

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07746

研究課題名(和文)性差による舌痛症発生機構の違いについての基礎研究

研究課題名(英文)Basic research of the sex difference in tongue neuropathic pain caused by lingual nerve injury in mice

研究代表者

坪井 美行 (TSUBOI, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50246906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：舌神経損傷(LNI)モデルマウスを用いて、舌神経損傷後の舌機械アロディニアおよび熱痛覚過敏の性差に対する中枢神経系の免疫細胞の役割を解析することを目的とした。LNI後1日目より9日目まで、雄性および雌性マウスともに機械または熱刺激によるHWRTが有意に低下した大槽内ミノサイクリン投与後、LNI後の機械または熱刺激によるHWRT低下の抑制が雄性マウスでのみ認められた。一方、大槽内ピオグリタゾン投与後、LNI後の機械または熱刺激によるHWRT低下の抑制が雌性マウスでのみ認められた。舌神経損傷後の舌神経障害性疼痛の性差には、上行性痛覚伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、神経障害性モデル動物を使用して、延髄内の免疫反応の違いが、疼痛様行動発現の性差に関与しているかを調べることにより、舌神経損傷後の舌神経障害性疼痛の性差には、上行性痛覚伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆された。このことにより、延髄内の免疫反応の違いにターゲットにした性差を加味した新規の治療に応用できる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to assess the sex difference in the role in immune cells in the central nervous mechanism in tongue mechanical allodynia and heat hyperalgesia after lingual nerve injury (LNI) in mice. From day 1 to day 9 after LNI, HWRT to mechanical or heat stimulation was significantly decreased in male and female mice. After minocycline administration, the decrease of HWRT to mechanical or heat stimulation by LNI was suppressed only in male mice. On the other hand, after pioglitazone administration, the decrease of HWRT to mechanical or heat stimulation by LNI was suppressed only in female mice. These results suggest that sex difference in tongue neuropathic pain after lingual nerve injury involves the difference in immune cells expressing in the central nervous system and regulating the ascending nociceptive pathway.

研究分野：神経生理学

キーワード：性差 舌痛症

## 様式 C - 19 , F - 19 - 1 , Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

舌は筋線維が縦横に走行し多彩な運動ができる運動器であり,特殊感覚である味覚の受容器<sup>1)</sup>と体性感覚である痛覚や触覚の受容器を配する感覚器でもある。舌には Transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の発現が認められ, TRPV1 が舌の痛覚に関与していることが報告されている<sup>2,3)</sup>。さらに,舌癌<sup>4,5)</sup>,舌炎<sup>6,7)</sup>や舌乾燥<sup>8)</sup>は,舌からの侵害情報の三叉神経感覚核における処理機構の変調を惹き起こし,舌痛を発症すると報告されている。しかし,舌からの侵害情報の三叉神経感覚核における処理機構の性差に関する研究はほとんどない。

### 2. 研究の目的

本研究では,雄性および雌性マウスを用いて,舌神経の圧迫による舌神経損傷(LNI)後の舌への機械刺激および熱刺激による頭部逃避反射閾値(HWRT)低下に対するミノサイクリンおよびピオグリタゾン大槽内投与の効果を検討し,LNI後の舌痛発症の性差に関わる中枢神経系における免疫細胞の役割を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

Institute of cancer research系マウス(雄性マウス, n = 47, 7-12週齢;雌性マウス, n = 46, 7-12週齢,日本エスエルシー,静岡)を実験に用いた。マウスは明(7-19時)/暗(19-7時)サイクルの環境下で,自由に水・餌が摂取できる状態で飼育された。雌性マウスにおいては,全身麻酔下(導入4%,維持2.5%イソフルラン吸入,ヴィアトリス製薬,東京)でインピーダンスチェッカー(MK-11,室町機械,東京)のプローブを腔に挿入して測定したインピーダンスにより性周期を判断し<sup>16)</sup>,性周期に偏りがないように実験開始時期を設定した。本研究は,日本大学歯学部動物実験委員会の審査後,学部長の承認を得て行われた(承認番号:AP20DEN003-4)。「日本大学動物実験実施規程」に従って実験を行い,被験動物の苦痛軽減および使用動物数の低減に努めた。

