

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18453

研究課題名（和文）ストレス誘発性の顎顔面痛を軽減するCOX阻害剤の新たな役割

研究課題名（英文）Roles of COX inhibitors on deep craniofacial nociception associated with psychological stress conditions

研究代表者

大竹 正紀（Otake, Masanori）

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00736621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：心理ストレスは顔面痛を増大するが、その脳基盤はストレスに伴う脳機能の変調である。中でも中枢神経系でのCOX活性による神経興奮の増大がストレスによる不安やうつ状態の発現に關与する。本研究では非ステロイド系消炎剤（NSAIDs）の投与がストレス誘発痛の軽減に關与するかどうかを明らかにすることである。モデル動物による検討の結果、連日のNSAIDs投与はストレス誘発性の不安行動を軽減するものの、咬筋痛の軽減にはいたらなかった。以上の事実は、COX活性の阻害は負の情動生成を制御できることが示唆されることは明らかである一方、痛みには十分でないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の報告同様、非ステロイド系消炎剤はストレス軽減効果があることを明らかにした。とりわけ不安行動の軽減効果は顕著であった。一方、ストレスが引き起こす顔面痛の軽減効果については有意な軽減効果を認めなかった。つまり不安軽減効果をもたらす量では有効ではなく、一方、使用量を増やすとストレス誘発性の咬筋痛を軽減できたが、胃潰瘍など副作用の発現が確認された。よってこの点を克服できれば、日常的な薬物であるNSAIDsにはストレス誘発性の慢性痛を制御できることが推測できる。また脳内のCOX活性を軽減するという意味で、全身の運動療法が効果的であることから、今後は、そのような方向性で本課題を進展させる予定である。

研究成果の概要（英文）：Psychological stress can increase deep craniofacial pain, and the neural basis for those could be attributed to neural changes in the brain associated with psychological stress. Particularly, inhibitions of COX cascade in the brain are well known to prevent induction of anxiety. Accordingly, this study aimed to determine the effects of daily administration of NSAIDs on masseter muscle pain associated with psychological stress conditions. Data revealed that NSAID exerted the inhibition of anxiety-like behavioral responses. However, this is not the case for increased masseter muscle nociception under psychological stress conditions. Actually, we increased the dose of NSAIDs which seemed to have a potential to the inhibition of masseter muscle pain. However, several side effects were seen like gastric ulcers. These notions indicated that NSAIDs potentially had preventive effects of psychological stress; however, those effects might be inconsistent in the case of pain inhibition.

研究分野：歯科矯正学 口腔生理学

キーワード：ストレス 慢性痛 脳 非ステロイド系消炎剤 顔面痛

1. 研究開始当初の背景

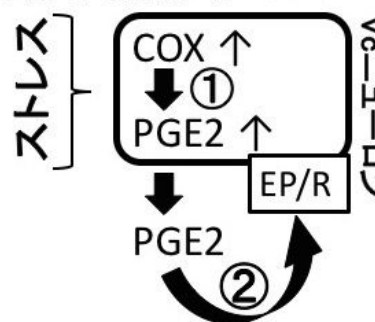
1) 社会的背景

心理ストレス(=ストレス)は顎顔面部の痛みを増大させ、われわれの生活の質を著しく低下させる(報告多数)。またストレスは実体が不明瞭であるだけでなく、社会生活を営む上で不可避であることから、ストレス誘発痛の軽減は容易ではない。さらに日本人の7割がストレスを感じていること、社会生活を営む上でストレスは不可避であることから、適切かつできるだけ簡便な方法を用いてストレスを解消することが、ストレス誘発痛の制御に重要である。本課題では、非ステロイド系消炎薬(NSAIDs)を取り上げ、ストレス誘発痛の制御方法を開発することを目指し、本課題を実施した。

2) ストレス誘発痛に対する非ステロイド系抗炎症薬の有効性

薬物療法による抗炎症効果は末梢のみならず中枢神経系にも作用し、不安などを軽減することが近年、知られるようになった。そしてその生体メカニズムは、過剰に興奮した神経細胞の興奮抑制など、脳機能の調整作用による。炎症性因子である Prostaglandin(PG)は先行研究により中枢神経系でも増大し、うつや痛みに対する応答を変化させることが示されている。しかしながら NSAIDs が、どのようにして脳内メカニズムに介入し、歯科的なストレス誘発痛を軽減させるのか? は不明であった。よって本研究者は図1に示す仮説をたて、本研究計画を立案することになった。

