

舌乾燥により延髄に発現する c-Fos 陽性細胞の分布様式

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

鎌倉 聡

(指導：岩田 幸一 教授, 篠田 雅路 准教授)

緒言

口腔乾燥症は、口呼吸や唾液腺疾患あるいはシェーグレン症候群や糖尿病のような全身疾患によって引き起こされる口腔特有の疾患である¹⁻³⁾。様々な原因によって引き起こされる口腔乾燥症であるが、多くの場合、舌に痛みを発症する。これまでの舌乾燥モデルラットを用いた研究によると、舌乾燥によって舌には機械痛覚過敏が発症するが、熱痛覚過敏は引き起こされないことが明らかになっている。また、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) から記録した舌感覚入力を受ける侵害受容ニューロンは、侵害機械刺激に対して有意な高頻度の spike 応答を示すことも報告されている⁴⁾。さらに、このような舌を乾燥したモデルラットにおいては、舌そのものには全く炎症所見が見られないことも明らかにされている⁴⁾。このように、舌の乾燥による舌痛は炎症などの器質的変化がないにもかかわらず発症するが、そのメカニズムが明らかにされていない。一方、乾燥舌への侵害機械刺激によって、Vc および上部頸髄 (C1-C2) 領域に多くのリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (ERK) 発現が誘導されることが明らかにされている⁴⁾。これらの Vc および C1-C2 領域には舌の侵害情報を受ける侵害受容ニューロンが存在し、舌の侵害情報処理を担っているものと考えられる。さらに、舌からの侵害情報は Vc や C1-C2 領域だけでなく、孤束核 (NTS) にも入力することが知られている^{5,6)}。NTS においても多くのニューロンが舌乾燥によって活

活性化の可能性が高く、舌乾燥によって駆動されるニューロンがこの領域から多数検出される可能性がある。

しかし、これらの研究では舌乾燥後に侵害機械刺激を初めとする様々な侵害刺激を与えて検索を行うため、純粋に乾燥のみによってどの程度のニューロンが活性化するかは不明である。これまでの多くの研究により、三叉神経損傷や口腔顔面領域に炎症が引き起こされると、Vc および C1-C2 領域から検出される侵害受容ニューロンは、侵害刺激に対する応答性の増加だけでなく、高頻度の自発放電を示すことが知られている⁷⁻¹⁰⁾。おそらく舌を乾燥することによって駆動されるニューロンも高頻度の自発放電を示すものと想像される。従来の研究によって、c-Fos は侵害刺激を与えてから2時間をピークに活性化したニューロンの核内に発現が認められることが明らかにされており、比較的ゆっくりした反応性変化を検出するのに適したニューロンの活性化マーカーであると考えられている¹¹⁾。

本研究では、舌の乾燥のみによってVc および C1-C2 領域に存在するニューロンの自発活動が変調するか否かを解明するため、c-Fos 陽性細胞発現を指標に、舌乾燥によって活性化される延髄ニューロンの発現様式について詳細な解析を行い、舌乾燥によって引き起こされる舌痛覚過敏の発症機構の一端を解明することを目的とした。

方法

本研究は、日本大学歯学部実験動物委員会の許可（承認番号：AP15D034-1）を得、同委員会の指針および国際疼痛学会の基準に従って行われた¹²⁾。動物は自由に水およびエサを摂取することができる環境下で、12時間ごとに明暗が変化するよう設定された恒温（23℃）の部屋で飼育された。実験には Sprague-Dawley 系雄性ラット 20 匹を用いた。

1. 舌乾燥モデルラットの作製

ラットを 2%イソフルラン（Mylan, Canonsburg, PA, USA）と空気が還流するプラスチック容器内に保持し浅麻酔後、舌を口腔外へ突出させ、毎日 2 時間、計 7 日間舌を乾燥させ（舌乾燥群）、舌の侵害機械刺激に対する逃避反射閾値の測定および免疫組織学的解析に用いた。同様に浅麻酔下で舌を出さずに毎日 2 時間、プラスチック容器内に 7 日間放置したラットを sham 群とした。

2. 舌の侵害機械刺激および熱刺激に対する舌ひっこめ反射閾値の測定

舌乾燥または sham 処置を 7 日間行った後、2%イソフルランによる浅麻酔下にて、舌の左半側（舌先端より 3 mm）へ徐々に加えた機械刺激に対する舌のひっこめ反射が生じた刺激強度を反射閾値（TWT）とし、舌乾燥群（n=4）と sham 群（n=4）において計測した。先端が平坦な撮子（4mm square; PANlabs, Barcelona,