LNIモデルの作製は,Katagiriらの方法<sup>9)</sup>を参考にした。全身麻酔下(導入4%,維持2.5%イソフルラン吸入)で,左側の舌根部粘膜を切開して舌神経を露出し,ポリカーボネート樹脂クリップ(夏目製作所,東京)を用いて舌神経を30秒間30gの強さで圧迫した。圧迫後,切開部を8-0ポリアミド縫合糸(ジーシーソフトレッチ,ジーシー,東京)で縫合した。舌神経の圧迫のみを施行せず,上記と同様の処置を行った群をSham処置群とした。

マウスに十分な全身麻酔(導入4%,維持2%イソフルラン吸入)を行った後,イソフルラン吸入を0.5%に維持した。その後,足底に対する200g以下のピンチ刺激(Rodent pincher - analgesia meter, BIOSEB, Vitrolles, France)で足ひっこめ反射が起こり,呼吸数が毎分180~200回となる麻酔レベルに達したことを確認した後すぐに,舌への機械刺激または熱刺激の頭部逃避反射閾値(HWRT)を測定した。Rodent pincher - analgesia meterを用いて,舌尖より3mmの左側舌部を機械刺激(0-110g, 5g/sec, cut off: 110g)した。接触型熱刺激装置(6×6mm, Intercross, Tokyo)を用いて,舌尖より3mmの左側舌部を熱刺激(30-52℃, 1℃/sec, cut off: 52℃)した。それぞれ2回測定し,平均値をHWRTとした。刺激間隔は3分以上とした。

1週間の飼育室での馴化の後,1日おきに2回,舌への機械刺激または熱刺激のHWRTを3回測定した。その後,LNIまたはsham処置を行った。処置後,1,3,5,7,9,11,13,15日目に機械刺激および熱刺激のHWRTを測定した。

LNI または Sham 処置後 3 日目に機械刺激および熱刺激の HWRT を測定後、深麻酔下（導入 4%、維持 2% イソフルラン吸入）にて、マウス頭部を前屈した状態で後頭部皮膚より、SP10 チューブ（夏目製作所，東京）とハミルトンシリンジが接続された 31G の歯科用注射針（クルツアージャパン，大阪）を大槽内に刺入した。ハミルトンシリンジを用いて、ミノサイクリン（60.7 mM: 3 mg minocycline hydrochloride in 100  $\mu$ l saline, Merck, Darmstadt, Germany）、ピオグリタゾン（76.2 mM: 3 mg pioglitazone Hydrochloride in 100  $\mu$ l 100% dimethyl sulfoxide (DMSO), 東京化成工業，東京），生食塩水（0.9%，大塚製薬，東京）または 100% DMSO を 10  $\mu$ l 大槽内投与した。各薬物の濃度設定は，Sorge らの報告 15) を参考にした。投与 0.5, 1, 2 および 24 時間後に機械刺激および熱刺激の HWRT を測定し，HWRT に対する薬物効果の性差を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) LNI による HWRT の変化とその性差

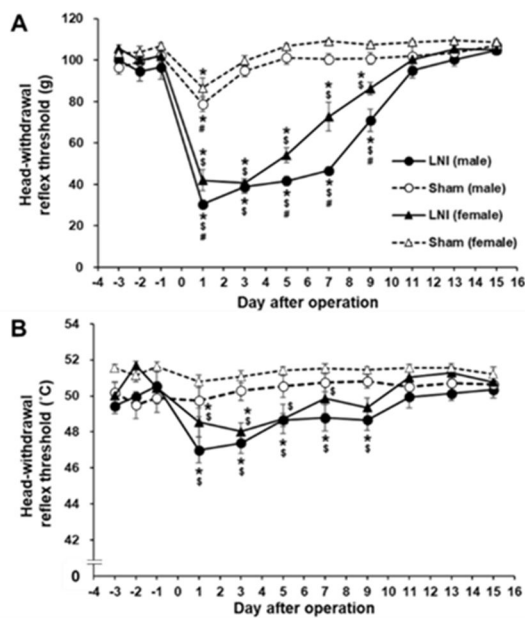


図 1

図 1A に LNI 後の舌への機械刺激の HWRT の変化を示す。雄性マウスおよび雌性マウスにおいて，LNI 後 1, 3, 5, 7, 9 日目の HWRT が，LNI 前の HWRT (雄性マウス:  $96.5 \pm 5.9$  g; 雌性マウス:  $101.9 \pm 2.2$  g,  $n = 8$  in each) や sham 群の HWRT (sham 処置後 1 日目，雄性マウス:  $77.8 \pm 3.79$  g,  $n = 7$ ; 雌性マウス:  $86.6 \pm 4.8$  g,  $n = 8$ ) と比較して有意に低下した ( $p < 0.05$ )。雄性マウスでは LNI 後 1 日目 ( $30.3 \pm 2.0$  g) に，雌性マウスでは LNI 後 3 日目 ( $40.6 \pm 5.1$  g) に HWRT が，それぞれ最も低下した。術後 1, 5, 7, 9 日目，雄性マウスの HWRT は雌性マウスと比較して有意に低かった ( $p < 0.05$ )。

