

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462908

研究課題名(和文)顎顔面痛において性ホルモンがGABA機能に与える影響とそのメカニズムの解明

研究課題名(英文)Effect of estrogen on GABAergic inhibition of orofacial pain in female rats

研究代表者

田代 晃正 (TASHIRO, AKIMASA)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：60598118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節痛に代表される口腔顔面領域の慢性疼痛は女性に多く見られ、その原因の一つはエストロゲンによる疼痛処理機構の変調であるとされている。本研究では疼痛処理機構における、エストロゲンによるGABAを介した抑制機構の変調を明らかにし、慢性疼痛の性差発現メカニズムの一端を解明することを目的とした。その結果、エストロゲンにより三叉神経脊髄路核尾側垂核においてGABAを介した抑制機能が減少していることが明らかとなった。さらに本研究ではGABA放出機構と関連の深いとされている、mGluR1のエストロゲンの活性を明らかにし、mGluR1の活性によるGABA放出機能抑制の可能性を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Arthritis and musculoskeletal disorders, including temporomandibular joint disorder (TMD), are chronic pain conditions that occur more frequently in women of reproductive age than men. However, considerable evidence suggests that estrogen (E2) status plays a significant role. Although E2 acts GABAergic neurons to affect a wide range of functional pathways in the CNS, it is not known if E2 interact GABAergic activity in the brain regions that process nociceptive input from the TMJ. Recent studies indicated that E2-induced IPSC suppression depends on ER α - and mGluR1-dependent mobilization to decrease the probability of GABA release from inhibitory synaptic inputs. In present study we demonstrated that 1) E2 suppressed GABA(A) mediated inhibition 2)E2 acts mGluR1 dependent mechanism to enhance TMJ nociceptive processing by laminae I-II neurons in the medullary dorsal horn.

研究分野：口腔生理

キーワード：痛覚 エストロゲン GABA mGluR

1. 研究開始当初の背景

Temporomandibular disorder (TMD) は顎関節、咀嚼筋に関連する痛みとして表現され、若年女性に好発し、顕著な性差を有する。しかしながら、性差発現のメカニズムは未だ不明な点も多く、有効な治療法は確立されていない。これまで申請者は、顎関節から知覚神経の入力を受ける三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) と頸髄 (C1-2) の移行部 (Vc/C1-2) に存在する侵害受容ニューロン (TMJ ニューロン) の変調が顎関節痛のメカニズムを解き明かす上で重要と考え、その特性を調べてきた。顎関節痛の患者では全身的な疼痛閾値低下も観られ、疼痛抑制系の変調がこの病態の大きな特徴であると考えられる。しかしながら、疼痛抑制系変調のメカニズムについては未だ不明な点も多い。そこで本実験では、エストロゲンと関連が深いとされる、GABA 抑制機構の変調メカニズムを明らかにしていく。近年、海馬などの他領域において、内因性カンナビノイドや代謝型グルタミン酸受容体 (mGluR) の一種である mGluR 1 を介した逆行性シナプス伝達調節が報告されており、Vc/C1-2 においてもエストロゲン受容体が活性化することにより誘導される mGluR1 を介した GABA 抑制機構の変調が起こると予測される。

2. 研究の目的

1) エストロゲンによるGABA抑制機能の変調がTMJニューロンに与える影響を調べることで、ることでエストロゲンによる痛覚抑制システムの減弱を明らかにする。

2) GABA放出機構の変調に関与すると考えられているmGluR 1 のエストロゲンによる活性がTMJニューロンに及ぼす影響を調べることで、エストロゲンによる mGluRを介した痛覚処理機構の変調を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では卵巣摘出 (OVX) した後エストロゲン処置した雌ラットを用いる (高濃度エストロゲン処置群 HE; 20mg X 2days、低濃度エストロゲン処置群 LE; 2mg X 2days)。

