

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17044

研究課題名（和文）口腔顔面痛モデルにおけるグリア細胞機能抑制による鎮痛メカニズムの解明

研究課題名（英文）Pain reduction mechanism by suppressing glial cell function in orofacial pain model

研究代表者

岩浅 匠真（IWASA, Takuma）

徳島大学・病院・診療支援医師

研究者番号：80761428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：痛み伝達に関連しているカルシトニン遺伝子関連ペプチド（CGRP）を全身麻酔下のラット三叉神経節に直接投与したところ、口腔顔面痛が生じることが理解できた。CGRP投与前に抗菌薬であるミノサイクリンを三叉神経節に投与したラットでは痛み行動の改善が観察された。また、CGRPの三叉神経節への直接投与により神経細胞周囲のサテライトグリア細胞機能の活性化が観察された。三叉神経節にCGRPを直接投与した口腔顔面痛モデルでは、NF- β シグナル関連のmRNAの発現量の変化が観察され、ミノサイクリンの前処理により、コントロールに近くなることが観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、口腔顔面痛モデルの三叉神経節におけるサテライトグリア細胞機能抑制による鎮痛効果メカニズムの解明と治療法の基盤形成ができたと感じられる。具体的には以下のことが解明された。(1)口腔顔面痛動物モデルにおけるサテライトグリア細胞内NF- β シグナル伝達変化、(2)口腔顔面痛モデルの三叉神経節へのサテライトグリア細胞機能抑制薬投与による痛み行動の変化、(3)サテライトグリア細胞機能抑制によるNF- β シグナル伝達変化などである。これにより、口腔顔面痛の新規治療法開発の足掛かりになったと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Calcitonin gene-related peptide (CGRP), which is associated with pain transmission, was administered directly to the trigeminal ganglion of rats under general anesthesia and was understood to produce orofacial pain. Improvement in pain behavior was observed in rats in which the antimicrobial drug minocycline was administered to the trigeminal ganglia before CGRP administration. In addition, activation of satellite glia cell function around neurons was observed after direct administration of CGRP to the trigeminal ganglion. In orofacial pain model in which CGRP was administered directly to the trigeminal ganglion, changes in NF- β signaling-related mRNA expression were observed, which were observed to be close to control levels after pretreatment with minocycline.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：カルシトニン遺伝子関連ペプチド 痛み行動 三叉神経節 サテライトグリア細胞 炎症性サイトカイン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

[臨床の問題点]

局所に原因を認めない難治性口腔顎顔面痛は補綴歯科医師の多くが経験する。現状では理学療法や投薬などの治療が行なわれているが、それらは対症療法であり、根本的に神経細胞機能をブロックするような治療法が開発されているわけではない。口腔顔面痛は補綴歯科を受診する高齢者において顕著であり、治療法が開発が強く求められている。

[現状の問題点]

神経細胞周囲に存在するグリア細胞の情報伝達への関与が近年報告されている(Ceruti et al. J Neurosci 2011, Marinelli et al. PLoS One 2012)が、三叉神経節細胞にはシナプスは存在していないことから、神経節細胞への神経伝達物質の関与は懐疑的であった。そのため、神経節細胞とサテライトグリア細胞の相互作用に関しては研究が進んでいない。また、三叉神経節サテライトグリア細胞内シグナル伝達に関しても、注目されていなかったため、研究は進んでいない。

以上から、口腔顔面痛モデルの三叉神経節内におけるサテライトグリア細胞のシグナル伝達、サテライトグリア細胞機能抑制による痛み軽減の解析は痛み治療の開発に向けての重要課題である。

2. 研究の目的

本研究では、口腔顔面痛モデルの三叉神経節におけるサテライトグリア細胞機能抑制による鎮痛効果メカニズムの解明と治療法の基盤形成を目的とする。具体的には、(1)口腔顔面痛動物モデルにおけるサテライトグリア細胞内 NF- κ B シグナル伝達変化、(2)口腔顔面痛モデルの三叉神経節へのサテライトグリア細胞機能抑制薬投与による痛み行動の変化、(3)サテライトグリア細胞機能抑制による NF- κ B シグナル伝達変化を解明し、口腔顔面痛の新規治療法開発のための基盤となる情報を発信する。

3. 研究の方法

[口腔顔面痛動物モデルの痛み行動解析とサテライトグリア細胞内 NF- κ B シグナル伝達変化解析]