図 1B に LNI 後の舌への熱刺激の HWRT の変化を示す。雄性マウスにおいて，LNI 後 1 日目に HWRT ( $47.0 \pm 0.7$ ) がもっとも低下し，LNI 後 1, 3, 5, 7, 9 日目の HWRT は LNI 前の HWRT ( $50.5 \pm 0.2$ ) や sham 群の HWRT ( $49.7 \pm 0.9$ ) と比較して有意に低下した ( $p < 0.05$ )。一方，雌性マウスでは術前の HWRT ( $50.4 \pm 0.9$ ) と比較して LNI 後 1, 3 日目で HWRT が有意に低下した ( $p < 0.05$ )。また，LNI 後 1, 3, 5, 7 日目で sham 群 (sham 処置後 1 日目， $50.8 \pm 0.3$ ) と比較して有意に HWRT が低下していた ( $p < 0.05$ )。LNI 後 15 日目まで，雌雄間で HWRT の有意な差はなかった。

##### (2) ミノサイクリンの効果

図 2A に機械刺激の HWRT の変化に対するミノサイクリンの効果を示す。雄性マウスでは，LNI 前の HWRT ( $100.7 \pm 2.0$  g) と比較し，LNI 後 3 日目において，HWRT ( $33.2 \pm 5.1$  g) が有意に低下した ( $p < 0.01$ ,  $n = 6$  in each) (図 2A)。さらに LNI 後 3 日目におけるミノサイクリン大槽内投与 0.5, 1, 2 時間後の HWRT (0.5 時間後:  $88.0 \pm 7.5$  g, 1 時間後:  $87.7 \pm 7.2$  g, 2 時間後:  $46.1 \pm 3.6$  g) は，LNI 後生理食塩水投与群と比較して有意に上昇した ( $p <$

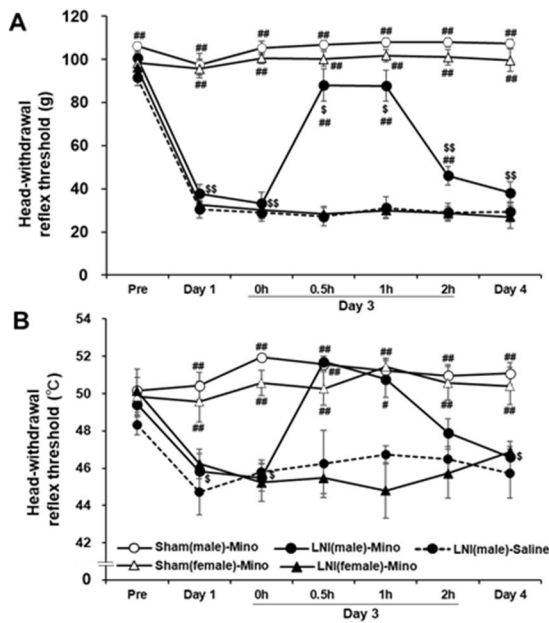


図 2

n = 5 in each) は、LNI 後生理食塩水投与群と比較して有意に上昇していた ( $p < 0.01$ )。雌性マウスでは、LNI 後 3 日目の HWRT は LNI 前と比較して有意に低下したが (LNI 前:  $50.1 \pm 0.2$  , LNI 後 3 日目:  $45.2 \pm 1.0$  ,  $p < 0.01$ )、ミノサイクリン大槽内投与後の熱刺激の HWRT は、LNI 後生理食塩水投与群の HWRT と比較して差は認められなかった。

