

三叉神経節ニューロンにおける
TRPV1 および TRPV2 発現の老化による変化が
口腔粘膜疼痛感受性に及ぼす影響

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

大 音 樹

(指導：飯沼利光教授，篠田雅路教授，浦田健太郎助教)

目 次

	ページ
概要	1～2
緒言	3～4
材料および方法	5～8
結果	9～10
考察	11～14
結論	15
謝辞	16
文献	17～23
図	24～27

概 要

老化は、侵害刺激の受容に対し影響を及ぼすことが知られている。しかしながら、口腔粘膜の疼痛感受性に及ぼす老化の影響は報告が少ない現状である。そこで本研究では、老化促進マウス（Senescence-accelerated mice prone 8 ; SAMP8）を用いて、老化による口腔粘膜の疼痛感受性の変化を明らかにするために、三叉神経節（TG）ニューロンにおける、侵害熱および機械刺激を受容する Transient receptor potential vanilloid 1（TRPV1）および TRPV2 の発現に対し老化が及ぼす影響を検討した。

SAMP8 マウス 23 週齢（老齢）と SAMP8 マウス 7 週齢（若齢）を使用し、各実験にて老化の影響を比較検討した。まず、老化による口腔粘膜の熱および機械刺激に対する疼痛感受性の変化を明らかにするために、侵害刺激に対する逃避反射閾値の測定を行った。左側口蓋粘膜にヒートプローブを用いた熱刺激を加え、マウスの頭部引っ込み反射を誘発した最低強度の値を熱逃避反射閾値（HHWT）、デジタルフォンフライを用いた機械刺激を加え、熱刺激と同様に頭部引っ込み反射を誘発した最低強度の値を機械逃避反射閾値（MHWT）として測定した。次に、TRPV1 または TRPV2 発現の老化による影響を明らかにするために、神経逆行性トレーサーである Fluoro Gold（FG）を左側口蓋粘膜に注入し、口蓋粘膜を神経支配する TG の第 2 枝領域における、FG 標識 TRPV1 あるいは TRPV2 陽性 TG ニューロン数と細胞径の解析を行った。さらに、TRPV1 アンタゴニスト（SB366791）あるいは TRPV2 アンタゴニスト（Tranilast）を口蓋粘膜に局所投与した際の、HHWT および MHWT の変化を経時的に測定することで、老化による口蓋粘膜の疼痛感受性の変化に対する TRPV1 あるいは TRPV2 陽性

TG ニューロン数の老化による変化の関与を検討した。

老齢 SAMP8 マウスは、若齢 SAMP8 マウスと比較して、HHWT の有意な上昇および MHWT の有意な低下を認めた。次に、口蓋粘膜を神経支配する TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現への老化による影響を検討した結果、若齢 SAMP8 マウスは、老齢 SAMP8 マウスと比較して小型の TRPV1 陽性 TG ニューロンが有意に多く、老齢 SAMP8 マウスでは、若齢 SAMP8 マウスと比較して中型の TRPV2 陽性 TG ニューロンが有意に多く発現した。また、SB366791 投与により、若齢 SAMP8 マウスは投与 30 分後に HHWT の有意な上昇を認めたが、老齢 SAMP8 マウスでは、HHWT の有意な変化を認めなかった。SB366791 投与後の MHWT は、若齢および老齢 SAMP8 マウス共に有意な変化を認めなかった。一方、Tranilast 投与により若齢 SAMP8 マウスは HHWT および MHWT の有意な変化を認めなかったが、老齢 SAMP8 マウスでは、Tranilast 投与 30 分後に、HHWT および MHWT の有意な上昇を認めた。

以上のことから、老化は TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現に影響を及ぼし、口蓋粘膜の熱および機械刺激に対する疼痛感受性が変化することが示唆された。

本論文は原著論文 “Oto T, Urata K, Hayashi Y, Hitomi S, Shibuta I, Iwata K, Iinuma T, Shinoda M (2021) Age-related differences in transient receptor potential vanilloid 1 and 2 expression patterns in the trigeminal ganglion neurons contribute to changes in the palatal mucosal heat pain sensitivity. *Tohoku J Exp Med* (in press)” を基幹論文とし、新たに“機械刺激に対する逃避反射閾値”のデータを追加して総括したものである。

緒 言

老化は、侵害刺激の受容に対して影響を及ぼすことが報告されており^{1,2)}、熱刺激または機械刺激による手足の皮膚における疼痛閾値は、それぞれ上昇および³⁻⁵⁾、低下することが報告されている⁴⁾。このように、四肢領域では侵害刺激に対する老化の影響が数多く報告されているが、顎顔面領域の、特に口腔内での侵害刺激の受容に対する老化の影響は報告が少ない現状にある。近年、高齢者では、高温のままの飲食や十分な粉砕がなされていない固形物の嚥下が、誤嚥性肺炎などの発症要因となることが報告されていることから、口腔内での侵害刺激の受容は、生体防御メカニズムにおいて非常に重要な機能と考えられている⁶⁾。しかし、熱刺激に対する舌の疼痛閾値は老化により変化することが報告されているが⁷⁾、その他の口腔粘膜については老化の影響が不明であり、侵害刺激の受容に変化が生じる詳しいメカニズムは明らかではない。

生体組織に広く分布する侵害受容体には、複数の侵害刺激のトランスデューサーとして機能する Transient receptor potential (TRP) チャンネルがある⁸⁻¹¹⁾。TRP チャンネルの1つである TRP vanilloid (TRPV) ファミリーの内、TRPV1 は 43°C 以上、TRPV2 は 52°C 以上の熱刺激によって活性化し^{12, 13)}、また TRPV1 と TRPV2 は機械刺激によっても活性化すると報告されている⁹⁻¹¹⁾。この TRPV1 および TRPV2 は、口腔粘膜を神経支配する三叉神経節 (TG) ニューロンにも発現し、口腔粘膜における侵害性の熱および機械刺激の受容に関与すると報告されている¹⁴⁻¹⁶⁾。例えば、口腔粘膜を神経支配する TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロン数の増加は、口腔粘膜損傷後に発症す

る熱痛覚過敏および機械アロディニアの増強に關与することが報告されている^{17, 18)}。

しかし、口腔粘膜を神経支配する TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 の発現に対し、老化がどのような影響を及ぼすかは不明である。

