

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10099

研究課題名(和文) 三叉神経領域の痛覚日内変動機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of Circadian Variation of Nociception in Trigeminal Area

研究代表者

杉村 光隆 (Sugimura, Mitsutaka)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90244954

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)：本研究では、時間生物学的な視点から、「痛み」に関する効果的な制御方法を確立するための基礎的な知見の提供を目的とする。マウスの三叉神経領域にホルマリンを注射し、疼痛関連行動の持続時間やc-Fos陽性細胞数を数えた。その結果、三叉神経領域における痛みは、昼間よりも夜間で強いことが示唆された。次に、三叉神経節における時計遺伝子の発現を検討した。その結果、三叉神経節には明瞭な概日リズムが観察された。この明瞭な概日リズムの振動は、三叉神経節が自律的な概日振動を通して痛覚も含めた感覚入力の中継と時間ゲーティングを担っていることを示唆している。以上の結果をまとめて成果発表を行なった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の今回の研究で、マウスにおける三叉神経支配領域の疼痛には昼夜差があることがわかった。学術的意義として、痛みの基礎研究では、痛みの感じ方には日内変動があることを念頭に置き、実験遂行の時間を揃えるだけでなく、マウスの概日リズムを厳密に整えることの重要性が示された。また、社会的意義として、既存の痛みの治療法に時間の概念を取り入れることで、新薬の開発に頼らずとも、より効果的な鎮痛薬の投薬を可能とする根拠の1つになることが考えられた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to provide basic knowledge to establish effective control methods regarding "pain" from a temporal biological perspective. Formalin was injected into the trigeminal region of mice, and the duration of pain-related behavior (PRB) and c-Fos positive cells were counted. The results suggested that pain in the trigeminal region was more intense at night than during the day. Next, we examined the expression of clock genes in the trigeminal ganglion. A clear circadian rhythm was observed in the trigeminal ganglion. This clear circadian rhythm suggests that the trigeminal ganglion is responsible for relaying and time-gating sensory inputs, including pain, through autonomous circadian oscillations. These results were summarized and reported in a paper.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：三叉神経系 体内時計 痛覚日内変動 TRPA1 ホルマリンテスト PER2::LUCマウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

時計遺伝子に制御されている体内時計は、睡眠・覚醒リズムに加え、脳波やホルモン分泌、細胞分裂、体温調節、血圧などの生命機能を維持するために極めて重要なシステムであり、細菌から哺乳類まで生物が普遍的に備えている。その周期は、例えばヒトでは約24.5～25.0 時間であり、私たちの社会が1日24 時間の周期であるため、そのまま何もしなければ生活の昼夜のサイクルが少しずつずれることになるが、それを解決するために、生体には体内時計をリセットする機構が備わっている。リセット因子として最も強力なものは、光の刺激であり、そのほか温度、食事、社会的接触等の環境因子が有効に作用することが明らかになっている¹⁾。1997 年に哺乳類最初の時計遺伝子 *Clock* と *Per* がクローニングされて以来²⁾、中枢時計である視交叉上核 (SCN ; suprachiasmatic nucleus) のみならず、生体のほとんどあらゆる器官、組織、細胞には体内時計が存在し、時計遺伝子の発現量が1 日の中で律動的に変化することによって、一細胞を最小単位として時間情報が生み出されることがわかってきた³⁾⁴⁾。

体内時計の機序が分子生物学的に少しずつ解明されるにつれて、医学および医療の分野では、疾患の原因解明や治療戦略から医療過誤対策にいたるまでの幅広い領域に、時間生物学的知見を応用する研究が発展しつつある。痛みに関する研究分野でも、痛覚の日内変動や効果的な疼痛治療の開発に向けた取り組みが始まっている。侵害受容に関わる多くのメディエータは、体内時計に合わせたリズムを持っており、痛みの感じ方もそれに合わせたリズムがあると言われている⁵⁾。例えば、分娩時の痛みは夜の方が大きく、末期癌患者のモルヒネの追加は夕刻に多い。また、関節リウマチ患者の多くは早朝に激しい痛みを感じ、片頭痛は夜間に痛みが増悪する。よって痛みの律動性を理解して治療戦略を練ることが効果的な成果をもたらし、患者にとって福音となるものと思われる。その第一段階として、痛覚に関する時間生物学的な基礎研究では、雄性マウスの脊髄レベルにおける substance P が炎症性疼痛の日内変動の修飾因子であることや⁶⁾、雄性ラットの熱刺激の侵害受容は活動期後半(暗期)に亢進すること⁷⁾、あるいは熱刺激に対する雄性マウスの痛覚の日内変動は二峰性のピークを示すこと⁸⁾、などの報告が散見されるが、その本体の解明には至っていない。加えて、我々が専門とする三叉神経領域での侵害受容に関する時間生物学的知見は皆無である。本研究では三叉神経支配領域における痛覚の日内変動を検討し、さらにマウスの三叉神経節における時計遺伝子の発現リズムを明らかにし、同領域における概日調節機構を検討することにした。

