

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462856

研究課題名(和文) Toll様受容体に注目した三叉神経領域の病態痛発生メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis pain mechanism in the trigeminal nerve area with a focus on Toll-like receptor

研究代表者

渡邊 峰朗 (Watanabe, Mineo)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80325183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Toll-like receptor 4(TLR4)、炎症性サイトカイン及び細胞内シグナル伝達系に着目して、オトガイ神経切断後の顎顔面領域異所性疼痛の発症メカニズムの解明を行った。また、ウシ由来ラクトフェリンによる顎顔面領域異所性疼痛への応用についても検討した。オトガイ神経切断後、小膠細胞TLR4活性化後がp38 MAPK細胞内伝達を駆動し、これにより誘導されIL-18がオトガイ神経切断後の異所性疼痛に重要な役割を果たすことが示唆された。また、ウシ由来ラクトフェリンは、p38 MAPKのリン酸化とIL-18の産生を抑制し、鎮痛効果を発揮すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pathogenic mechanism of extra-territorial facial pain induced by the mental nerve transection were clarified by focusing on Toll-like receptor 4 (TLR4), inflammatory cytokines and intracellular signaling system. In addition, it was also studied bovine lactoferrin application to the extra-territorial facial pain. IL-18 induction via TLR4-derived p38 MAPK signaling pathways in microglia might play an important role in mental nerve transection-induced extra-territorial pain. Further, bovine lactoferrin suppresses the production of the phosphorylation of p38 MAPK and IL-18, and may exert an analgesic effect.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：口腔解剖学 病態痛

## 1. 研究開始当初の背景

癌性疼痛や歯髄炎症疼痛などのように、「痛み」が激しく長期継続している場合は、「痛み」が警告としての意味を失い、「痛み」自身が病態（病態痛）となる場合がある。このような病態痛は通常の鎮痛薬の効果が少ないことに加え、その発生メカニズムは不明な点が多い。

脳内の小膠細胞は、神経変性疾患・神経損傷時に活性化され、神経の機能維持や損傷修復に働く因子を産生する反面、NO や炎症性サイトカインを過剰産生することにより神経傷害的にも働くことが知られている。近年、小膠細胞は ATP 受容体、Toll 様受容体など様々な受容体が発現し、病態痛時にこれらの受容体にリガンドが結合すると炎症性サイトカインなどの様々な分子を遊離するという報告が増加しており、神経免疫と病態痛は注目されている分野である。小膠細胞から放出された様々な分子が、ニューロン、星状膠細胞、小膠細胞自身の活性化に関与して病態痛を引き起こすとも報告されているが、まだ検討すべき点は多く残されている。このような背景のもと、申請者はこれまでに中枢神経の神経膠細胞が産生する炎症性サイトカインに注目して、免疫組織化学、疼痛逃避行動試験、薬理学的手法などを用いて、顎顔面領域における病態痛の発生メカニズムを解明してきた (Guo, Watanabe et al. Stem cells 2011)。

Toll 様受容体は細胞表面にある受容体で、細菌表面のリポ多糖 (LPS) などを感知して自然免疫を作動させる。興味深いことに、髄腔内に LPS を注入すると小膠細胞の活性化と痛覚過敏が認められ、Toll 様受容体ノックアウトマウスでは神経因性疼痛が抑制されることが報告されている。しかし、Toll 様受容体が

病態痛を引き起こす具体的なメカニズムは解明されていない。Toll 様受容体活性化後、小膠細胞から放出された分子が、二次ニューロン・星状膠細胞・小膠細胞自身に作用すると推測されるが詳細は不明である。すなわち、Toll 様受容体をターゲットにした臨床応用への展開については検討することが多い。

本研究計画は小膠細胞に発現する Toll 様受容体のまだ解明されていない基礎研究を完成し、Toll 様受容体に着目した病態痛治療薬への臨床応用に展開するための基盤研究を行う。研究を進めるうえで、申請者は次のような予備的な研究結果を得ている。

咬筋炎症後、三叉神経脊髄路核において、IL-1、IL-6、TNF- $\alpha$ 、MCP-1、CINC-2, 3、TIMP-1 が増加することを報告した (Watanabe et al. Neuroscience Letters 2005)。

咬筋炎症後、星状膠細胞から分泌された IL-1 がニューロンの NMDA 受容体をリン酸化し、病態痛を引き起こしていることを見出した (Guo, Watanabe et al. J Neurosci 2007)。

オトガイ神経を切断すると、髭部皮膚に異所性病態痛を発症し、この異所性病態痛に IL-1 が関与していることを示した (Takahashi, Watanabe et al. European J Pain 2010)。

末梢神経傷害後、小膠細胞に発現する P2X<sub>7</sub> 受容体 (ATP 受容体) にリガンドが結合し、p38 MAPK がリン酸化され TNF- $\alpha$  放出量が増加し、これが神経因性疼痛を誘発していることを初めて報告した (Ito, Watanabe et al. European J Pain 2012)。

初代培養小膠細胞で、LPS による炎症性サイトカインの誘導が Cytokine Antibody Array (34 種類のサイトカ

イン検出が可能 ; Abcom, Cambridge, MA) により確認された (未発表)。髄腔内に LPS を注入すると三叉神経脊髄路核における小膠細胞のみでなく、星状膠細胞と二次ニューロンも活性化され、顔面領域の痛覚過敏が認められた (未発表)。