近年、老化に伴う行動障害や認知異常に關連する病態の解明を目的とする多くの研究で Senescence-accelerated mice prone 8 (SAMP8) マウスが使用されている¹⁹⁻²¹⁾。SAMP8 マウスは通常マウスと比較して、急速な老化を示し、加齢依存的に学習/記憶障害、免疫機能の低下および中枢神経系へのアミロイド沈着の発生率が増加すると報告されている^{20, 22)}。さらに SAMP8 マウスは、加齢により老化した人間の脳と類似した生理学的および形態学的変化を示すと報告されている²³⁾。以上のことから、SAMP8 マウスは、老化による口腔粘膜疼痛感受性変化の解析に適したマウスであると考えられる。

そこで本研究は、SAMP8 マウスを用い、口腔粘膜を神経支配する TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現の老化による変化の、侵害熱および機械刺激による口腔粘膜の疼痛感受性に対する影響を検討した。

材料および方法

1. 実験動物

本研究では、SAMP8 雄性マウス (n = 50, 体重 20-30 g, Japan SLC) を使用した。使用マウスの各週齢数は、過去の報告より、口腔粘膜の疼痛感受性に対し老化による影響が明確に確認された 23 週齢を老齢モデルとし²⁴⁾、老化による神経学的変化をほとんど示さない 7 週齢を若齢モデルとした²⁵⁾。すべてのマウスは、12 時間毎に切り替わる明暗サイクル、23°C に維持された室温、および餌と水を自由に摂取できる環境下にて飼育し、1 週間の馴化訓練を経て実験に使用した²⁴⁾。なお、本研究は日本大学動物実験委員会の承認 (AP18DEN017: 承認日; 2018 年 6 月 29 日) を受け、国際疼痛学会の指針に従い実施した²⁶⁾。

2. 口蓋粘膜への熱および機械刺激に対する頭部引っ込み反射閾値の測定

2% イソフルラン (Mylan) 吸入による浅麻酔下にて、左側上顎臼歯部から 2 mm 内方に、ヒートプローブ (25 mm²; Intercross) を用い熱刺激を加え、マウスが頭部引っ込み反射を誘発した際の最低強度値を、熱逃避反射閾値 (HHWT) とした。また、デジタルフォンフライ (Bioseb) を用い機械刺激を加え、熱刺激と同様にマウスが頭部引っ込み反射を誘発した際の最低強度値を、機械逃避反射閾値 (MHWT) とした。熱刺激は、1 秒間に 1°C 上昇させ、下限値は 35°C から測定を行い、上限値は 60°C とした¹⁷⁾。機械刺激は、1 秒間に 10 g の割合で増加させ、上限値を 100 g とした²⁴⁾。測定は 3 分間隔で 3 回行い、その平均値を各マウスの HHWT および MHWT とした。な

お、HHWT および MHWT の測定は、盲検条件下で実施した。

3. TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロン数の検討

試料作製に際し、まず口蓋粘膜を神経支配する TG ニューロンを標識するために、生理食塩水で希釈した神経逆行性トレーサーである Fluoro Gold (FG ; Fluorochrome) 3 μ L を、27 ゲージの注射針で左側口蓋粘膜に粘膜下投与した。FG 投与 7 日後、三種混合麻酔薬（酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg, Meiji Seika Pharma, ミダゾラム 2.0 mg/kg, Sandoz, 塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg, Zenoaq）の腹腔内投与による深麻酔下にて、0.9% 生理食塩水（50 mL）を用い脱血し安楽死させた後、4% paraformaldehyde 固定液（PFA）による灌流固定を行った。続いて TG を摘出し、PFA に 4°C で 24 時間浸漬することで後固定を行った。さらに 0.01 M phosphate buffer saline（PBS）で希釈した 20% スクロースに 6 時間浸漬し、-20°C の環境下にて TG を Tissue Tek（Sakura Finetek）で包埋後、10 μ m の厚さで神経節の長軸に対して水平断にスライスし、凍結切片を作製した。TG 切片は、1 次抗体として抗 TRPV1 ウサギポリクローナル抗体（500 倍希釈, Alomone）または、抗 TRPV2 ウサギポリクローナル抗体（200 倍希釈, Abnova）を 4°C で 12 時間反応させた後、PBS で洗浄した。次に、2 次抗体として、Alexa Fluor 488 または Alexa Fluor 568 ヤギ抗ウサギ IgG 抗体（200 倍希釈, Thermo Fisher Scientific）を室温（23°C）で 2 時間反応させた後、PBS で洗浄し、切片を封入した。

FG 標識 TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロン数は、蛍光顕微鏡（BZ-9000 system, Keyence）にて観察し、背景に比べ 2 倍以上の蛍光強度を示すニューロンを陽性ニュー

ーロンとし、その数を計測した。また、FG 標識 TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロンの比率は、 $100 \times (\text{FG 標識 TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロンの総数}) / (\text{FG 標識 TG ニューロンの総数})$ で求めた。陽性ニューロンの細胞径は Image J (NIH) にて計測し、過去の報告をもとに区分し解析した ($\leq 399 \mu\text{m}^2$; 小型, $400-699 \mu\text{m}^2$; 中型, $\geq 700 \mu\text{m}^2$; 大型) ^{27,28)}。

4. TRPV1 または TRPV2 アンタゴニストの口蓋粘膜投与による HHWT および MHWT の経時的変化の検討

老齢および若齢 SAMP8 マウスに対し、TRPV1 アンタゴニスト (SB366791, $6 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, Sigma-Aldrich) ^{17,29)}, TRPV2 アンタゴニスト (Tranilast, $1.2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, Cayman) ¹⁸⁾ あるいは、各アンタゴニストの溶媒液である 20% ジメチルスルホキシド含有生理食塩水 (vehicle) を、左側口蓋粘膜に 27 ゲージの注射針を用いて $3 \mu\text{L}$ 粘膜下投与し、口蓋粘膜の熱および機械刺激に対する HHWT および MHWT の変化を経時的に測定した。なお測定は、投与前 (pre), 投与 30, 60, 90 および 120 分後に行い、すべて盲検条件下で実施した ¹⁷⁾。

5. 統計学的解析

各データは平均値±標準誤差で表した。有意差検定は、HHWT および MHWT の測定と、TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロン数の検討には Student's *t*-test を用いた。TRPV1 または TRPV2 アンタゴニストの口蓋粘膜投与による HHWT および MHWT の経時的変化の検討には、two-way repeated-measure analysis of variance を用い、Sidak's

multiple comparison test にて多重比較を行った。有意差水準は $p < 0.05$ とした。

結 果

1. 口蓋粘膜刺激時の HHWT および MHWT の変化

老齢 SAMP8 マウスは若齢 SAMP8 マウスと比較して、HHWT の有意な上昇と、MHWT の有意な低下を認めた（若齢 SAMP8 マウス；HHWT： $46.5 \pm 0.6^{\circ}\text{C}$ ，MHWT： $58.3 \pm 0.7\text{ g}$ ，老齢 SAMP8 マウス；HHWT： $50.2 \pm 0.7^{\circ}\text{C}$ ，MHWT： $53.7 \pm 1.3\text{ g}$ ）（図 1 A, B）。