三叉神経節サテライトグリア細胞内の興奮が NF- κ B シグナル伝達を介しているのかを調査した。5週齢 SD 系雄性ラットを用い、Neubert らの方法 (Neubert et al. Pain 2005) に従って痛みの行動解析を行った。痛み伝達に関連しているカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) を全身麻酔下のラット三叉神経節に直接投与し、回復後に口腔顔面痛評価装置 (Stoelting 社製オロフェイシャル・ペイン評価装置) を用いて評価した。痛み行動の評価はラットが顔面部皮膚を 36、45、7 の金属チューブに当てて飲水することにより、電流の導通が生じ、接触時間をコンピュータに記録することが可能であった。本装置を用いての痛み行動が観察される場合、金属チューブへの顔面部の接触時間が短くなることが報告されている。CGRP 投与直後、6 時間後、24 時間後の痛み行動を観察した。

サテライトグリア細胞機能の活性を確認するために、Glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現量上昇を活性化の指標とした。具体的には、三叉神経節を摘出後、組織切片を作製し、免疫染色により観察した。研究代表者の過去の研究では神経障害性疼痛モデルラットにおいて陽性反応が観察された (Iwasa et al. Neurosci Lett 2019)。別の実験では三叉神経節を摘出し、コラゲナーゼなどにより分離後、継代培養することにより、神経細胞が死滅し、サテライトグリア細胞などの非神経細胞のみの培養を行った。培養細胞に CGRP を投与し、12 時間後に PCR array により、NF- κ B シグナル関連の mRNA (Myd88 など 84 遺伝子) の発現量の変化を観察することで、NF- κ B シグナル伝達の詳細を調査した。

[口腔顔面痛モデルの三叉神経節へのサテライトグリア細胞機能抑制薬直接投与による痛み行動の変化解析]

ミノサイクリンはテトラサイクリン系抗菌薬であるが、サテライトグリア細胞機能を抑制することが報告されている (Huang et al. J Neuroinflammation 2014)。全身麻酔下のラットに対して CGRP 投与前にミノサイクリンを三叉神経節に投与し、全身麻酔からの回復後に CGRP 単独投与により生じる痛み行動が軽減されるかどうかを観察した。サテライトグリア細胞機能の活性化は三叉神経節を摘出後、サテライトグリア細胞における GFAP 発現を免疫染色により観察した。

[サテライトグリア細胞機能抑制による NF- κ B シグナル伝達変化解析]

全身麻酔下において、ラット三叉神経節を摘出し、分離培養したサテライトグリア細胞などの非神経細胞にミノサイクリンと CGRP を投与した。12 時間経過後に PCR array により、NF- κ B シグナル関連の mRNA (Myd88 など 84 遺伝子) の発現量の変化を観察した。ミノサイクリンの投与

は CGRP 投与前に実施した。ミノサイクリン非投与の実験結果と比較することにより、サテライトグリア細胞が興奮すると NF- κ B シグナルのどの部位が活性化しているのかが理解でき、口腔顔面痛と NF- κ B シグナルの活性部位の関連性を把握することができる。

4. 研究成果

痛み伝達に関連している CGRP を全身麻酔下のラット三叉神経節に直接投与したところ、CGRP の三叉神経節への直接投与により、CGRP 投与 6 時間後に口腔顔面痛が生じることが理解できた。CGRP 投与前にミノサイクリンを三叉神経節に投与したラットでは痛み行動の改善が観察された。痛み行動の評価はラットが顔面部皮膚を 37、45、10 の金属チューブに当てて飲水する接触時間を機械的に記録することにより実施し、45 において有意差が観察された。痛み行動が観察されたラットでは、金属チューブへの顔面部の接触時間が短くなった。CGRP 投与直後、6 時間後、24 時間後の痛み行動を観察し、6 時間後、24 時間後において有意差が観察された (図 1、2)。

