

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2015

課題番号：24659932

研究課題名(和文)唾液由来鎮痛物質による新たな顎顔面領域の慢性疼痛制御理論の確立

研究課題名(英文) New theory for pain control in the maxillofacial regions by sialorphin, saliva-derived antinociceptive modulator.

研究代表者

庄司 憲明 (Shoji, Noriaki)

東北大学・大学病院・講師

研究者番号：70250800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、非定型歯痛、舌痛症および顎関節症などの慢性痛患者は増加傾向にあり社会問題になっている。本研究では近年発見されたモルヒネの約3～6倍の鎮痛効果があるとされる唾液由来鎮痛物質(シアロルフィン)の顎顔面領域における鎮痛効果を明らかにするために口髭部ホルマリンテストによる急性持続性疼痛モデルラットとの三叉神経第一枝を結紮して作製した神経結紮モデル(CCI: Chronic constriction Injury)ラットを用い実験を行った。その結果、シアロルフィンが急性痛および慢性痛に対し鎮痛効果を有する事が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Recently, patients with atypical tooth pain, glossodynia and temporomandibular disorder have been increasing and this phenomenon was recognized as social issues. This study was designed to determine whether sialorphin that displays analgesic activity can be effective for pain control in the maxillofacial regions both of the acute-pain model rats induced by formalin injection and of the chronic-pain ones induced by trigeminal (maxillary) nerve constriction. In conclusion, sialorphin had inhibitory effect both on the formalin-induced acute pain and on the chronic pain induced by nerve constriction.

研究分野：口腔内科学

キーワード：シアロルフィン 急性痛 慢性痛

1. 研究開始当初の背景

最近、非定型歯痛、舌痛症および顎関節症などの慢性(疼)痛患者は増加傾向にあり社会問題となっている。しかしながら、慢性疼痛に対する治療法は確立されておらず、診断および治療法の開発は急務であり責務である。2003年パスツール研究所の研究者により、ラット唾液からモルヒネの約3~6倍の鎮痛効果があるシアロルフィンが発見された(PNAS 2003, 100, 8549-58)。シアロルフィンは、nepirylisinという酵素を抑制することにより痛覚刺激後の内因性エンケファリン(麻薬様物質オピオイドの1種)の放出を増強させ鎮痛効果をもたらす事が動物実験から明らかにされている。さらに、2006年11月、ヒト唾液内からシアロルフィンと同様の鎮痛作用を持つオピオルフィンが発見された(PNAS 2006, 103, 17979-84)。これらの物質は、生体(唾液)から発見されたため精神的・身体的依存などの副作用が少なく、慢性(疼)痛制御を目的とした臨床応用が期待できる。しかしながら、いまだこれら唾液由来の鎮痛物質が慢性(疼)痛にどのような効果をもたらすかについては明らかにされていない。また、上記論文では鎮痛効果の評価はラットの行動薬理学的評価であり、疼痛そのものを評価していない等の問題がある。シアロルフィンおよびオピオルフィンを臨床に応用するためには、鎮痛効果の判定(定量)が不可欠である。

我々はこれまでの研究で、視床下部 CRF (Corticotropin Releasing Factor) 遺伝子、下垂体 POMC (proopiomelanocortin) 遺伝子(以上、ストレス関連遺伝子)、三叉神経節 P2X4 レセプター遺伝子(慢性疼痛原因遺伝子)がラット舌痛刺激による痛みストレスマーカーになることを発見した(科学研究費基盤研究C、課題番号 18592066、2006~2008年; 課題番号 19592401、2007~2009年)。よって、これら遺伝子の発現を定量することにより、分子生物学的にシアロルフィンとオピオルフィンの鎮痛効果を定量的に評価することが可能な状況にある。

2. 研究の目的

本研究では、最近唾液から発見されたモルヒネの約3~6倍の鎮痛効果をもつとされるシアロルフィンに着目し、急性痛および慢性痛ラットモデルにおける鎮痛効果について、疼痛行動、逃避行動およびストレスマーカーの遺伝子発現を指標として客観的に評価する事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) シアロルフィンが急性痛に及ぼす影響について

急性痛モデルの作製

急性持続性疼痛モデルを作成するために Wister 系雄ラット(8-9週齢、体重 270-320g)を用い、1977年に David Dubujasson が確立