2. TRPV1 および TRPV2 陽性 TG ニューロン数の変化

老齢および若齢 SAMP8 マウスにおいて、TG の第 2 枝領域における FG 標識 TG ニューロン数に有意な差は認められなかった（若齢 SAMP8 マウス： 26.9 ± 3.2 ，老齢 SAMP8 マウス： 23.2 ± 3.8 ）。

若齢 SAMP8 マウスは、老齢 SAMP8 マウスと比較して、TRPV1 陽性 TG ニューロン数が有意に多く発現した（若齢 SAMP8 マウス： $71.6 \pm 2.4\%$ ，老齢 SAMP8 マウス： $49.1 \pm 5.0\%$ ）（図 2 A, B）。TRPV1 陽性 TG ニューロンを細胞径ごとに解析すると、若齢 SAMP8 マウスは、老齢 SAMP8 マウスと比較して、小型の TRPV1 陽性 TG ニューロンが有意に多く発現した（ $\leq 300\ \mu\text{m}^2$ ；若齢 SAMP8 マウス： $48.1 \pm 4.0\%$ ，老齢 SAMP8 マウス： $24.2 \pm 1.8\%$ ， $400\text{-}699\ \mu\text{m}^2$ ；若齢 SAMP8 マウス： $20.4 \pm 2.0\%$ ，老齢 SAMP8 マウス： $19.5 \pm 3.6\%$ ， $\geq 700\ \mu\text{m}^2$ ；若齢 SAMP8 マウス： $3.0 \pm 1.3\%$ ，老齢 SAMP8 マウス： $4.7 \pm 2.5\%$ ）（図 2 C）。また、老齢 SAMP8 マウスは、若齢 SAMP8 マウスと比較して、TRPV2 陽性 TG ニューロン数が有意に多く発現した（若齢 SAMP8 マウス： 43.3

±3.6%, 老齡 SAMP8 マウス : 65.3 ± 4.1%) (図 2 D, E)。TRPV2 陽性 TG ニューロンを細胞径ごとに解析すると, 老齡 SAMP8 マウスでは, 若齡 SAMP8 マウスと比較して, 中型の TRPV2 陽性 TG ニューロン数が有意に多く発現した ($\leq 399 \mu\text{m}^2$; 若齡 SAMP8 マウス : 30.6 ± 3.7%, 老齡 SAMP8 マウス : 38.5 ± 4.5%, $400-699 \mu\text{m}^2$; 若齡 SAMP8 マウス : 12.9 ± 4.6%, 老齡 SAMP8 マウス : 25.1 ± 1.8%, $\geq 700 \mu\text{m}^2$; 若齡 SAMP8 マウス : 0.8 ± 0.8%, 老齡 SAMP8 マウス : 2.1 ± 0.8%) (図 2 F)。

3. TRPV1 および TRPV2 アンタゴニスト口蓋粘膜投与による HHWT および MHWT の経時的変化

SB366791 投与により, 若齡 SAMP8 マウスでは, vehicle 投与群と比較して投与 30 分後に HHWT の有意な上昇を認めたが, 老齡 SAMP8 マウスでは, vehicle 投与群と比較して HHWT の有意な変化は認められなかった (図 3 A, B)。また, SB366791 投与により, MHWT は若齡および老齡 SAMP8 マウス共に有意な変化は認められなかった (図 3 C, D)。

Tranilast 投与により, 若齡 SAMP8 マウスでは, vehicle 投与群と比較して HHWT および MHWT の有意な変化は認められなかったが, 老齡 SAMP8 マウスでは, Tranilast 投与 30 分後, vehicle 投与群と比較して HHWT および MHWT の有意な上昇が認められた。(図 4 A, B, C, D)。

考 察

本研究では、口蓋粘膜の老化による疼痛感受性の変化を検討した。その結果、老齢 SAMP8 マウスの口蓋粘膜における HHWT は、若齢 SAMP8 マウスと比較して有意に上昇し、MHWT は有意に低下した。末梢神経系から中枢神経系への疼痛情報の伝達には、C 線維ポリモーダル侵害受容器と A δ 線維侵害受容器の関与が知られている³⁰⁻³²⁾。また、C 線維ポリモーダル侵害受容器には主に TRPV1 が多く発現し、A δ 線維侵害受容器には主に TRPV2 が多く発現していることが報告されている³³⁾。さらに、四肢領域では、老化が無髄の C 線維や有髄の A δ 線維に影響を及ぼし、四肢の疼痛感受性を変化させることが報告されている³⁴⁻³⁶⁾。これらのことから、口蓋粘膜における侵害刺激に対する疼痛感受性は老化により変化し、四肢領域における報告と同様に³⁻⁵⁾、侵害熱刺激時の疼痛閾値は上昇し、侵害機械刺激時の疼痛閾値は低下することが示唆された。

次に、この老化による口蓋粘膜の疼痛感受性の変化に対し、口蓋粘膜を神経支配する TG ニューロンにおける TRP チャンネルの関与を検討した。TRPV1 の検討では、若齢 SAMP8 マウスは、老齢 SAMP8 マウスと比較して小型の TRPV1 陽性 TG ニューロン数が有意に多く発現した。また、SB366791 投与により若齢 SAMP8 マウスは HHWT の有意な上昇を認め、老齢 SAMP8 マウスでは有意な変化を認めなかったが、一方で、MHWT は SB366791 投与により、老齢および若齢 SAMP8 マウス共に有意な変化を認めなかった。TRPV1 は、主に無髄の C 線維を含んだ小型の TG ニューロンおよび後根神経節 (DRG) ニューロンに多く発現することが報告されている^{12, 37-40)}。また、

