK.
- ④ Noguchi, K. (2008) Contribution of Changes in Signal Transduction Molecules in DRG and Spinal Cord to Neuropathic Pain. (Symposium) The 3rd Asian Pain Symposium, 7,18-19, Fukuoka.
- ⑤ 野口光一 (2008) 痛み伝達の調節機構-T R P ファミリー分子とシグナル伝達- (特別講演) 第 2 2 回日本ニューロモデュレーション学会, 5.18, 東京.
- ⑥ Noguchi, K. (2007) Roles of ERK5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. (Symposium) 7th IBRO World Congress of Neuroscience, 7.12-17, Melbourne,

Australia.

- ⑦ Noguchi, K. (2007) Roles of extracellular signal-regulated protein kinase (ERK)5 in spinal microglia and primary sensory neurons for neuropathic pain. (Workshop) Second International Congress on Neuropathic Pain, 6.7-10, Berlin, Germany.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

徳永 敦 (TOKUNAGA ATSUSHI)  
兵庫医科大学・医学部・非常勤講師  
研究者番号：70254521

### (2) 研究分担者

野口 光一 (NOGUCHI KOICHI)  
兵庫医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10212127

### (3) 連携研究者

なし