【参考文献】

- 1) 本間研一ら：生体リズムの研究．北海道：北海道大学図書刊行会，1989．
- 2) Reppert SM et al.: Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* 2002; 418:935-41
- 3) Hara R et.al.: Restricted feeding entrains liver clock without participation of the suprachiasmatic nucleus. *Genes Cells* 2001; 6:269-78
- 4) Son GH et al.: Adrenal peripheral clock controls the autonomous circadian rhythm of glucocorticoid by causing rhythmic steroid production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 05:20970-5
- 5) Chassard Det al.: Chronobiology and anesthesia. *Anesthesiology*. 2004 Feb;100(2):413-27.
- 6) Zhang J et al.: Regulation of peripheral clock to oscillation of substance P contributes to circadian inflammatory pain. *Anesthesiology*. 2012 Jul;117(1):149-60.
- 7) Christina A et al.: Daily rhythm of nociception in rats. *J Circadian Rhythms* 2004; 2:2
- 8) Konecka AM, Sroczyńska I.: Circadian rhythm of pain in male mice. *Gen Pharmacol*. 1998 Nov;31(5):809-10.

2. 研究の目的

本研究では、三叉神経支配領域の疼痛の日内変動を調べ、同領域における概日調節機構を解明する。その上で、日内変動を考慮した鎮痛剤の投与方法（時間治療学的投与方法）開発の可能性について検索することを目的とした。

3. 研究の方法

実験 1

(1) 10 週齢の雄性マウス (C57BL/6J Jms Slc、日本SLC) を、室温 23 ± 1 °C の静穏な施設で給水・摂食を自由とし、12 時間ごとの明・暗期サイクル下で少なくとも10 日間飼育した。

(2) 実験用マウスを実験ケージに1匹ずつ入れて30分間順化した後、用手的に左側上口唇（三叉神経第二枝領域）にホルマリン（5%、10 μ l）を皮下注射した。

(3) 薬剤投与後、実験ケージに速やかに戻し、45 分間ビデオによる録画を行った。疼痛関連行動（PRB；pain-related behavior）の持続時間を、急性期と持続期の2 相に分けて昼夜で比較検討した。

(4) 当該マウスを灌流固定し、脳を取り出した後、凍結スライス切片を作成し、免疫組織化学染色により、三叉神経脊髄路核におけるc-Fosの発現を昼夜で比較検討した。

(5) さらに、同条件で飼育した別のマウスから三叉神経節を取り出し、定量的リアルタイムPCR 法により、侵害受容体の1 つである transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) の日中および夜間の発現を調べ比較検討した。

実験 2

(1) 遺伝子発現を生物発光として測定するために、PERIOD2::LUCIFERASE ノックイン

(PER2::LUC) マウスを用いた。片側の三叉神経節と視交叉上核 (SCN) を含む脳切片を生体外で培養した。

(2) 生物発光レベルを、高感度光検出器を用いて測定した。

(3) 同様の実験を *Cry1* 遺伝子欠損マウス (*Cry1*^{-/-}) または *Cry2* 遺伝子欠損マウス (*Cry2*^{-/-}) を用いて行った。

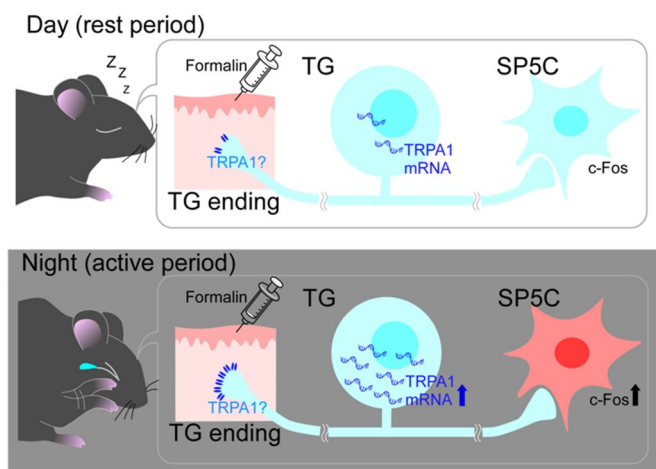
(4) さらに、免疫組織化学的に野生型マウスの SCN と三叉神経節における PER2 タンパクの発現を調べた。