TRPV1 陽性ニューロン数は、老化により低下することが報告されており⁴¹⁾、DRG ニューロンでは老化による TRPV1 陽性ニューロン数の低下により、四肢の侵害熱刺激に対する疼痛感受性が減弱すると報告されている⁴²⁾。これらのことから、一次ニューロンにおける TRPV1 発現の低下は、侵害熱刺激時の疼痛感受性の変化に影響を及ぼすと考えられる。一方、侵害機械刺激時の疼痛感受性に対する老化の影響と、TRPV1 陽性ニューロン数の老化による変化との関連性についてはいまだ不明な点が多い。しかし、局所炎症誘発時における TRPV1 と侵害機械刺激時の疼痛感受性との関連性については、頬粘膜損傷後に生じる TRPV1 陽性 TG ニューロン数の増加が、侵害機械刺激時の疼痛の増強に関与することが報告されている¹⁷⁾。本研究では、TRPV1 陽性 TG ニューロン数は若齢 SAMP8 マウスが老齢 SAMP8 マウスよりも有意に多く認められたが、SB366791 投与による MHWT の有意な変化は、老齢および若齢 SAMP8 マウス共に認められなかった。これらのことから、口蓋粘膜の侵害機械刺激に対する疼痛感受性は、炎症時では TRPV1 が関与し、非炎症時では、TRPV1 以外の要因が関与していると推察された。以上のことより、若齢 SAMP8 マウスの口蓋粘膜の侵害熱刺激時の疼痛感受性は、口蓋粘膜を神経支配する小型の TG ニューロンの TRPV1 発現に依存することが示唆された。

老化による口蓋粘膜の疼痛感受性の変化に対し、TRPV2 の関与を検討したところ、老齢 SAMP8 マウスでは、若齢 SAMP8 マウスと比較して口蓋粘膜を神経支配する中型の TRPV2 陽性 TG ニューロンが有意に多く、Tranilast を投与した際の HHWT および MHWT は、老齢 SAMP8 マウスでは有意な上昇を認めたが、若齢 SAMP8 マウスでは有意な変化を認めなかった。TRPV2 は、主に有髄の A δ 線維を含んだ中型から大型

の TG ニューロンおよび DRG ニューロンに多く発現することが報告されている^{12, 38, 39)}。TRPV2 発現と老化の関連においては、非神経細胞では TRPV2 発現の増加が報告されているが^{43, 44)}、ニューロンにおける TRPV2 発現に対する老化の影響は明確ではない。老化による神経変性時には、中枢神経系にアミロイド β の沈着が生じ、ニューロンへのアミロイド β の沈着処置を施したラットの海馬では、TRPV2 の mRNA およびタンパク質の発現が増加すると報告されている⁴⁵⁾。SAMP8 マウスでは、老化の進行により中枢のニューロンにアミロイド沈着が生じることが明らかとなっていることから⁴⁶⁾、老化による神経変性時には、ニューロンでの TRPV2 発現は増加する可能性が考えられた。老化によるニューロンでの TRPV2 発現の変化が疼痛感受性に影響を与えるかについてはいまだ不明であるが、末梢の炎症によって誘発された DRG ニューロンにおける TRPV2 陽性ニューロン数の増加は、四肢の熱痛覚過敏を惹起することが報告されている⁴⁷⁾。また、顎顔面領域の炎症時において、TRPV2 陽性 TG ニューロンの増加により、熱痛覚過敏および機械アロディニアが誘発され、これに対して TRPV2 の拮抗薬を投与すると痛覚過敏およびアロディニアが減弱することが報告されている⁴⁸⁾。したがって、老化による TRPV2 陽性 TG ニューロン数の増加は、口蓋粘膜の疼痛感受性に影響を与え、閾値の変化に関与すると考えられる。本研究の結果、老齢 SAMP8 マウスは、若齢 SAMP8 マウスと比較して TRPV1 陽性 TG ニューロン数は少なく、TRPV2 陽性 TG ニューロン数は多く認められ、侵害熱刺激による HHWT は若齢 SAMP8 マウスよりも有意な上昇を認めた。このことから、老齢 SAMP8 マウスの口蓋粘膜の侵害熱刺激の受容は、TRPV1 よりも活性化温度の高い TRPV2 への依存が高いと考えられる。以上のことより、老齢 SAMP8 マウスにおける口蓋粘膜の侵

害熱および機械刺激に対する疼痛感受性は、口蓋粘膜を神経支配する中型の TG ニューロンの TRPV2 発現に強く依存していることが示唆された。

結 論

老化による口腔粘膜の疼痛感受性の変化に対し、口蓋粘膜を支配する TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現様相について検討した結果、以下に示す結論を得た。

1. 老齢 SAMP8 マウスは若齢 SAMP8 マウスと比較して、口蓋粘膜の HHWT の有意な上昇と、MHWT の有意な低下を認めた。
2. 若齢 SAMP8 マウスは、老齢 SAMP8 マウスと比較して小型の TRPV1 陽性 TG ニューロンが有意に多く、老齢 SAMP8 マウスでは、若齢 SAMP8 マウスと比較して中型の TRPV2 陽性 TG ニューロンが有意に多く発現した。
3. SB366791 投与により、若齢 SAMP8 マウスは、HHWT の有意な上昇を認めたが、老齢 SAMP8 マウスでは、有意な変化は認められなかった。
4. Tranilast 投与により、若齢 SAMP8 マウスは、HHWT および MHWT の有意な変化は認められなかったが、老齢 SAMP8 マウスでは、HHWT および MHWT の有意な上昇を認めた。

以上より、老化が TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現に影響を及ぼすことで、口腔粘膜の熱および機械刺激に対する疼痛感受性は変化することが示唆された。

謝 辞

日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の飯沼利光教授，日本大学歯学部生理学講座の篠田雅路教授，日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座の浦田健太郎助教に，多大なるご指導を賜りましたことに対し，この誌上を持ちまして深く感謝の意を申し上げます。

文 獻

1. Chao C.C, Hsieh S.T, Chiu M.J, Tseng M.T, Chang Y.C (2007) Effects of aging on contact heat-evoked potentials: the physiological assessment of thermal perception. *Muscle Nerve*, 36, 30-38.
2. Daguët I, Bergeron-Vezina K, Harvey M.P, Martel M, Coulombe-Leveque A, Leonard G (2020) Decreased initial peak pain sensation with aging: A psychophysical study. *J Pain Res*, 13, 2333-2341.
3. Gibson S.J, Farrell M (2004) A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *Clin J Pain*, 20, 227-239.
4. Lautenbacher S, Kunz M, Strate P, Nielsen J, Arendt-Nielsen L (2005) Age effects on pain thresholds, temporal summation and spatial summation of heat and pressure pain. *Pain*, 115, 410-418.
5. Lautenbacher S, Peters J.H, Heesen M, Scheel J, Kunz M (2017) Age changes in pain perception: A systematic-review and meta-analysis of age effects on pain and tolerance thresholds. *Neurosci Biobehav Rev*, 75, 104-113.
6. Ebihara S, Kohzuki M, Sumi Y, Ebihara T (2011) Sensory stimulation to improve swallowing reflex and prevent aspiration pneumonia in elderly dysphagic people. *J Pharmacol Sci*, 115, 99-104.