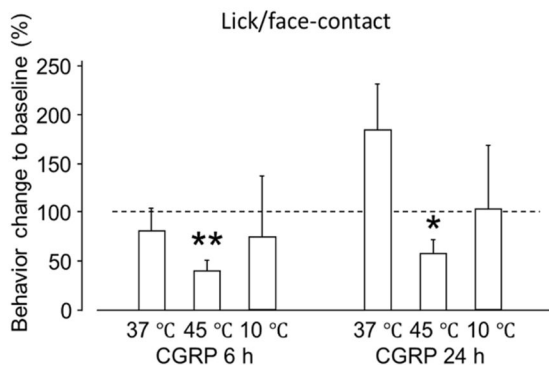


図 1 CGRP 投与後の痛み増強 1

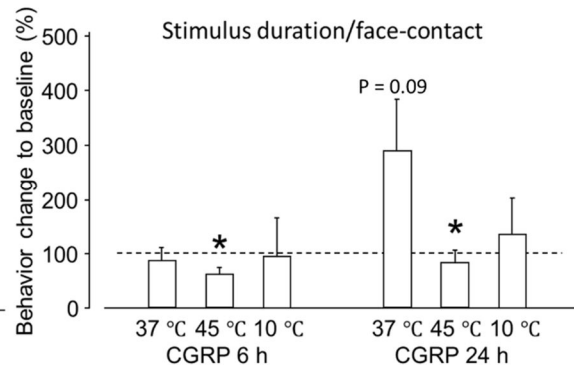


図 2 CGRP 投与後の痛み増強 2

CGRP の三叉神経節への直接投与後のサテライトグリア細胞機能の活性を確認するために、三叉神経節を摘出後、組織切片を作製し、免疫染色により、GFAP の発現量上昇を確認したところ、GFAP の活性化が確認され、サテライトグリア細胞機能の活性化が理解できた。また、CGRP 投与により上昇した GFAP の活性が、ミノサイクリン投与により軽減することが観察された (図 3、4)。

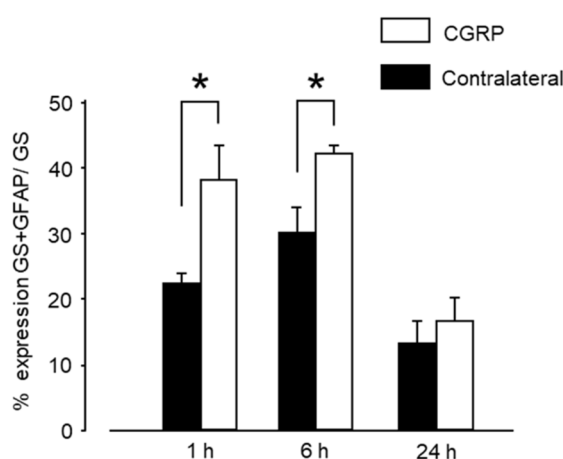


図 3 CGRP 投与後のサテライトグリア細胞の活性化

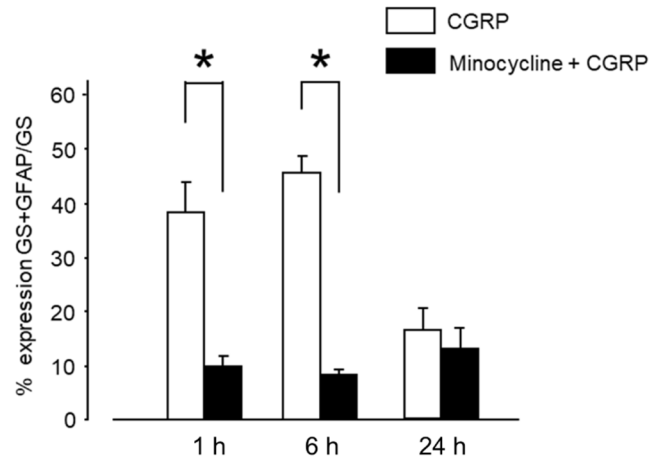


図 4 ミノサイクリン投与後のサテライトグリア細胞の活性化軽減

三叉神経節に CGRP を直接投与した口腔顔面痛モデルでは、NF- κ B シグナル関連の mRNA (Egr1、Myd88 など) の発現量の変化が観察され、Egr1 の減少と Myd88 の増加が観察された。また、ミノサイクリンの前処理により、サテライトグリア細胞における Egr1 の増加と Myd88 の減少が観察された。加えて、CGRP の投与により、切断 Casp3 の増加が観察され、ミノサイクリンの前処理により、サテライトグリア細胞における切断 Casp3 発現の減少が観察された。これは、サテライトグリア細胞が NF- κ B シグナル伝達経路を介して三叉神経節における CGRP による神経免疫相互作用に関与していることを示している。

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 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Raman Swarnalakshmi, Waskitho Arief, Raju Resmi, Iwasa Takuma, Ikutame Daisuke, Okura Kazuo, Oshima Masamitsu, Matsuka Yoshizo	4. 巻 23
2. 論文標題 Analgesic Effect of Tranilast in an Animal Model of Neuropathic Pain and Its Role in the Regulation of Tetrahydrobiopterin Synthesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 58-78
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23115878	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 松香芳三, 山本由弥子, S.Raman, 生田目大介, 岩浅匠真, 大倉一夫	4. 巻 16
2. 論文標題 口腔顔面痛に対するボツリヌス毒素効果メカニズム	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 日本口腔顔面痛学会雑誌	6. 最初と最後の頁 21-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------