### (3) ピオグリタゾンの効果

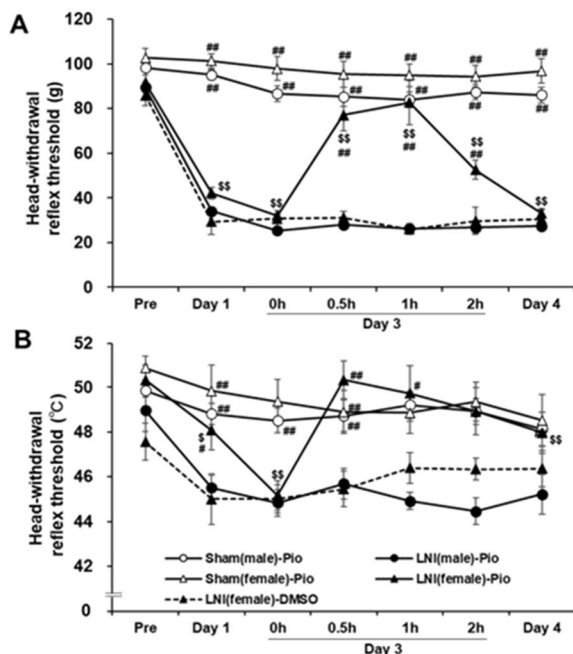


図 3

間後:  $82.7 \pm 9.9$  g, 2 時間後:  $52.6 \pm 4.2$  g,  $p < 0.01$ , n = 5 in each)。

図 3B に熱刺激による HWRT の変化に対するピオグリタゾンの効果を示す。雄性マウスでは、LNI 後 3 日目に LNI 前と比較して有意に HWRT は低下した (LNI 前:  $49.0 \pm 0.9$  , LNI 後 3 日目,  $44.8 \pm 0.6$  ,  $p < 0.01$ , n = 6 in each)。LNI 後 3 日目に低下した HWRT は、ピオグリタゾン大槽内投与により変化しなかった。雌性マウスでは、LNI 後 3 日目, LNI 前と比較し

0.01)。雌性マウスでは、LNI 後 3 日目の HWRT は LNI 前と比較して有意に低下したが (LNI 前:  $96.1 \pm 3.7$  g, LNI 後 3 日目:  $30.3 \pm 4.3$  g, n = 6 in each,  $p < 0.01$ )、ミノサイクリン大槽内投与後の機械刺激の HWRT は、LNI 後生理食塩水投与群の HWRT と比較して差は認められなかった。

図 2B に熱刺激による HWRT の変化に対するミノサイクリンの効果を示す。雄性マウスでは、LNI 前の HWRT ( $49.4 \pm 0.7$  ) と比較し、LNI 後 3 日目の HWRT ( $45.5 \pm 0.7$  ) が有意に低下した ( $p < 0.05$ , n = 6 in each)。また、術後 3 日目におけるミノサイクリン大槽内投与 0.5, 1 時間後の HWRT (0.5 時間後:  $51.7 \pm 0.3$  , 1 時間後:  $50.8 \pm 1.0$  ,

図 3A に機械刺激の HWRT の変化に対するピオグリタゾンの効果を示す。雄性マウスでは LNI 前と比較して LNI 後 3 日目の HWRT が有意に低下した (LNI 前:  $89.5 \pm 2.5$  g, LNI 後 3 日目:  $25.3 \pm 2.0$  g,  $p < 0.01$ , n = 6 in each)。ピオグリタゾン大槽内投与は LNI 後 3 日目に低下した HWRT を変化させなかった。雌性マウスでは、LNI 前と比較して LNI 後 3 日目に HWRT は有意に低下した (LNI 前:  $91.5 \pm 3.4$  g, LNI 後 3 日目,  $32.0 \pm 0.7$  g,  $p < 0.01$ , n = 6 in each)。LNI 後 3 日目に低下した HWRT はピオグリタゾン大槽内投与 0.5, 1, 2 時間後、LNI 後 DMSO 投与群と比較して有意に回復した (ピオグリタゾン大槽内投与群, 0.5 時間後:  $77.1 \pm 6.9$  g, 1 時間後:  $82.7 \pm 9.9$  g, 2 時間後:  $52.6 \pm 4.2$  g,  $p < 0.01$ , n = 5 in each)。