(1) エストロゲンによる GABA_A 受容体を介した抑制機構の変調を解析する。電気生理学的手法を用い、Vc/C1-2 において顎関節から直接入力を受ける単一ニューロン (TMJ ニューロン) を同定(図1)。左側顎関節部への化学刺激 (1mM ATP, 20μl) によって発生する

neural activity が、GABA_A 受容体の作動薬 (muscimol 5-50μM) もしくは、拮抗薬 (BMI 5-50μM) の Vc/C1-2 への局所投与(図1)によりどのように変化するかを HE 群/LE 群で比較検討する。また、Western blots 法を用い Vc/C1-2 における GABA_A 受容体のタンパク量の測定、HE 群/LE 群で比較する。

(2) エストロゲンによるmGluR1及びmGluR5の活性化を明らかにする。

上記の電気生理学的手法を用い(図1)、TMJ ニューロンの興奮性が、mGluR1の拮抗薬 (CPCCOEt 50-500μM) 及び mGluR5の拮抗薬 (MPEP 50-500μM) の局所投与 (Vc/C1-2への) によりどのように変化するかをHE群/LE群で比較検討する。またqPCR法を用いVc/C1-2におけるmGluR1及び mGluR5のRNAを測定、HE群/LE群で比較する。

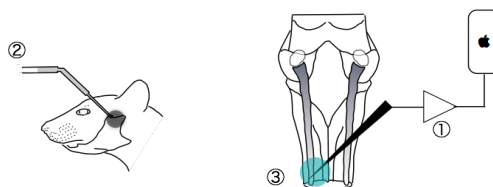


図1) *in vivo*標本におけるTMJニューロンの単一細胞外記録

- ①Vc/C₁₋₂よりTMJに応答するニューロン (TMJ ニューロン) を記録
- ②TMJをATP (1mM 20μl) で侵害刺激
- ③各種拮抗薬、作動薬をTopical application

4. 研究成果

1) エストロゲンによるGABA_A受容体を介した抑制機構の変調に関する研究

LE群において、BMI 投与によりATP-evoked responseのmagnitude やdurationは有意に増加したが、HE群においては変化が観られなかった(図2)。一方で、自発発火はエストロゲン処置に関係なく、両群で増加が観られた(図2)。作動薬の影響は両群においてATP-evoked responseのmagnitude やduration、自発発火は有意に減少したが、HE群においては5μMの muscimolでも効果が観られた。さらに、Vc/C1-2でのGABA_A受容体 (β3 isoform) のタンパクレベルをウエスタンブロッッド法により測定したところ、HE群、LE群での違いは認められなかった。これらの結果は、HE群においてはLE群に比べ、GABA toneは低下しており、

BMIの効果は減少、muscimolの効果は増大した予測される。また、TMJニューロンに対するエストロゲンとGABA機能の関係は複雑であり、自発発火と侵害刺激により誘発される興奮とは異なったメカニズムによりコントロールされていることが示唆された。

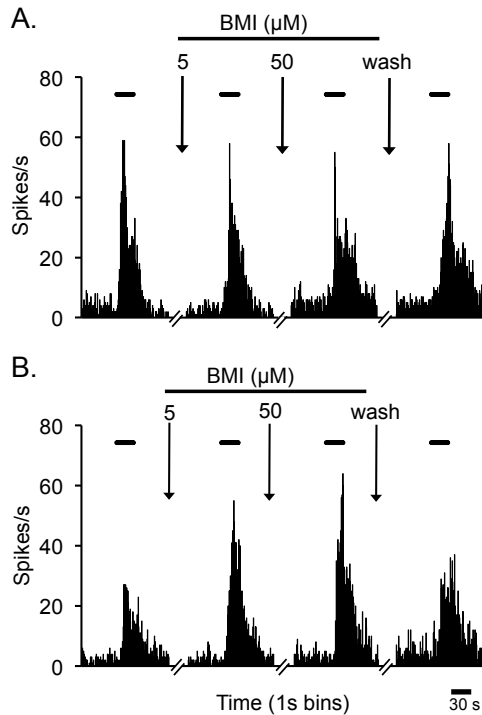


図2) BMIのATP-evoked response に対する影響: A) HE ラット B) LE ラット。
Horizontal bars = ATP (1mM, 20μl) でのTMJ 刺激