Spain) を用いて機械刺激 (0 - 150 g, 10 g/s) を与えた。機械刺激は 10 g/s の刺激速度を手動で制御し, 0 g から反射閾値まで連続的に加えた。舌乾燥および sham 群とも, 乾燥処置後 2 時間経過した時点で測定を行った。また, 舌乾燥および sham 処置前に機械刺激に対する TWT のベースラインを測定した。

3. c-Fos 陽性細胞の免疫組織染色および陽性細胞数の解析

ラットを sodium pentobarbital (80 mg/kg, i.p.) で深く麻酔し, 500 ml 生理食塩液にて脱血後, 0.1 M p 0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH 7.4, 4°C) 500 ml を用いて灌流固定を行った。舌乾燥あるいは sham 群 (各 n =6) の延髄および上部頸髄を取り出し, 厚さ 50 μ m の連続凍結切片を製作し, 0.01 M リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄した後 10% normal goat serum および 3% Triton-X100 を含む 0.01 M PBS に 2 時間インキュベーションした。次に, rabbit anti-c-Fos polyclonal antibody (1:10000, Ab5, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) に室温で 24 時間インキュベーションした。0.01 M PBS で洗浄した後 biotinylated goat anti-rabbit IgG (1:600; Vector Labs, Burlingame, CA, USA) に 37°C で 2 時間インキュベーションした。次に, HRP-avidine (1:100; ABC, Vector Labs, Burlingame, CA, USA) に室温で 2 時間インキュベーションした。0.01 M PBS で洗浄後さらに 0.05 M Tris buffer (TB) で洗浄し, 0.035% 3, 3'-diaminobenzidine-tetra

HCl (DAB, Sigma, St Louis, MO, USA), 0.2% nickel ammonium, 0.05% peroxide を加えた 0.05 M TB (pH 7.4) に室温で 5 分間インキュベーションした。免疫反応後, MAS-coated slide (Matsunami, Tokyo, Japan) にマウントして, 脱水, 脱アルコールを行ない封入した。また, 染色された c-Fos 陽性細胞は切片を光学顕微鏡下で観察し, Neuro-Lucida (Micro Bright Field Bioscience, Williston, VT, USA) を用いて描画した。

4. 統計学的解析

データは平均 \pm 標準誤差 (SE) で表し, 有意差検定には Student's *t*-test を用いた。また, $p < 0.05$ の時に有意差ありと判定した。

結果

1. 逃避反射閾値の比較

本研究では舌へ機械刺激を与えるために、舌乾燥群および sham 群をイソフルランによって浅麻酔した。そのため、本実験で得られた TWT は舌の侵害刺激に対する逃避行動ではなく舌のひっこめ反射閾値を示している。ラットに浅麻酔を施しているため、本研究で得られた TWT は覚醒動物を用いて測定したこれまでの様々な逃避閾値に比較して SE が非常に小さな値を示した。第 1 図に示したように、麻酔ラットの舌へ侵害機械刺激を与え誘発される TWT は舌乾燥群の方が sham 群に比べ有意に低い値を示した（舌乾燥群： 83.8 ± 2.0 g, sham 群： 108.1 ± 2.1 g, 各 $n=4$ ）。

2. 延髄および C1-C2 領域で検出された c-Fos 陽性細胞

従前の研究により、c-Fos タンパクは神経細胞の核に発現することが明らかにされている¹¹⁾。舌乾燥群では Vc, C1-C2, 延髄網様核 (RF) および孤束核 (NTS) において、核が c-Fos 陽性反応を示す多数の神経細胞が確認された。Vc において c-Fos 陽性細胞は、両側性に背側部の表層部を中心に広く分布していた（第 2 図 A および B）。また、Vc の強拡大像をみると、神経細胞の核に c-Fos 免疫陽性反応が観察された（第 2 図 C）。C1 領域では、Vc 領域に比べ少数ではあるが、

背内側部の表層から深層にかけて c-Fos 陽性細胞が検出された (第 2 図 D および E)。さらに, RF においても, 両側性に少数の発現を認めた (第 2 図 F および G)。NTS においては比較的多くの c-Fos 陽性細胞が両側性に観察された (第 2 図 H)。