したテストホルマリンテストを行った。すなわち 1.5%ホルマリン 50µl をラット口髭部に注射し自発痛によって生じる疼痛行動(頬部を手や足で引っ掻く回数で評価)を解析した。

シアロルフィンが急性痛に及ぼす影響

シアロルフィン(100µg/kg:総量を 300µl)をラット尾静脈に注射し後、1.5%ホルマリン 50µl を頬部に注射し、その後2時間の疼痛行動を5分間隔で観察した。

(2) シアロルフィンが慢性痛に及ぼす影響について

慢性痛モデルの作製

ラット飼育 Wister 系雄ラット(8-9週齢、体重 270-320g)を用い、実験前は自由飲用水、12h/12h 明暗サイクル下に飼育した。ラットの三叉神経第 3 枝を露出後、Chronic gut にて結紮し、神経結紮モデル(CCI: Chronic constriction Injury)を作製した。神経結紮モデルの完成は、結紮した三叉神経第 3 枝領域をタッチテストフィラメント(Von Frey 刺激測定器)にて一定の圧力をかけたとき、明らかに後方への逃避行動が得られた場合と定義した。

シアロルフィンが慢性痛に及ぼす影響

慢性痛モデルにシアロルフィン 100µg/kg を注入し、逃避閾値および視床下部 CRF 遺伝子、下垂体 POMC 遺伝子発現を指標にしてシアロルフィンの鎮痛効果を検討した。

視床下部 CRF 遺伝子、下垂体 POMC 遺伝子発現の発現解析

神経結紮モデルの PVN および下垂体組織を Trizol-chloroform 法(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)にて total RNA を抽出し、random hexamer primer および Transcriptor First Strand cDNA Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)を用いて cDNA を作製した。その後、LC FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Molecular Biochemicals) と各ストレス物質(CRH hnRNA, CRH mRNA および POMC mRNA)の各プライマー(表1)を用いて、LightCycler system (Roche Diagnostics, Japan)で real time PCR 解析を行った。

表1 プライマーのシーケンス

	Forward primer 5'-3'	Reverse primer 5'-3'	Product size
CRH mRNA	TACCTCGAGAACAAACAGTG	ACAGAGCCACCAGCAGCAT	111bp
CRH hnRNA	GCTCGACCATATGAAGCTTT	AAGGTGGGGAGAGAGGTAA	159bp
POMC mRNA	TGCTTCAGACCTCCATAGAC	GGCTGTTCATCTCCGTTG	157bp
GAPDH mRNA	TGAACGGGAAGCTCACTGG	TCCACCACCTGTGCTGTA	307bp
β actin hnRNA	GTGTTTGACAGTCGATATCCC	GCCATCAAAGCGTGATTGTA	195bp

尚、internal control(内部標準)は actin (hnRNA) および GAPDH (mRNA) とし、全てのプライマーは、Primer3 にて設計して、homology 検索をおこなった。表 2 に PCR 増幅条件を示す。

表 2 LightCycler の PCR 条件

Gene	Program real-time LightCycler*	Denaturation			Annealing			Elongation			Melting	
		Temperature (°C)	Incubation time (s)	Temperature transition rate (°C/s)	Temperature (°C)	Incubation time (s)	Temperature transition rate (°C/s)	Temperature (°C)	Incubation time (s)	Temperature transition rate (°C/s)	Temperature (°C)	Incubation time (s)
CRH mRNA	Temperature (°C)	95	65	72	95.0	70.						
	Incubation time (s)	10	10	6	0.0	15.						
	Temperature transition rate (°C/s)	20	20	20	20.0	20.						
CRH hnRNA	Temperature (°C)	95	62	72	95.0	70.						
	Incubation time (s)	10	10	7	0.0	15.						
	Temperature transition rate (°C/s)	20	20	20	20.0	20.						
POMC mRNA	Temperature (°C)	95	62	72	95.0	70.						
	Incubation time (s)	10	10	7	0.0	15.						
	Temperature transition rate (°C/s)	20	20	20	20.0	20.						
GAPDH mRNA	Temperature (°C)	95	62	72	95.0	70.						
	Incubation time (s)	10	10	9	0.0	15.						
	Temperature transition rate (°C/s)	20	20	20	20.0	20.						
β actin hnRNA	Temperature (°C)	95	60	72	95.0	70.						
	Incubation time (s)	10	10	7	0.0	15.						
	Temperature transition rate (°C/s)	20	20	20	20.0	20.						