7. Kaplan I, Levin T, Papoiu A.D, Patel N, Patel T, Calderon S, Littner M, McGlone F, Yosipovitch G (2011) Thermal sensory and pain thresholds in the tongue and chin change with age, but are not altered in burning mouth syndrome. *Skin Res Technol*, 17, 196-200.
8. Ferrandiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf C.J, Devesa I, Ferrer-Montiel A (2014) Trafficking of thermo TRP channels. *Membranes (Basel)*, 4, 525-564.
9. McEntire D.M, Kirkpatrick D.R, Dueck N.P, Kerfeld M.J, Smith T.A, Nelson T.J, Reisbig M.D, Agrawal D.K (2016) Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Rev Clin Pharmacol*, 9, 1069-1080.
10. Mickle A.D, Shepherd A.J, Mohapatra D.P (2016) Nociceptive TRP channels: Sensory detectors and transducers in Multiple pain pathologies. *Pharmaceuticals (Basel)*, 9, 72.
11. Shibasaki K (2016) Physiological significance of TRPV2 as a mechanosensor, thermosensor and lipid sensor. *J Physiol Sci*, 66, 359-365.
12. Caterina M.J, Rosen T.A, Tominaga M, Brake A.J, Julius D (1999) A capsaicin- receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature*, 398, 436-441.
13. Tominaga M, Caterina M.J (2004) Thermosensation and pain. *J Neurobiol*, 61, 3-12.
14. Kido M.A, Muroya H, Yamaza T, Terada Y, Tanaka T (2003) Vanilloid receptor expression in the rat tongue and palate. *J Dent Res*, 82, 393-397.
15. Wang B, Danjo A, Kajiya H, Okabe K, Kido M.A (2011) Oral epithelial cells are activated via TRP channels. *J Dent Res*, 90, 163-167.

16. Maruno M, Shinoda M, Honda K, Ito R, Urata K, Watanabe M, Okada S, Lee J, Gionhaku N, Iwata K (2017) Phosphorylation of p38 in trigeminal ganglion neurons contributes to tongue heat hypersensitivity in mice. *J Oral Facial Pain Headache*, 31, 372-380.
17. Urata K, Shinoda M, Honda K, Lee J, Maruno M, Ito R, Gionhaku N, Iwata K (2015) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res*, 94, 446-454.
18. Urata K, Shinoda M, Ikutame D, Iinuma T, Iwata K (2018) Involvement of transient receptor potential vanilloid 2 in intra-oral incisional pain. *Oral Dis*, 24, 1093-1100.
19. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K, Hosono M, Akiguchi I, Katoh H (1994) A novel murine model of aging, Senescence-Accelerated Mouse (SAM). *Arch Gerontol Geriatr*, 19, 185-192.
20. Takeda T (2009) Senescence-accelerated mouse (SAM) with special references to neurodegeneration models, SAMP8 and SAMP10 mice. *Neurochem Res*, 34, 639-659.
21. Liu B, Liu J, Shi J.S (2020) SAMP8 mice as a model of age-related cognition decline with underlying mechanisms in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 75, 385-395.
22. Fernandez-Gomez F.J, Munoz-Delgado E, Montenegro M.F, Campoy F.J, Vidal C.J, Jordan J (2010) Cholinesterase activity in brain of senescence-accelerated-resistant mouse SAMR1 and its variation in brain of senescence-accelerated-prone mouse SAMP8. *J Neurosci Res*, 88, 155-166.
23. Akiguchi I, Pallas M, Budka H, Akiyama H, Ueno M, Han J, Yagi H, Nishikawa T, Chiba Y, Sugiyama H, Takahashi R, Unno K, Higuchi k, Hosokawa M (2017) SAMP8 mice as a

- neuropathological model of accelerated brain aging and dementia: Toshio Takeda's legacy and future directions. *Neuropathology*, 37, 293-305.
24. Ikutame D, Urata K, Oto T, Fujiwara S, Iinuma T, Shibuta I, Hayashi Y, Hitomi S, Iwata K, Shinoda M (2020) Aging-related phenotypic conversion of medullary microglia enhances intraoral incisional pain sensitivity. *Int J Mol Sci*, 21, 7871.
 25. Fujibayashi Y, Waki A, Wada K, Ueno M, Magata Y, Yonekura Y, Konishi J, Takeda T, Yokoyama A (1994) Differential aging pattern of cerebral accumulation of radiolabeled glucose and amino acid in the senescence accelerated mouse (SAM), a new model for the study of memory impairment. *Biol Pharm Bull*, 17, 102-105.
 26. Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*, 16, 109-110.
 27. Park U, Vastani N, Guan U, Raja S.N, Koltzenburg M, Caterina M.J (2011) TRP vanilloid 2 knock-out mice are susceptible to perinatal lethality but display normal thermal and mechanical nociception. *J Neurosci*, 31, 11425-11436.
 28. Huang D, Li S, Dhaka A, Story G.M, Cao Y (2012) Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Mol Pain*, 8, 66.
 29. Barabas M.E, Stucky C.L (2013) TRPV1, but not TRPA1, in primary sensory neurons contributes to cutaneous incision-mediated hypersensitivity. *Mol Pain*, 9, 9.
 30. Kunimoto M (2012) The peripheral mechanism of physiological pain. *Brain Nerve*, 64, 1205-1214.

31. Baron R, Hans G, Dickenson A.H (2013) Peripheral input and its importance for central sensitization. *Ann Neurol*, 74, 630-636.
32. Iyengar S, Ossipov M.H, Johnson K.W (2017) The role of calcitonin gene-related peptide in peripheral and central pain mechanisms including migraine. *Pain*, 158, 543-559.
33. Treede R.D, Meyer R.A, Raja S.N, Campbell J.N (1995) Evidence for two different heat transduction mechanisms in nociceptive primary afferents innervating monkey skin. *J Physiol*, 483 (Pt 3), 747-758.
34. Chakour M.C, Gibson S.J, Bradbeer M, Helme R.D (1996) The effect of age on A delta- and C-fibre thermal pain perception. *Pain*, 64, 143-152.
35. Namer B (2010) Age related changes in human C-fiber function. *Neurosci Lett*, 470, 185-187.
36. Taguchi T, Ota H, Matsuda T, Muras S, Mizumura K (2010) Cutaneous C-fiber nociceptor responses and nociceptive behaviors in aged Sprague-Dawley rats. *Pain*, 151, 771-782.
37. Tominaga M, Caterina M.J, Malmberg A.B, Rosen T.A, Gilbert H, Skinner K, Raumann, B.E, Basbaum A.I, Julius D (1998) The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
38. Benham C.D, Gunthorpe M.J, Davis J.B (2003) TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium*, 33, 479-487.
39. Basbaum A.I, Bautista D.M, Scherrer G, Julius D (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.