さらに、研究代表者は、ラクトフェリンにも注目した。ラクトフェリンは、母乳、涙、汗、唾液など外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパクで、ウシ由来ラクトフェリン (BLF) はウシの乳から精製される。BLF は多様な生物学的作用を持ち、とりわけ抗炎症作用についてはよく知られている。近年、BLF は細胞内に LRP1 を介して内分泌され、内在タンパクである TRAF6 と結合することで、MAPK p38 伝達経路、NF B p65 伝達経路のリン酸化を阻害することで、炎症性サイトカインの分泌を抑制し、抗炎症作用を発揮することが報告された。

## 2 . 研究の目的

本研究は、小膠細胞 Toll 様受容体に注目して病態痛発生メカニズムを解明し、病態痛の治療応用へと展開する研究基盤を確立することが目的とした。さらに、BLF の髄腔内投与が、慢性疼痛での炎症性サイトカインの分泌抑制を、細胞内シグナル伝達を阻害することによって誘導し、慢性疼痛抑制効果を持つのではないかと仮定し行った。

## 3 . 研究の方法

実験動物として、8 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。麻酔下にて左側オトガイ神経を切断し (MNT)、異所性疼痛を誘導した。また、薬剤を髄腔内投与するため PE-tube を髄腔内に留置した。疼痛閾値の評価には、von Frey filament を用いて wisker pad を刺激する機械的疼痛逃避行動試験を行った。MNT 後、異所性疼痛が発現したラッ

トの左側三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) において、24 時間、3 日、1 週間、3 週間、6 週間後の各タイムポイントで、p-p38、p-p65、IL-18 の発現と LRP1 の発現を westernblot にて確認し、異所性疼痛発現と一致した発現増加が認められた。その後、BLF (200  $\mu$ g/rat)、対照群に saline と albumin を髄腔内投与し、疼痛抑制の効果を機械的逃避行動試験で、また p-IKKb、p-p65、p-p38、IL-18 についての発現変化をウエスタンブロット解析にて検討した。次に、NF B p65 阻害薬である Withaferin A (63  $\mu$ g/rat)、p38 阻害薬である SB203580 (10  $\mu$ g/rat)、IL-18 binding protein (BP) (2  $\mu$ g/rat)、TLR4 antagonist である LPS-RS (0.2  $\mu$ g/rat)、とそれぞれ対照群に saline を髄腔内投与し、同様に疼痛抑制効果を機械的逃避行動試験で、タンパク発現の変化をウエスタンブロット解析にて検討した。最後に、脳内での BLF が細胞内で TRAF6 に結合しているかを確認するために、BLF (200  $\mu$ g/rat) を髄腔内投与した間脳から延髄までの組織を用い、TRAF6 で免疫沈降を行った後、BLF の発現を検討した。

## 4 . 研究成果

MNT 後、24 時間から 6 週間の長期にわたり、p-p65、p-p38、IL-18 は発現増加しており、LRP1 は全ての条件下で発現確認された。

MNT 後の BLF の髄腔内投与は、p-IKKb、p-p65、p-p38 MAPK、IL-18 の発現が saline、albumin 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。

MNT 後の withaferin A の髄腔内投与は、p-IKKb、p-p65、p-p38 MAPK、IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。MNT 後の SB203580 の髄腔内投与は

p-p38 MAPK, IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。

MNT 後の IL-18 BP の髄腔内投与は、IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。

MNT 後の LPS-RS の髄腔内投与は、p-IKKb、p-p65、p-p38 MAPK、IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し疼痛抑制効果を認めた。

BLF は髄腔内投与後、細胞内に取り込まれ TRAF6 と結合していることを確認した。

以上の結果より、MNT 後の異所性疼痛モデルラットに BLF を髄腔内投与すると、BLF は細胞内に取り込まれた後 TRAF6 と結合し、それによって TLR4 受容体活性により誘導された p38 MAPK のシグナル伝達を阻害することで、IL-18 の分泌増加を抑制し、慢性疼痛を抑制すると考えられた。BLF は将来的に異所性疼痛の有効な治療薬になりうる可能性が示唆された。

上記実験結果は新規性が高く、疼痛研究に与えるインパクトは大きいと考えられる。現在国際雑誌に投稿中である。

## 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0件)

[学会発表](計2件)

Kayo Horie, Mineo Watanabe, Chea Chanbora, Tetsuya Awada, Ryo Kunimatsu, Kyoko Murasaki, Takashi Takata, Takashi Uchida, Kotaro Tanimoto. Effects of bovine lactoferrin on extra-territorial facial pathological pain following a trigeminal nerve injury. Seventh International

conference Lactoferrin. 2-6 November 2015, Nagoya, Japan.

Mineo Watanabe, Kyoko Murasaki, Kayo Horie, Naoto Hirose, Shinji Hiyama, Kotaro Tanimoto, Takashi Uchida. P2X<sub>7</sub> receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain following a trigeminal nerve injury. Second congress on Pain. 27-30 March 2014, Taipei Taiwan.

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

渡邊 峰朗 (Mineo Watanabe)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80325183