(3) 統計処理

慢性痛モデル (CCI: Chronic constriction injury) の逃避閾値実験において、生食群およびシアロルフィン群の経時的变化の有意差検定を、ANOVA にて分散分析を行った後、Dunnett test による多重比較検定にて行った。また、生食群およびシアロルフィン群における CCI14 日後の逃避閾値の有意差検定は、F test の後、paired T test を用いて行った。有意水準はいずれも 5% 未満とした。なお、統計ソフトは Stat View 5.0 (SAS Institute Japan, Tokyo, Japan) を用いた。

4. 研究成果

(1) シアロルフィンが急性痛に及ぼす影響について

疼痛行動による評価

急性痛モデルにおいて、ホルマリン注射後の疼痛行動(引っ掻き行動)を5分間隔で経時的に観察した結果(図1赤線) 5-10分と30-35分の時間帯に回数が増加した。前者はホルマリンによる第1相の疼痛と、後者は第2相の疼痛に対する疼痛行動と一致していた。シアロルフィンが急性痛に及ぼす影響を確認するために、シアロルフィンをラットに尾静脈に注入し、その5分経過後に1.5%ホルマリン50μlを頬部に注射したラットの疼痛行動を観察したところ(図1青線) コントロール(生食注入ラット)に見られたホ

ルマリンによる第1相および第2相の疼痛行動が共に抑制された。以上よりシアロルフィンでは顎顔面部に注射されたホルマリンによる急性痛に対し鎮痛効果を有することが示唆された。

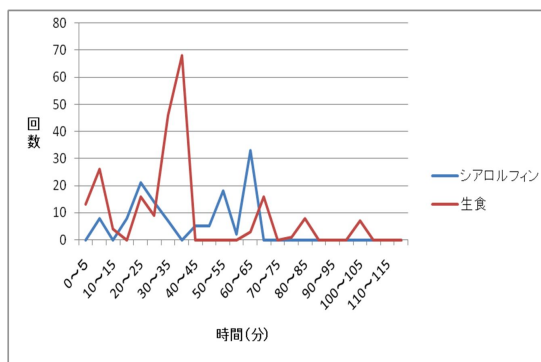


図1 シアロルフィンがホルマリン注入による急性痛に及ぼす影響

図2は、図1でみられた疼痛行動を累積の回数として表した結果で、シアロルフィンは2時間に惹起された急性痛に対し明らかな抑制効果(総和の約45%抑制)を有することが判明した。

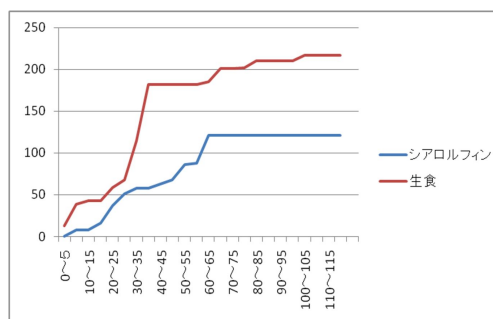


図2 図1の疼痛行動の累積回数

(2) シアロルフィンが慢性痛に及ぼす影響

慢性痛モデル (CCI) における眼窩下神経 (三叉神経第 3 枝) の結紮後の逃避閾値の変化

眼窩下神経結紮により約3日でフォンフレイ線維を用いた機械的刺激による逃避閾値は低下し、その後14日まで持続した(図3)。

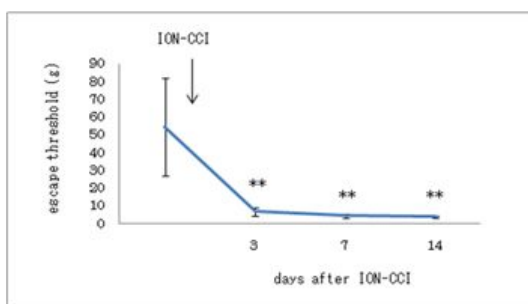


図3 慢性痛モデルにおける眼窩下神経の結紮後の逃避閾値の変化

シアロルフィンが慢性痛の逃避閾値に及ぼす影響

図4に示すように、CCI 14日後に見られた逃避閾値は $3.8 \pm 0.89\text{g}$ であった。一方、シアロルフィンの注入により逃避閾値は $15.8 \pm 8.5\text{g}$ に上昇した。以上よりシアロルフィンは慢性痛に対し鎮痛効果を有することが示唆された。