(5) 上記の結果を踏まえ、三叉神経節における概日調節機構について検討した。

4. 研究成果

実験 1 PRB の持続時間は夜間の方が昼間に比べて有意に長く、三叉神経脊髄路核における c-Fos 免疫陽性細胞数は昼間より夜間の方が有意に多かった。さらに、三叉神経における TRPA1 の mRNA 発現は、日中よりも夜間の方が有意に高かった。これらの結果から、三叉神経領域の痛みは、侵害受容体の発現の違いもあり、げっ歯類が活動する夜間では昼間よりも強いことが示唆された。

以上、この結果をまとめて報告した(Niiri et al.2021 *Front Neurosci*)。



実験2 生体外へ取り出したマウスの三叉神経節では、すべての遺伝子型において PER2::LUC レベルに明瞭な概日振動が認められた。その周期は SCN よりも三叉神経節で短く、野生型マウスよりも *Cry1*^{-/-}マウスで短く、*Cry2*^{-/-}マウスで長かった。三叉神経節では、免疫組織化学的に PER2 タンパク質の発現は神経細胞体に局在していた。生体外培養における三叉神経節ニューロンの *Per2* 発現と、明瞭な概日リズムの振動より、三叉神経節が自律的な概日振動を通して感覚入力の中継と時間ゲーティングを担っていることが示唆された。

以上、この結果をまとめて報告した(Shirakawa et al.2023 *Front Neurosci*)。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Shirakawa Yukie, Ohno Sachi N., Yamagata Kanae A., Kuramoto Eriko, Oda Yoshiaki, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru, Sugimura Mitsutaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Circadian rhythm of PERIOD2::LUCIFERASE expression in the trigeminal ganglion of mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2023.1142785	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 Niiro A, Ohno SN, Yamagata KA, Yamagata K, Tomita K, Kuramoto E, Oda Y, Nakamura TJ, Nakamura W, Sugimura M.	4. 巻 15
2. 論文標題 Diurnal Variation in Trigeminal Pain Sensitivity in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurosciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2021.703440	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 Oda Yoshiaki, Takasu Nana N., Ohno Sachi N., Shirakawa Yukie, Sugimura Mitsutaka, Nakamura Takahiro J., Nakamura Wataru	4. 巻 772
2. 論文標題 Role of heterozygous and homozygous alleles in cryptochrome-deficient mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136415 ~ 136415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136415	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白川 由紀恵, 大野 幸, 新納 彩子, 山形 歌奈絵, 杉村 光隆
2. 発表標題 マウスの三叉神経節における PERIOD2::LUCIFERASE 発現の概日リズム
3. 学会等名 第51回 日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大野 幸, 杉村 光隆
2. 発表標題 三叉神経支配領域における概日リズムと三叉神経節における時計遺伝子の発現について
3. 学会等名 第101回日本生理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 白川 由紀恵, 大野 幸, 山形 歌奈絵, 織田 善晃, 中村 孝博, 中村 渉, 杉村 光隆.
2. 発表標題 三叉神経節におけるPER2::LUCの発現リズム.
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会.
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白川 由紀恵、大野 幸、新納 彩子、山形 歌奈絵、杉村 光隆.
2. 発表標題 三叉神経節における PER2::LUC の発現リズム.
3. 学会等名 第50回日本歯科麻酔学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新納 彩子, 大野 幸, 富田和男, 倉本恵梨子, 中村 渉, 杉村 光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 白川由紀恵,大野 幸, 山形歌奈絵, 織田善晃,中村孝博,中村 渉,杉村光隆
2. 発表標題 三叉神経節における時計遺伝子の発現リズム
3. 学会等名 第28回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新納 彩子,大野 幸,青山 歌奈絵,山形 和彰,杉村 光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第15回環境生理学プレコンgres 2020年3月16日 紙上開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新納 彩子,大野 幸,青山 歌奈絵,山形 和彰,杉村 光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第27回日本時間生物学会（ポスター） 2020年9月26、27日 オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新納 彩子,大野 幸,青山 歌奈絵,山形 和彰,杉村 光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第48回日本歯科麻酔学会学術集会（口頭発表） 2020年10月10-11月10日オンライン開催
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 新納 彩子, 大野 幸, 青山 歌奈絵, 山形 和彰, 杉村 光隆
2. 発表標題 急性持続性疼痛の動物モデルを用いた、三叉神経支配領域における痛みの日内変動の解析
3. 学会等名 第13回鹿児島大学大学院医歯学総合研究科口腔先端科学教育研究センター研究発表会（口頭発表）, 2020年12月19日, 鹿児島
4. 発表年 2020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	大野 幸 (Ohno Sachi) (00535693)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学医歯学総合研究科・客員研究員 (17701)	
研究分担者	山形 和彰 (Yamagata Kazuaki) (40784195)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・助教 (17701)	削除
研究分担者	山下 薫 (Yamashita Kaoru) (50762613)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・講師 (17701)	

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
---------	---------