て有意に HWRT が低下した (LNI 前:  $50.3 \pm 0.6$  , LNI 後 3 日目,  $45.2 \pm 0.7$  ,  $p < 0.05$  ,  $n = 6$  in each)。DMSO 大槽内投与と比較して, ピオグリタゾン大槽内投与 0.5, 1 時間後, LNI 後 3 日目に低下した HWRT は有意に回復した (ピオグリタゾン大槽内投与群, 0.5 時間後:  $50.3 \pm 0.8$  , 1 時間後:  $49.7 \pm 1.2$  ,  $p < 0.05$  ,  $n = 5$  in each)。

以上の結果より, 舌神経損傷後の舌神経障害性疼痛の性差には, 上行性痛覚伝達系の興奮性を調節する免疫細胞の相違が関与することが示唆された。

#### <引用文献>

- 1 ) Behrens M, Meyerhof W, Bitter taste sensibility in humans and chimpanzees. eLS, John Wiley & Sons, Hoboken, 2013, 1-9
- 2 ) Tominaga M, Caterina MJ, Malmberg AB, Rosen TA, Gilbert H, Skinner K, Raumann BE, Basbaum AI, Julius D, The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron* 21, 1998, 531-543.
- 3 ) Kido MA, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T, Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res* 82, 2003, 393-397.
- 4 ) Tamagawa T, Shinoda M, Honda K, Furukawa A, Kaji K, Nagashima H, Akasaka R, Chen J, Sessle BJ, Yonehara Y, Iwata K, Involvement of microglial P2Y12 signaling in tongue cancer pain. *J Dent Res* 95, 2016, 1176-82.
- 5 ) Koyama R, Iwata K, Hayashi Y, Hitomi S, Shibuta I, Furukawa A, Asano S, Kaneko T, Yonehara Y, Shinoda M, Pannexin 1-mediated ATP signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis is involved in tongue cancer pain. *Int J Mol Sci* 22, 2021, 11404.
- 6 ) Carstens E, Saxe I, Ralph R, Brainstem neurons expressing c-Fos immunoreactivity following irritant chemical stimulation of the rat's tongue. *Neurosci* 69, 1995, 939-53.
- 7 ) Sugiyo S, Uehashi D, Satoh F, Abe T, Yonehara N, Kobayashi M, Takemura M, Effects of systemic bicuculline or morphine on formalin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats. *Exp Brain Res* 196, 2009, 229-237.
- 8 ) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K, ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 2016, 1744806916641680.
- 9 ) Katagiri A, Shinoda M, Honda K, Toyofuku A, Sessle BJ, Iwata K, Satellite glial cell P2Y12 receptor in the trigeminal ganglion is involved in lingual neuropathic pain mechanisms in rats. *Mol Pain* 8, 2012, 23.

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

|  |                       |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Osada Ayaka, Hitomi Suzuro, Nakajima Akira, Hayashi Yoshinori, Shibuta Ikuko, Tsuboi Yoshiyuki, Motoyoshi Mitsuru, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi | 4. 巻<br>177           |
| 2. 論文標題<br>Periodontal acidification contributes to tooth pain hypersensitivity during orthodontic tooth movement  | 5. 発行年<br>2021年       |
| 3. 雑誌名<br>Neuroscience Research  | 6. 最初と最後の頁<br>103-110 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.neures.2021.11.007  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する          |

|  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. 著者名<br>Kaizu Akihiro, Tsuboi Yoshiyuki  | 4. 巻<br>-                   |
| 2. 論文標題<br>Creation of myofascial pain syndrome-like muscle by artificial electrical stimulation and stretching treatment. | 5. 発行年<br>2023年             |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Neuroscience Methods  | 6. 最初と最後の頁<br>109862-109862 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.jneumeth.2023.109862  | 査読の有無<br>有                  |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）  | 国際共著<br>該当する                |

〔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<br>Yoshiyuki Tsuboi  |
| 2. 発表標題<br>Sex differences in neuropathic pain mechanisms in the trigeminal nervous system of mice |
| 3. 学会等名<br>第99回日本生理学会大会  |
| 4. 発表年<br>2022年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部 生理学講座  
http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/g.physiology/

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                       | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)            | 備考 |
|-------|---|----------------------------------|----|
| 研究分担者 | 浅野 正岳<br><br>(ASANO Masatake)<br><br>(10231896) | 日本大学・歯学部・教授<br><br><br>(32665)   |    |
| 研究分担者 | 三枝 禎<br><br>(SAIGUSA Tadashi)<br><br>(50277456) | 日本大学・松戸歯学部・教授<br><br><br>(32665) |    |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|