2) エストロゲンによるmGluR1及びmGluR5の影響に関する研究
HE群において、低濃度(50μM)CPCCOEt 投与によりATP-evoked response の magnitude や duration は有意に減少したが、LE群においては変化が観られなかった。一方、高濃度(500μM) CPCCOEt の投与では両群においてATP-evoked response の magnitude や duration、は有意に減少した。またMPEP投与の効果は HE群、LE群の両群において、濃度依存的にATP-evoked response の magnitude や duration は有意に減少した。さらに、Vc/C1-2でのmGluR1とmGluR5のmRNAの発現量をqPCR法により定量を行ったところ、HE群、LE群での違いは認められなかった。以上の結果より、雌ラットにおいてGroup I mGluRsの活性はTMJの侵害受容機構に重要な役割を担っ

ていることが明らかとなり、特にmGluR1はHE群ラットで活性化される傾向にあることが示唆された。

本研究の成果により、Vc/C1-2を含む痛覚処理機構においても、エストロゲンによるmGluR1の活性が、GABA機能の変調に関与する可能性が示唆された。

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 2件)

① Tashiro A, Nishida Y and Bereiter DA Local group I mGluR1 antagonist reduces TMJ-evoked activity of trigeminal subnucleus caudalis neurons in female rats. *Neuroscience* 査読有り 299、2015、125-133. doi: 10.1016/j.neuroscience.2015.04.051

② Tashiro A, Bereiter DA, Thompson R, Nishida Y GABAergic influence on temporomandibular joint-responsive spinomedullary neurons depends on estrogen status. *Neuroscience* 査読有り 259、2014、53-62. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.053.

[学会発表] (計 9件)

① Tashiro A and Nishida Y Local KOR agonist reduces TMJ-evoked activity of trigeminal subnucleus caudalis neurons in an estrogen-dependent manner. *Society for Neuroscience 2015*. At Chicago in USA. On: Oct. 17-21, 2015

② 田代晃正、西田育弘 κ受容体を介した三叉神経脊髄路核尾側亜核のニューロン活動の変調に対するエストロゲンの影響、第37回日本疼痛学会、2015年7月3-4日、熊本

③ Tashiro A, Nishida Y Effects of estrogen on Mu and Kappa opioid inhibition of TMJ-responsive neurons in superficial laminae at the spinomedullary junction in ovariectomized female rats 第92回日本生理学会、2015年3月21-23日、神戸

④ Tashiro A and Nishida Y, Kappa opioid receptor-mediated antinociception of

temporomandibular joint -responsive neurons in superficial laminae at spinomedullary junction in female rats depends on estrogen status. Society for Neuroscience 2014. At Washington DC in USA. On: Nov. 15-19, 2014

⑤ Tashiro A, Tamura R, Nishida Y. Effect of sex steroid hormone on kappa opioid receptor-mediated antinociception of TMJ-responsive neurons in superficial laminae at spinomedullary junction of ovariectomized female rats 第37回日本神経科学大会 2014年9月11-13日 横浜

⑥ 田代晃正、エストロゲンが痛みの制御に与える影響 第56回歯科基礎医学会学術大会 2014年9月25-27日 福岡

⑦ Tashiro A, Nishida Y, Bereiter D, Trigeminal interpolaris/ caudalis transition neurons mediate ocular blood flow responses evoked by bright light in the rat 第91回日本生理学会、2014年3月16-18日、鹿児島

⑧ Tashiro A, Nishida Y. Estrogen acts through mGluR1 to modulate TMJ-evoked activity of trigeminal subnucleus caudalis neurons in female rats Society for Neuroscience 2013. San Diego in USA. On: Nov 9-13, 2013

⑨ Tashiro A, Tamura R, Nishida Y. Estrogen acts through mGluR1 to modulate TMJ-evoked activity of trigeminal subnucleus caudalis neurons in female rats 第36回日本神経科

〔図書〕(計 1件)

田代晃正 ほか、医歯薬出版株式会社、口腔顔面痛の診断と治療ガイドブック、2013、26-27 40-41

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 晃正 (TASHIRO Akimasa)

防衛医科大学校 医学教育部医学科専門課程・助教

研究者番号：60598118

研究協力者 (海外共同研究者)

David A Bereiter

ミネソタ大学・教授