図1. ストレスによる①COX-PGE2活性の増大が、②Vcの痛みニューロンの興奮性を増大させる細胞メカニズム



3) ストレス誘発性の顎顔面痛の脳メカニズム

(1) 三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc部)の役割: 痛みの増大は、脳の興奮性の変化を基盤とする(Harperら、*JDR* 95, 2016)。顎関節症など歯科的な慢性痛では、脳内の特定の部位の興奮性が変化する(Wilcoxら、*Neuroimage* 117.2015)。よって痛みの脳メカニズムを解明するためには、脳神経細胞の興奮性の評価が必須である。申請者は、これまで顎顔面部疼痛モデルを用い、痛み処理の中枢であるVc部の興奮性の増大が痛みの増大に関与することを解明した(PMID: 35842906, PMID: 29503395)。例えば抗うつ薬であるSSRIの繰り返し投与は、ストレスモデルにおける咬筋侵害応答を抑制する(PMID: 29808228)。しかし医療現場で日常的に使用されるNSAIDsがストレス誘発痛のおよぼす影響は不明であった。よって当初、本課題の基本的な方向性は、あ) ストレスモデルの確立(不安行動の増大を指標とする)、い) あ)のモデルにおける咬筋疼痛応答の増大の確認、う) あ、い)を確定させた後、NSAIDsによる効果を観察し、その際、生じている脳内機構の変化を確認することであった。

2. 研究の目的と経緯

当初の目的: ストレス誘発性の顎顔面痛を発症・増大させる脳メカニズムの解明である。そして具体的には、非ステロイド系消炎剤が、変調した三叉神経脊髄路核尾側亜核の興奮性に与える影響を検討し、ストレス誘発痛を軽減させる脳機構を解明することであった。一般に、慢性痛は非常に難治性で治療が難しい。これまで多くの薬剤が開発されてきたが未だ、満足いく結果は得られていない。最近では中枢指向性の薬剤の有効性も示されているが、副作用などの観点からも一般臨床での使用は躊躇するのが現状である。この点を考慮し、本課題ではNSAIDsという臨床現場では、古典的かつ頻用されている薬剤に着目し、その有効性を明らかにすることでストレス管理に役立てるといふ狙いがある。

経緯: 研究成果は以下に示すとおりである。しかし実験を遂行する過程で、当初、予想していた結果が得られない可能性が出てきた。よってストレス誘発痛に対するNSAIDsの有効性というテーマから、全身運動(トレッドミル走 10m/分 x 30分/日)による効果にスイッチすることにした。(理由は、以下の4.研究成果の1)2)参照のこと)

3. 研究の方法

1) **心理ストレスモデルの作成:** 社会的敗北ストレス(SDS)モデルを採用した。本モデルは現在、人での心理ストレス状態をもっとも反映するとされ、ストレスの基礎研究では広く用いられている。しかし口腔顔面領域のストレス誘発痛モデルとして用いる事例はほとんど見られない。

2) 行動学的観察

(1) **心理状態の評価。** 新たに導入した装置を用い(Scanet mv-40 mov; Melquest) SDSモデルにおける負の心理状態を評価した。方法はSocial Interaction(SI) test(右上図参照) オープンフィールド(OF)テスト(総移動距離、rearing回数の測定) 新規物体認知能(ORT)テスト、

明暗滞在時間(DL)テストである。

(2) 顔面深部痛の行動学的評価: 咬筋へのホルマリン注入による顔面疼痛関連行動を計測した。
 (3) 形態学的検討: SDS 処置、咬筋ホルマリンテストによる三叉神経脊髄路核尾側亜核における神経活動を、神経興奮のマーカーである c-Fos, FosB 免疫応答を定量した。

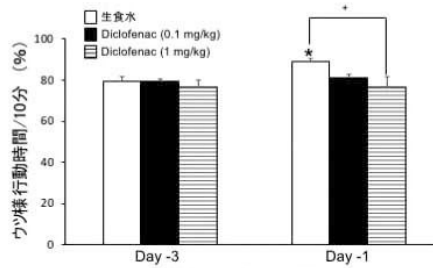
(4) 薬剤投与: NSAIDS (ジクロフェナック) の経口投与が、SDS および咬筋ホルマリン刺激によって引き起こされる不安・咬筋疼痛関連行動および三叉神経脊髄路核尾側亜核における c-Fos, FosB の発現に与える影響を定量した。

4. 研究成果

本研究は途中、a) NSAIDS を用いた実験を中断し、b) 運動療法の有効性を明らかにする実験を行うこととなった。よってまず a) の概要を以下の 1) 2) の項目で説明する。続いて主な研究成果である b) に関し概説する。