第 3 図には舌乾燥群および sham 群の延髄および C1-C2 領域に発現した c-Fos 陽性細胞を Neuro-Lucida を用いて描画した像を示した。舌乾燥群および sham 群のどちらも c-Fos 陽性細胞は左右差がなく両側性に分布していた。また, NTS および RF においては舌乾燥群と sham 群においてほぼ同様の分布パターンを示していた (第 3 図 A および B)。

3. Vc および C1-C2 領域における c-Fos 陽性細胞の吻尾側方向の広がり

第 4 図に舌乾燥群および sham 群の Vc および C1-C2 から検出された c-Fos 陽性細胞の吻尾方向における分布を示した。本研究ではそれぞれのレベルにおいて 3 枚ずつの切片上において検出された c-Fos 陽性細胞数の平均値を吻尾方向に配列した。発現数は obex (0 μm) 付近と obex から 2880 μm 尾側部にピークを有する 2 峰性の分布を示した (第 4 図)。

4. Vc および C1-C2 領域における c-Fos 陽性細胞数の比較

舌乾燥群の Vc および C1-C2 領域に発現した全 c-Fos 陽性細胞数と sham 群の c-Fos 陽性細胞数を比較した (第 5 図)。本研究ではそれぞれの群の表層から深層にかけて分布している c-Fos 陽性細胞数を比較した。その結果, ここに示したように舌乾燥群の方が sham 群に比べ有意に多くの c-Fos 陽性細胞を認めた。

考察

口腔乾燥症やシェーグレン症候群などの様々な疾患で舌が乾燥状態にさらされると、舌の異常疼痛が引き起こされることが知られている¹⁻³⁾。舌が乾燥すると疼痛が発症するだけでなく、咀嚼や嚥下あるいは発話などの口腔が有する様々な機能を障害し、患者の QOL を著しく低下させることが知られている³⁾。本研究では舌の乾燥によって引き起こされる舌の異常疼痛の神経機構を解明し、舌乾燥に起因する舌痛の新たな治療法に対する基礎データを集積することを目的とした。

1. 舌乾燥群の侵害機械刺激に対する反射応答

本研究で用いた舌乾燥モデルラットは侵害機械刺激には痛覚過敏を発症した。従前の研究から、侵害機械刺激に対する受容体として transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) あるいは TRP vanilloid 4 (TRPV4)、熱刺激に対する受容体として TRP vanilloid 1 (TRPV1) や TRP vanilloid 2 (TRPV2) が知られている¹³⁾。これらの受容体はともに無髄の C 線維あるいは細径の有髄神経線維である A δ 神経線維の末梢終末である自由神経終末部に発現し、侵害機械および熱刺激を受容するといわれている¹⁴⁾。本研究結果とこれまでの研究で得られたデータから考察すると、舌を乾燥することによって末梢神経系では侵害機械刺激に対する

受容体，すなわち TRPA1 あるいは TRPV4 の活性化が誘導された可能性があると考えられる。

2. c-Fos 発現と舌の機械痛覚過敏

従来の研究から，immediate early gene として知られている *c-fos* は，末梢組織侵害刺激後に脊髄の表層および深層に存在するニューロンの核内に発現するの
に，タンパクである c-Fos は約 2 時間でピークに達することが分かっている¹⁴⁾。
また，c-Fos は侵害刺激に対して，刺激強度依存的に陽性細胞数が増加すること
から，興奮した侵害受容ニューロンの指標として用いることができると考えら
れている¹⁵⁾。

c-Fos 発現は侵害刺激を加えてから 2 時間を経過しているの
で，c-Fos 陽性細胞は興奮後に様々なタンパク合成が進行している状態であると
考えられる。また，刺激後 2 時間を経過すると末梢入力を直接受けるニューロン
だけでなく介在ニューロンも興奮するため，投射ニューロンと介在ニューロンの
両方が c-Fos 陽性を示すと考えられる。おそらく本研究で検出された c-Fos 陽
性細胞は舌の侵害入力を受ける投射ニューロンと介在ニューロンの両方の活
性化を捉えたもので，細胞内において様々なタンパク合成が進行した状態を
示しているものと推察される。