40. Vang H, Chung G, Kim H.Y, Park S.B, Jung S.J, Kim J.S, Oh S.B (2012) Neurochemical properties of dental primary afferent neurons. *Exp Neurobiol*, 21, 68-74.
41. Mitsuoka K, Kikutani T, Miwa Y, Sato I (2018) Expression of CGRP neurotransmitter and vascular genesis marker mRNA is age-dependent in superior cervical ganglia of senescence-accelerated prone mice. *Neurosci Lett*, 664, 144-151.
42. Wang S, Albers K.M (2009) Behavioral and cellular level changes in the aging somatosensory system. *Ann N Y Acad Sci*, 1170, 745-749.
43. Iwata Y, Ohtake H, Suzuki O, Matsuda J, Komamura K, Wakabayashi S (2013) Blockade of sarcolemmal TRPV2 accumulation inhibits progression of dilated cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*, 99, 760-768.
44. Eubler K, Rantakari P, Gerke H, Herrmann C, Missel A, Schmid N, Walenta L, Lahiri S, Imhof A, Strauss L, Poutanen M, Mayerhofer A (2021) Exploring the ion channel TRPV2 and testicular macrophages in mouse testis. *Int J Mol Sci*, 22, 4727.
45. Thapak P, Bishnoi M, Sharma S.S (2021) Tranilast, a transient receptor potential vanilloid 2 channel (TRPV2) inhibitor attenuates amyloid beta-induced cognitive impairment: Possible Mechanisms. *Neuromolecular Med*.
46. del Valle J, Duran-Vilaregut J, Manich, G, Pallas M, Camins A, Vilaplana J, Pelegri C (2011) Cerebral amyloid angiopathy, blood-brain barrier disruption and amyloid accumulation in SAMP8 mice. *Neurodegener Dis*, 8, 421-429.
47. Shimosato G, Amaya F, Ueda M, Tanaka Y, Decosterd I, Tanaka M (2005) Peripheral inflammation induces up-regulation of TRPV2 expression in rat DRG. *Pain*, 119, 225-232.

48. Sugawara S, Shinoda M, Hayashi Y, Saito H, Asano S, Kubo A, Shibuta L, Furukawa A, Toyofuku A, Iwata K (2019) Increase in IGF-1 expression in the injured infraorbital nerve and possible implications for orofacial neuropathic pain. *Int J Mol Sci*, 20, 6360.

図

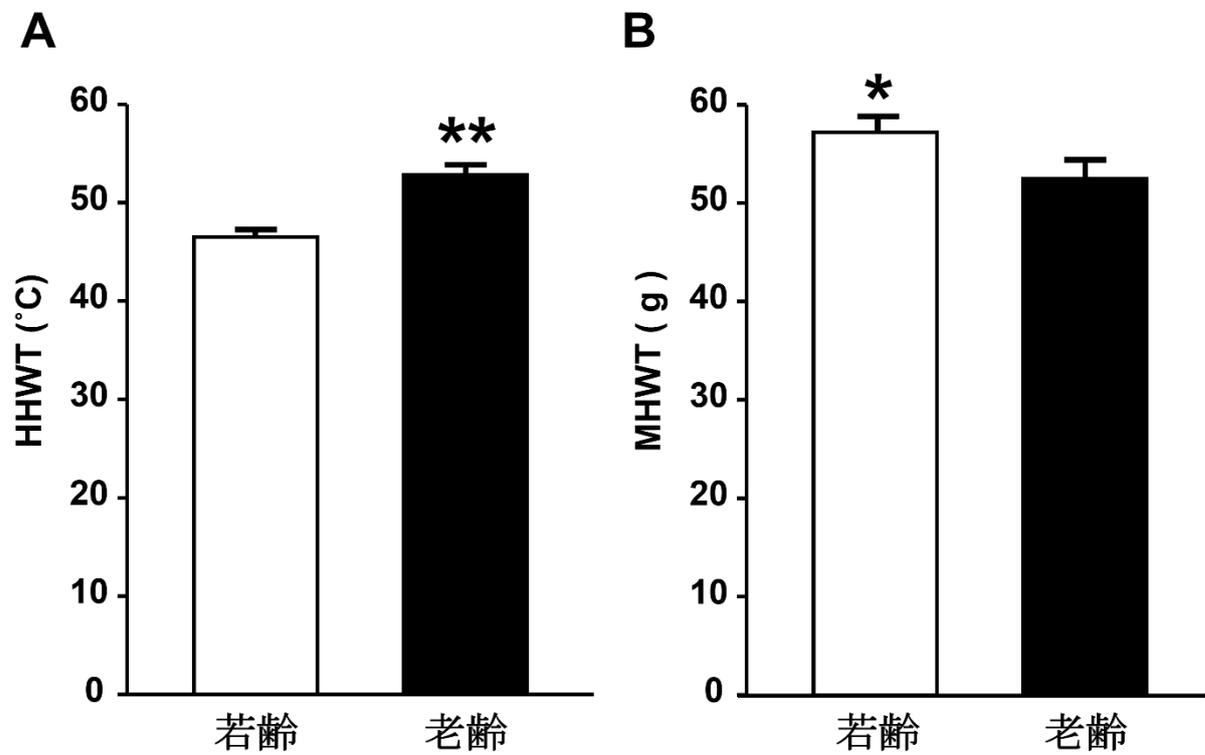


図 1 口蓋粘膜の熱および機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値

A: 熱刺激に対する頭部引っ込め反射閾値 (HHWT)

B: 機械刺激に対する頭部引っ込め反射閾値 (MHWT)