1) NSAID の投与がうつ様行動におよぼす影響について。

右上図に示す様に、NSAIDS を連日、投与 (10 日間) するとうつ様行動 (非水泳時間) は有意に短縮した。つまり NSAIDS は抗うつ作用を有する可能性がある。この所見は多くの先行研究によって報告されている。

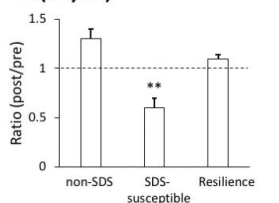


Diclofenac (COX阻害剤) の繰り返し投与は強制水泳ストレス処置によるウツ様行動時間を短縮した。* $P < 0.05$ vs Day -3, + $P < 0.05$ vs 生食水

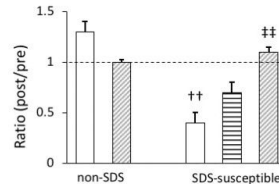
2) NSAID の投与がストレス誘発痛におよぼす影響

1) に示すように NSAIDS は抗うつ作用を有することが明らかになったことを受け、同様に連日 NSAIDS 投与を実施した後、後肢の侵害応答を観察した。しかしながら、いずれも抗うつ作用をもたらす薬物量では、抗侵害 (ホルマリン刺激による痛みの軽減) 応答は見られなかった。さらに少数サンプル (N=3) を用い、10mg/kg を用いた同様の実験を行った。すると本濃度の使用では、ストレス誘発痛の軽減が観察できた。しかしながら、実験後、胃の状態を観察すると、粘膜には複数の潰瘍が観察された。体重変化には他のストレス処置マウスと有意な差は見られず、その他、著明な問題は観察されなかったものの、胃潰瘍自体が全身状態に影響を与える可能性を無視できず、また動物愛護の観点からも、NSAIDS 投与に関する実験は、見送ることとした。
当初の目的に対する結論: ストレス誘発性の不安、うつ様行動の軽減は見られるものの、胃潰瘍を指標とした、副作用の見られない NSAIDS の量では、痛みの軽減は困難ということである。

IZ (Day 10)



IZ (Day 20)



SI テスト: SDSおよび運動がSI行動におよぼす影響

以上の結果を受け、NSAIDS によらない脳内 COX 活性を制御するメカニズムの解明として、全身運動 (トレッドミル走) によるストレス誘発痛の軽減効果を検討することとした。全身運動は脳神経系における炎症性応答を制御し、抗ストレス作用を示すことが知られている。以下の実験結果の概要を提示するとともに、成果は既に論文として公表した (PMID: 35842906)。

3) 社会的敗北ストレス (SDS) および運動が SI 行動 (不安を反映する) におよぼす影響

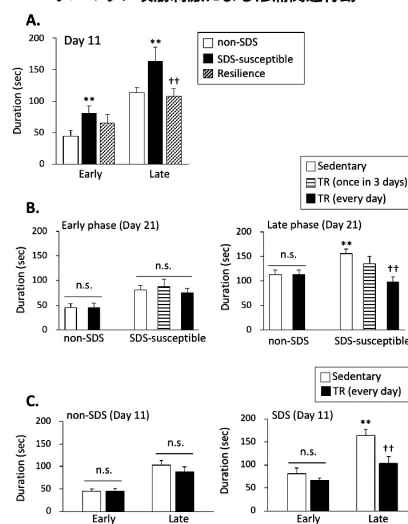
10 日間の SDS 処置は 82.1% のマウスにおいて Inter zone (IZ) 滞在時間を有意に短縮した。以上の所見は、我々が実施した社会的敗北ストレスは、他施設からの報告同様、マウスを心理的なストレス状態を引き起こすことを示した (右上図参照)。

4) SDS および運動が Locomotor 行動、強制水泳処置における非水泳時間におよぼす影響

(1) 総移動量 (A): SDS 処置を 10 または 20 日間で有意に短縮した。一方、トレッドミル運動を毎日実施した場合、低下した移動距離が Day 0 レベルまで回復した。以上の所見は、過去の報告と一致していた。

(2) Rearing 回数: SDS10 または 20 日間で有意に減少した。トレッドミル運動群を毎日実施しても、Day 0 レベルまで回復しなかった。rearing 行動が心理ストレス状態で低下するという所見は、過去の報告と一致していたが、トレッドミル走による改善効果は見られなかった。その理由は不明であるが過去の報告によると、心理ストレス状態をより反映する指標として rearing する場所 (壁際、中央) の違いが報告されている。この点が