3. Vc および C1-C2 における c-Fos 陽性細胞の分布様式

これまでの様々なモデル動物を用いた研究で、Vc および C1-C2 領域には口腔顔面領域の侵害入力を受ける侵害受容ニューロンが多数存在することが報告されている^{7,8)}。口腔顔面領域からの侵害受容ニューロンの分布を調べた研究から、Vc および C1-C2 領域の背側部には三叉神経第III枝、腹側部領域には第I枝領域から、また中間部には第II枝領域からの入力投射が投射するといわれている^{11,16)}。本研究で対象とした舌の領域は三叉神経第III枝領域であることから Vc および C1-C2 領域の背側部に入力投射がある。このことから、舌の侵害刺激によって発現した c-Fos 陽性細胞も Vc および C1-C2 領域の背側部に偏った分布を示したものと考えられる。また、これまでの研究では口腔顔面の侵害刺激によって発現する c-Fos 陽性細胞は吻尾側方向に 2 峰性のピークを有する発現様式を示すことが報告され、これら 2 つのピークを示す領域に存在するニューロンは異なる機能を有する可能性が報告されている¹⁷⁾。本研究においても、舌の侵害刺激によって発現する c-Fos 陽性細胞は 2 峰性の分布様式を示していた。これら 2 つのピークを示す領域に存在する舌入力を受ける c-Fos 陽性細胞は舌の侵害情報処理において異なる働きを担っているものと推察される。

結論

麻酔ラットの舌を7日間乾燥させたラットの舌への侵害機械刺激を加えることにより舌ひっこめ反射と Vc および C1-C2 領域に発現する c-Fos 陽性細胞の発現様式を解析し、以下の結論を得た。

1. TWT は sham 群に比較して舌乾燥群で有意に低い値を示した。
2. 舌乾燥群においては Vc, C1-C2, RF および NTS に多数の c-Fos 陽性細胞が確認された。
3. Vc において c-Fos 陽性細胞は、両側性に背側部の表層部を中心に深層に向かって分布していた。
4. 舌乾燥群において sham 群より有意に多くの c-Fos 陽性細胞が延髄および上部頸髄から検出された。
5. c-Fos 陽性細胞は obex 付近と obex から 2880 μm 尾側部にピークを有する2峰性の分布を示した。

以上の結果から舌乾燥に伴う舌痛発症には Vc および C1-C2 領域に存在する侵害受容ニューロンが重要な働きを有する可能性が示された。また、これらの領域に分布する c-Fos 陽性細胞は2峰性の分布を示したことから、舌痛症における