($n = 5$, in each) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

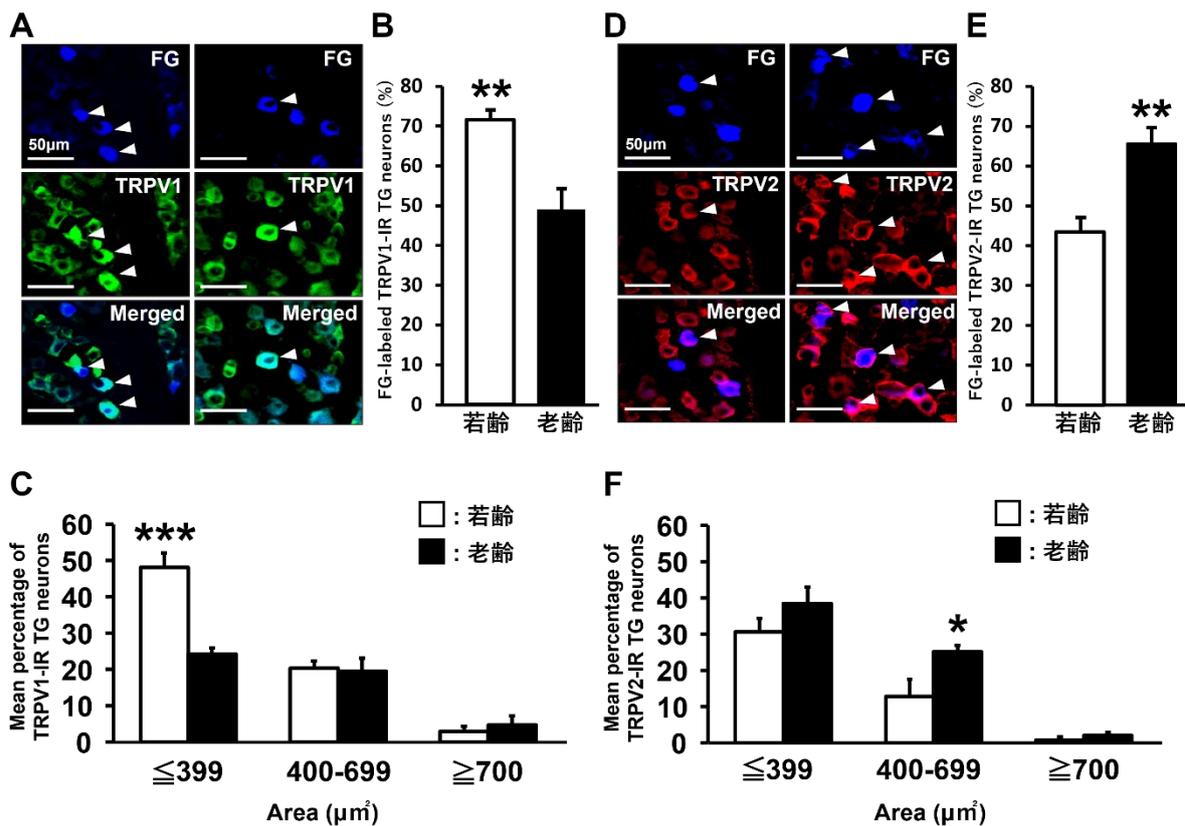


図 2 TG ニューロンにおける TRPV1 および TRPV2 発現

A : FG 標識 TG ニューロン (青), TRPV1 陽性 TG ニューロン (緑), 矢頭 : FG 標識 TRPV1 陽性 TG ニューロン, 若齢 SAMP8 マウス (左), 老齢 SAMP8 マウス (右)

B : $(\text{FG 標識 TRPV1 陽性 TG ニューロンの総数}) / (\text{FG 標識 TG ニューロンの総数}) \times 100$

C : $(\text{各細胞径の FG 標識 TRPV1 陽性 TG ニューロンの総数}) / (\text{FG 標識 TRPV1 陽性 TG ニューロンの総数}) \times 100$

D : FG 標識 TG ニューロン (青), TRPV2 陽性 TG ニューロン (赤), 矢頭 : FG 標識 TRPV2 陽性 TG ニューロン, 若齢 SAMP8 マウス (左), 老齢 SAMP8 マウス (右)

E : $(\text{FG 標識 TRPV2 陽性 TG ニューロンの総数}) / (\text{FG 標識 TG ニューロンの総数}) \times 100$

F : $(\text{各細胞径の FG 標識 TRPV2 陽性 TG ニューロンの総数}) / (\text{FG 標識 TRPV2 陽性 TG ニューロンの総数}) \times 100$ ($n=5$, in each) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Scale bar : $50 \mu\text{m}$. IR : immunoreactive