ホルマリン咬筋刺激による疼痛関連行動



トレッドミル走の効果を eliminate した可能性がある。

(3) 非水泳時間: SDS10 または 20 日間で有意に延長した。一方、トレッドミル運動群では毎日実施した場合、Day 0 レベルまで低下した。非水泳時間を指標とする負の心理評価は議論の余地があるものの、過去の報告と同様の結果ではあった。

(4) レジリエンス群において、SDS 処置 (10 日間) の影響を評価した。いずれの負の情動行動も非ストレス群と同様であった。つまりレジリエンス群は SDS 処置を受けても負の心理状態にはなっていないことが示された。

5) SDS および運動が咬筋ホルマリン誘発疼痛関連行動におよぼす影響。

A 10 日間の SDS 処置は、ストレス感受性群において、咬筋疼痛関連行動を Early phase, Late phase で有意に延長した。両 Phase で変化を認めたとすることは、SDS 処置による咬筋侵害応答の増大は、末梢および中枢神経系の療法のメカニズムが変調していることを示唆する。一方、レジリエンス (ストレス耐性群) では有意な変化を認めなかった。

B: SDS 感受性群、非ストレス群を用い、トレッドミル走を用いた身体的運動を 10 日間 (10 m/分、30 分)、実施し、Day 21 に咬筋ホルマリンテストを実施した。ストレス群ではトレッドミル走を毎日、実施した群において、咬筋疼痛関連行動時間が有意に短縮していた。さらにトレッドミル走は Late phase でのホルマリン行動を軽減させたことから、運動療法によるストレス誘発性の咬筋疼痛関連行動の抑制は中枢機構への介入が示唆される。一方、運動の頻度を 3 日に 1 回と減らした場合、運動効果は認められなかった。非ストレス群ではトレッドミル走は、非運動群とくらべ、咬筋疼痛関連行動時間に有意な差を認めなかった。

C: トレッドミル走の咬筋痛の予防効果について検討した。SDS 処置実施直後にトレッドミル走 (10 m/min, 30 min、傾斜なし) を、10 日間、実施し、Day 11 に咬筋ホルマリンテストを実施した。ストレス処置群において、トレッドミル走実施群では、咬筋疼痛行動は有意に短縮した。一方、非ストレス群では、運動の有無間

非ストレス ストレス
COX2

図2. ストレスは、VcでのCOX2タンパク発現を増大させる。

で、有意差は見られなかった。一方、本課題は SDS 処置を受けたマウスにはレジリエンス個体を含む可能性がある点である。以上の結果から、少なくとも社会的敗北ストレス状態では咬筋の痛み関連行動は増大すること。次にトレッドミル走による全身運動療法はストレスが誘発する咬筋痛を軽減すること、また痛みの軽減効果は運動療法の回数に依存する可能性があること、などが明らかになった。

本課題の主たるテーマである中枢神経系の COX 活性に関して、運動療法による影響については現状、検討中である。一方、図に示す様にストレスモデルでは COX2 タンパクの増大が見られたこと、さらにトレッドミル走が三叉神経脊髄路核尾側亜核領域における神経興奮を抑制することから、全身運動療法が、COX カスケードの機能に介入し、抑制作用を示す可能性は高い。以上、NSAIDs を対象とする実験デザインでは期待される成果を得られなかったものの、より日常的かつ簡便な運動療法という身体的活動が、結果的に NSAIDs の作用分子機構の調節効果をもたらすという点で、期待していた以上の成果が得られたものと考えられる。

引用文献:

以上の研究成果は以下の論文にて公表した。

Mana Hasegawa, Kajita Piriyaprasath, **Masanori Otake**, Rantaro Kamimura, Isao Saito, Noritaka Fujii, Kensuke Yamamura, Keiichiro Okamoto.

Effect of daily treadmill running exercise on masseter muscle nociception associated with social defeat stress in mice

Eur J Oral Science. 2022 Aug;130(4):e12882.doi: 10.1111/eos.12882.

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hasegawa Mana, Piriyaarasath Kajita, Otake Masanori, Kamimura Rantaro, Saito Isao, Fujii Noritaka, Yamamura Kensuke, Okamoto Keiichiro	4. 巻 130
2. 論文標題 Effect of daily treadmill running exercise on masseter muscle nociception associated with social defeat stress in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/eos.12882	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mana Hasegawa, Masanori Otake, Rantaro Kamimura, Isao Saito, Noritaka Fujii, Kensuke Yamamura, Keiichiro Okamoto
2. 発表標題 Inhibitory effects of daily treadmill running on masseter muscle hyperalgesia under psychosocial stress conditions in male mice
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会（Web開催）
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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