侵害情報処理は吻側部領域と尾側部領域では異なるメカニズムが存在する可能性があると推察された。

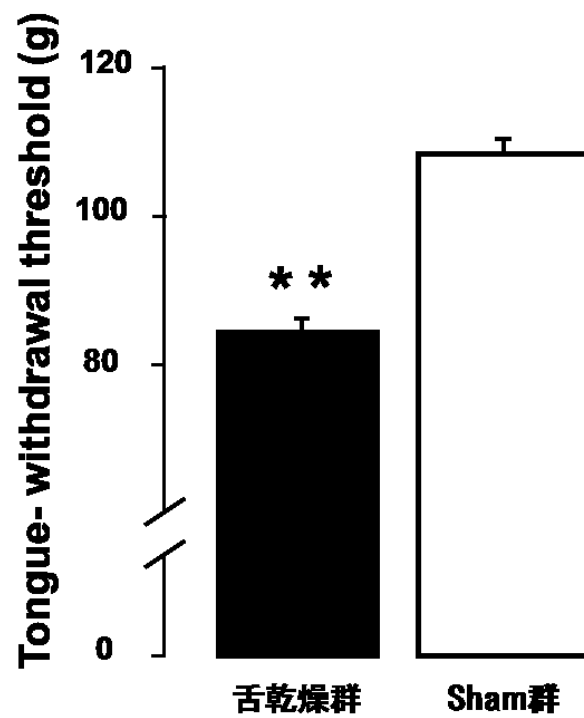
文 献

- 1) Aravindhana R, Vidyalakshmi S, Kumar MS, Satheesh C, Balasubramaniam AM, Prasad VS (2014) Burning mouth syndrome: A review on its diagnostic and therapeutic approach. *J Pharm Bioallied Sci* 6, S21-S25.
- 2) Seror R, Theander E, Bootsma H, Bowman SJ, Tzioufas A, Gottenberg JE, Ramos-Casals M, Dorner T, Ravaud P, Mariette X, Vitali C (2014) Outcome measures for primary Sjogren's syndrome: a comprehensive review. *J Autoimmun* 51, 51-56.
- 3) Napenas JJ, Brennan MT, Fox PC (2009) Diagnosis and treatment of xerostomia (dry mouth). *Odontology* 97, 76-83.
- 4) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen JY, Noma N, Batbold D, Imamura Y, Sessle BJ, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain*, 12.
- 5) Hallock RM, Di Lorenzo PM (2006) Effects of electrical stimulation of the glossopharyngeal nerve on cells in the nucleus of the solitary tract of the rat. *Brain Res* 1113, 163-173.
- 6) May OL, Hill DL (2006) Gustatory terminal field organization and developmental

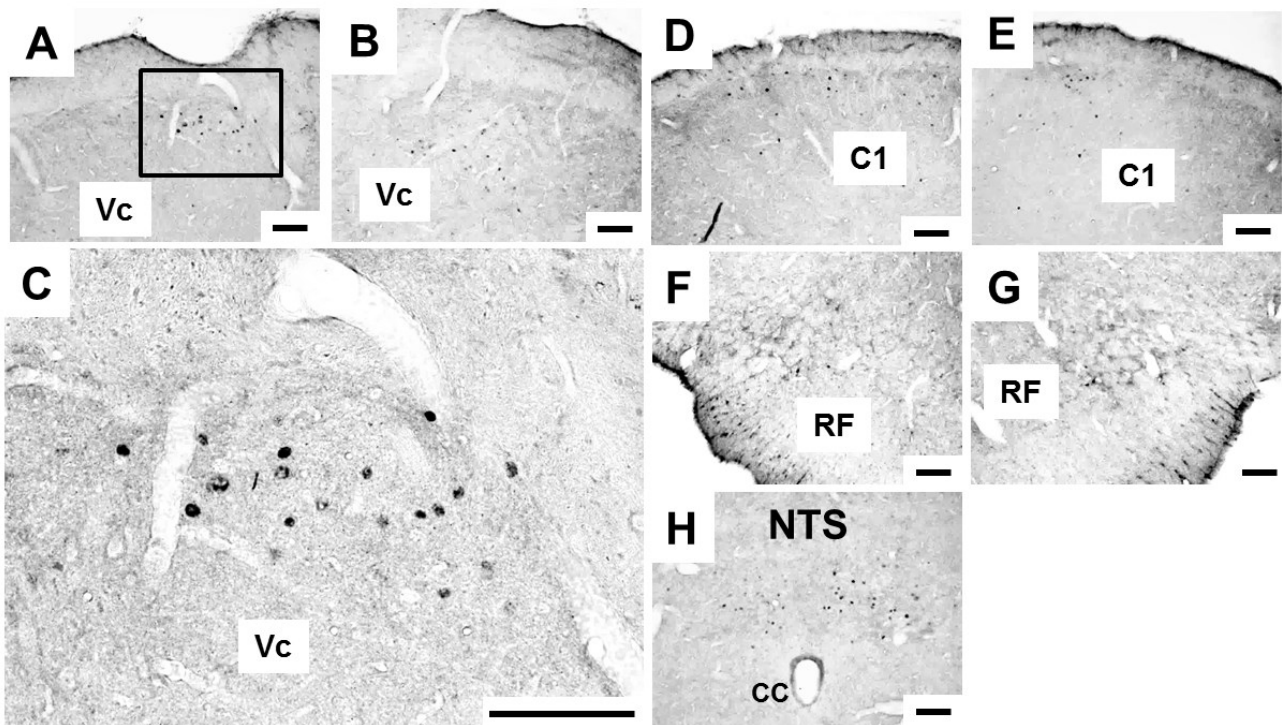
- plasticity in the nucleus of the solitary tract revealed through triple-fluorescence labeling. *J Comp Neurol* 497, 658-669.
- 7) Iwata K, Tashiro A, Tsuboi Y, Imai T, Sumino R, Morimoto T, Dubner R, Ren K (1999) Medullary dorsal horn neuronal activity in rats with persistent temporomandibular joint and perioral inflammation. *J Neurophysiol* 82, 1244-1253.
- 8) Iwata K, Tsuboi Y, Shima A, Harada T, Ren K, Kanda K, Kitagawa J (2004) Central neuronal changes after nerve injury: neuroplastic influences of injury and aging. *J Orofac Pain* 18, 293-298.
- 9) Kiyomoto M, Shinoda M, Okada-Ogawa A, Noma N, Shibuta K, Tsuboi Y, Sessle BJ, Imamura Y, Iwata K (2013) Fractalkine signaling in microglia contributes to ectopic orofacial pain following trapezius muscle inflammation. *J Neurosci* 33, 7667-7680.
- 10) Kiyomoto M, Shinoda M, Honda K, Nakaya Y, Dezawa K, Katagiri A, Kamakura S, Inoue T, Iwata K (2015) p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats. *Mol Pain* 11, 48.
- 11) Noma N, Tsuboi Y, Kondo M, Matsumoto M, Sessle BJ, Kitagawa J, Saito K, Iwata K (2008) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral

- and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol* 507, 1428-1440.
- 12) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 13) Tominaga M (2007) Nociception and TRP channels. *Handb Exp Pharmacol* 179, 489-505.
- 14) Hunt SP, Pini A, Evan G (1987) Induction of c-fos-like protein in spinal cord neurons following sensory stimulation. *Nature* 328, 632-634.
- 15) Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW, Iwata K (2002) Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transection. *Pain* 95, 225-238.
- 16) Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle BJ, Iwata K (2012) Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Res* 1451, 74-86.
- 17) Shoda E, Kitagawa J, Suzuki I, Nitta-Kubota I, Miyamoto M, Tsuboi Y, Kondo M, Masuda Y, Oi Y, Ren K, Iwata K (2009) Increased phosphorylation of

extracellular signal-regulated kinase in trigeminal nociceptive neurons following propofol administration in rats. *J Pain* 10, 573-585.



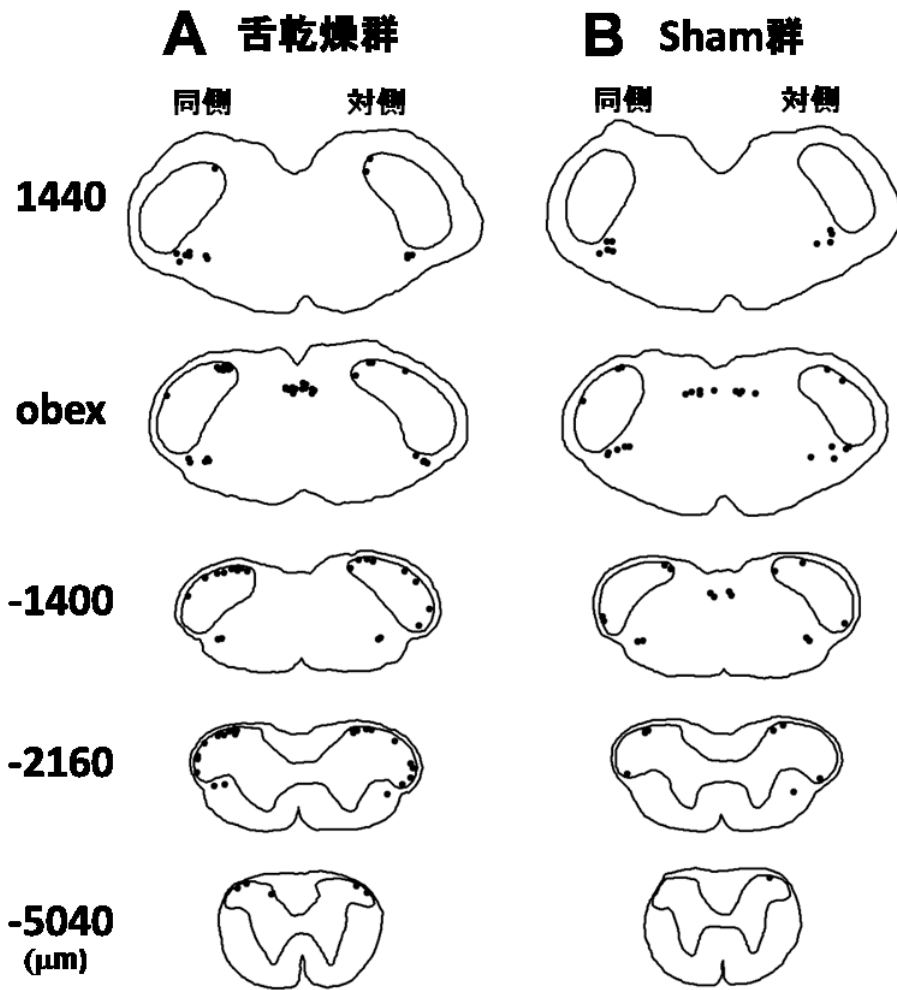
第1図
舌乾燥群とsham群の舌機械刺激に対する舌
ひっこめ反射閾値の比較 **: $p < 0.01$