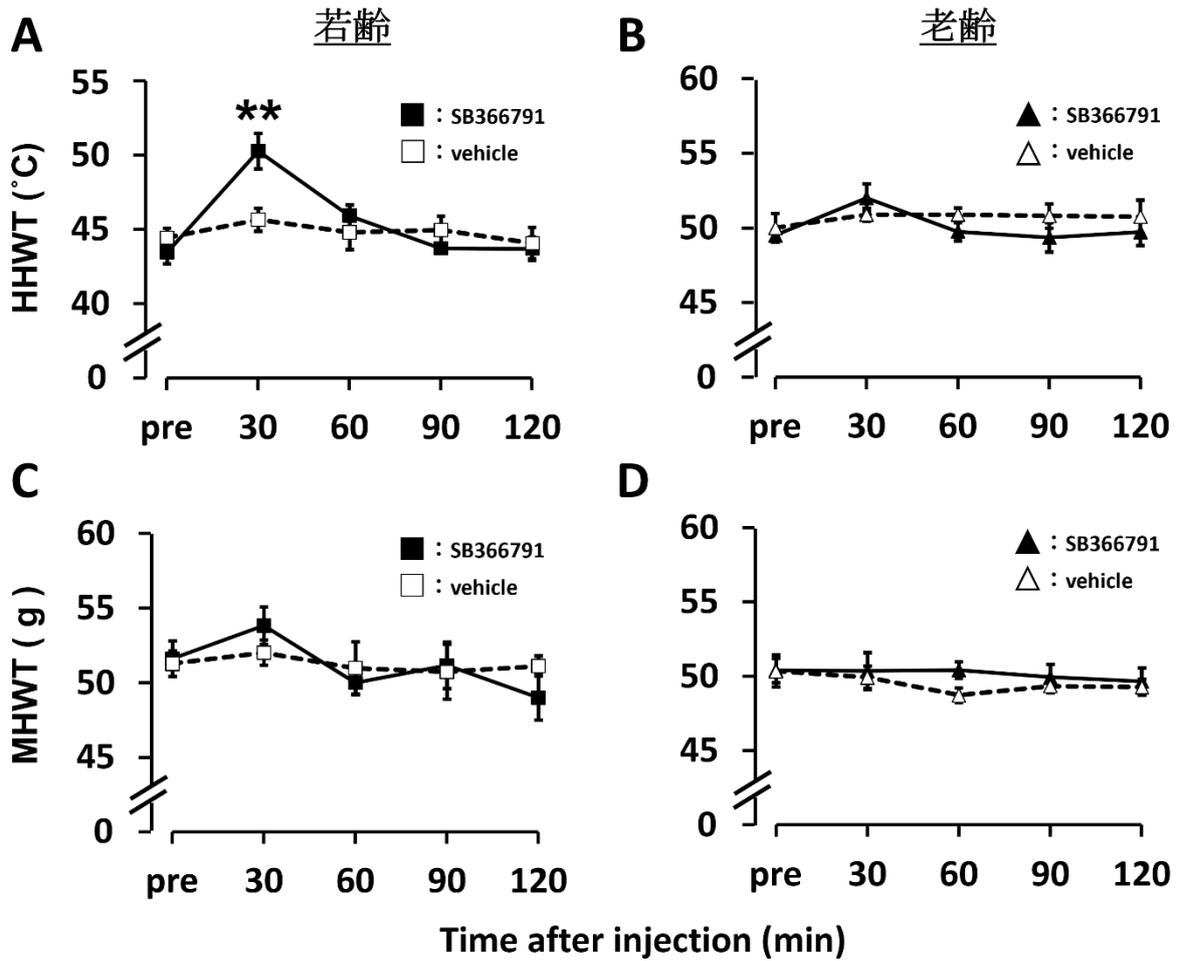


図 3 SB366791 口蓋粘膜投与による HHWT および MHWT の経時的変化

A : 若齡 SAMP8 マウスへの SB366791 投与による HHWT の経時的変化 B : 老齡 SAMP8 マウスへの SB366791 投与による HHWT の経時的変化 C : 若齡 SAMP8 マウスへの SB366791 投与による MHWT の経時的変化 D : 老齡 SAMP8 マウスへの SB366791 投与による MHWT の経時的変化

($n = 5$, in each) ** $p < 0.01$. pre : 投与前

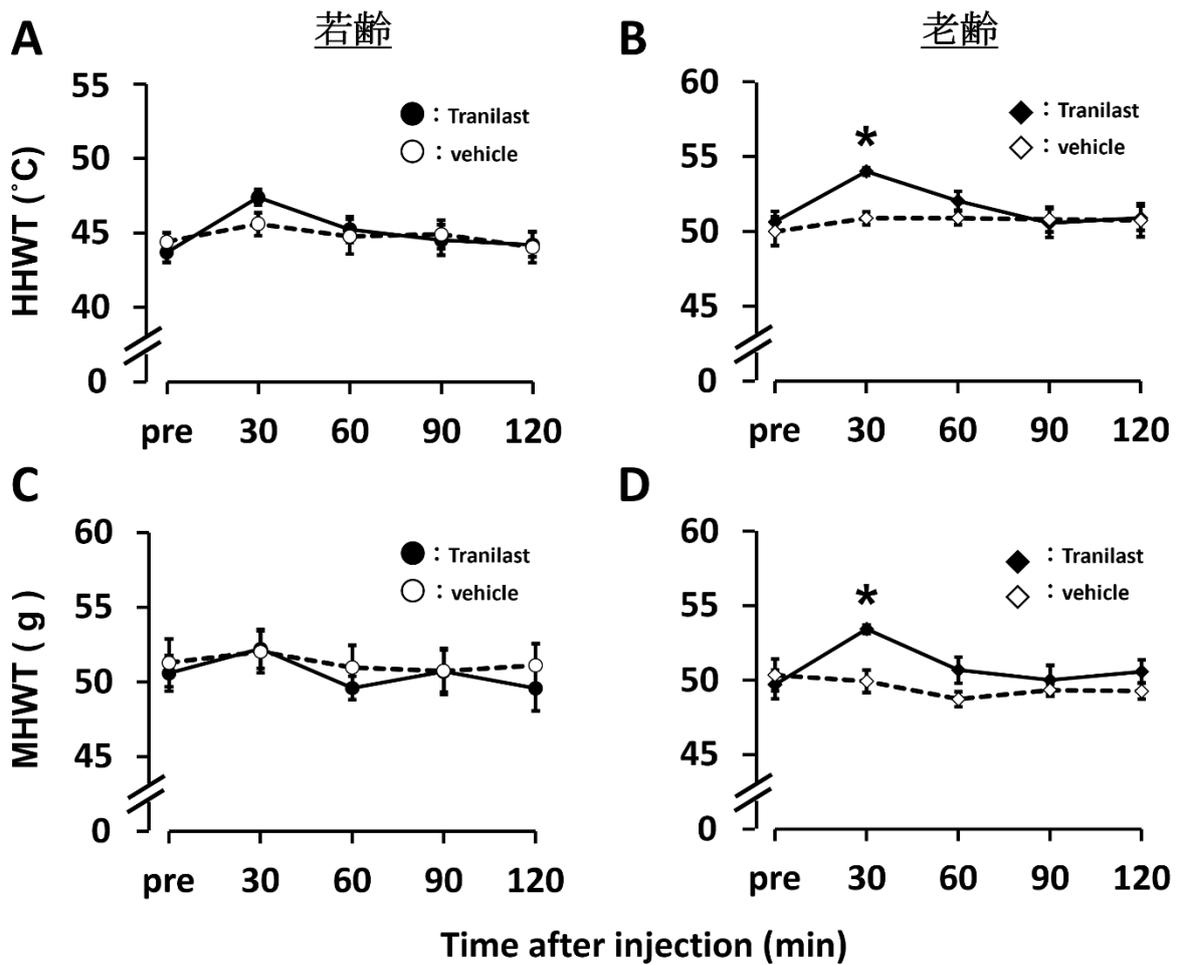


図 4 Tranilast 口蓋粘膜投与による HHWT および MHWT の経時的変化

A : 若齡 SAMP8 マウスへの Tranilast 投与による HHWT の経時的変化 B : 老齡

SAMP8 マウスへの Tranilast 投与による HHWT の経時的変化 C : 若齡 SAMP8 マウ

スへの Tranilast 投与による MHWT の経時的変化 D : 老齡 SAMP8 マウスへの

Tranilast 投与による MHWT の経時的変化

($n = 5$, in each) * $p < 0.05$. pre : 投与前