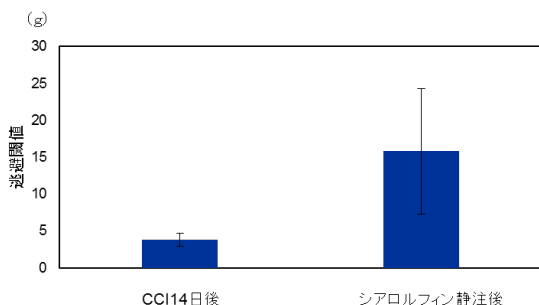


図4 シアロルフィンが慢性痛の逃避閾値に及ぼす影響

視床下部 CRF 遺伝子、下垂体 POMC 遺伝子発現の発現解析

1) CCI が視床下部 CRF 遺伝子、下垂体 POMC 遺伝子発現に及ぼす影響

CCI モデルにおいて、PVN の CRH hnRNA 発現に変化はなかったが、CRH mRNA 発現は約 200% に下垂体の POMC mRNA は約 250% に増加した。この結果より CCI による慢性痛のストレスは視床下部-下垂体-副腎系の賦活によるストレス応答を惹起することが示唆された。

2) シアロルフィンが視床下部 CRF 遺伝子、下垂体 POMC 遺伝子発現に及ぼす影響

CCI 14 日後の慢性痛ラットにシアロルフィン ($100 \mu\text{g}/\text{kg}$) を注入し、1 時間後に視床下部 PVN および下垂体を摘出し CRH hnRNA、CRH mRNA および POMC mRNA 発現を検討した結果、CRH hnRNA 発現に変化はなかったが、CRH mRNA 発現は約 50% に、下垂体の POMC mRNA は約 40% に減少した。この結果よりシアロルフィンは CCI による慢性痛のストレス応答を軽減することが示唆された。

以上より、唾液由来鎮痛物質であるシアロルフィンは急性痛および慢性痛に対し鎮痛効果を有する事が示唆された。また、慢性痛モデルの疼痛レベルを知るために PVN の CRH mRNA および下垂体の POMC mRNA 発現が指標となることが示唆された。

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 3 件)

Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K. Involvement of peripheral artemin

signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. Pain. 2015 Dec;156(12):2528-37. 査読有 doi: 10.1097/j.pain.0000000000000322. Endo Y, Shoji N, Shimada Y, Kasahara E, Iikubo M, Sato T, Sasano T, Ichikawa H. Prednisolone induces microglial activation in the subnucleus caudalis of the rat trigeminal sensory complex. Cell Mol Neurobiol. 2014 Jan;34(1):95-100. 査読有 doi: 10.1007/s10571-013-9990-z. Sato T, Fujita M, Kano M, Hosokawa H, Kondo T, Suzuki T, Kasahara E, Shoji N, Sasano T, Ichikawa H. The Distribution of Transient Receptor Potential Melastatin-8 in the Rat Soft Palate, Epiglottis, and Pharynx. Cellular and Molecular Neurobiology. 33, 161-165, 2013. 査読有 doi: 10.1007/s10571-012-9888-1.

[学会発表](計 1 件)

佐々城 真、飯久保正弘、下里 舞、笹野高嗣 咬筋における筋疲労と浮腫性変化の関連に関する研究 第 54 回 NPO 法人日本歯科放射線学会 (2013 年 6 月 2 日 福岡県立ももち文化センター (福岡))

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

庄司 憲明 (SHOJI, NORIAKI)

東北大学・病院・講師
研究者番号：70250800

(2)研究分担者

笹野 高嗣 (SASANO, TAKASHI)
東北大学歯学研究科(研究院)・教授
研究者番号：10125560

杉本 是明 (SUGIMOTO, KOREAKI)
東北福祉大学・総合福祉学部・教授
研究者番号：30361158

小嶋 郁穂 (SASANO, TAKASHI)
東北大学歯学研究科(研究院)・助教
研究者番号：80447169

(3)連携研究者

()

研究者番号：