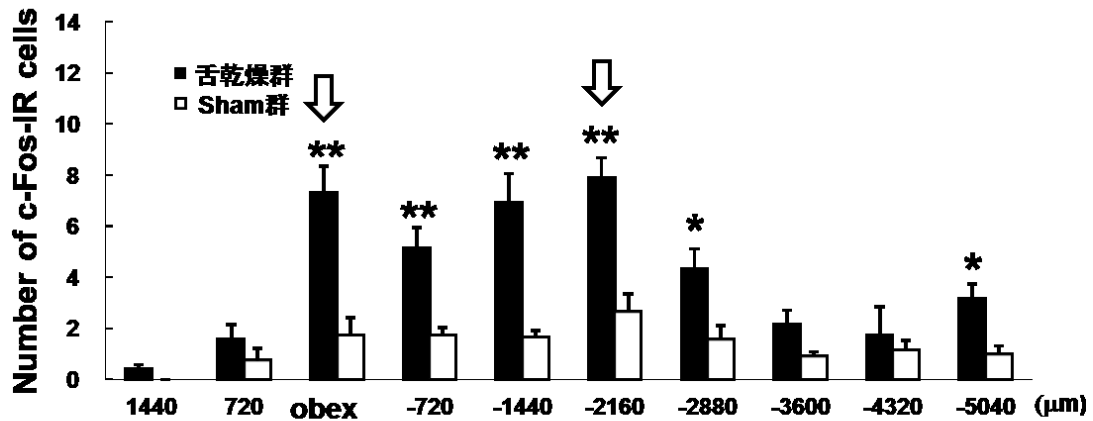
第2図

c-Fos陽性細胞が検出された延髄領域の顕微鏡写真

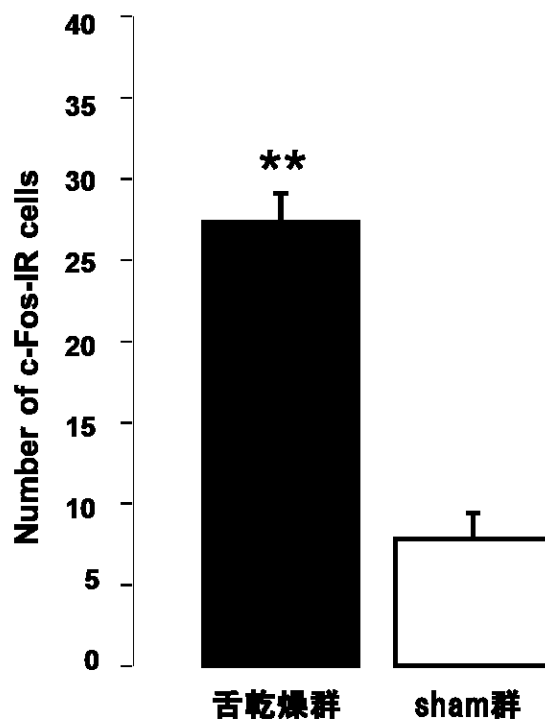
A: 右側のVc, B: 左側のVc, C: Aの四角で囲まれた領域の強拡大像, D: 右側のC1, E: 左側のC1, F: 右側毛様体(RF), G: 左側RF, cc: 中心管, スケールバー: 100 μ m



第3図
c-Fos陽性細胞が検出された切片のNeuro-Lucida描画像



第4図
舌乾燥群とsham群のVcおよびC1-C2領域に発現したc-Fos陽性細胞の吻尾方向における分布 矢印:ピーク, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$



第5図
舌乾燥群とsham群のVcおよびC1-C2領域に発現したc-Fos陽性細胞数の比較 ** : $p < 0.01$