

舌癌により発症する舌痛覚過敏に対するマイクログリア P2X₇ 受容体の関与

玉 川 崇 皓

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 米原啓之 教授, 岩田幸一 教授, 篠田雅路 准教授)

要旨: 口腔癌性疼痛がいかなるメカニズムで発症するかを明らかにする目的で, 舌癌疼痛モデルラットを作成し, 三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)におけるマイクログリア P2X₇ 受容体の発現機構を形態学的に解析した。扁平上皮癌(SCC)細胞をラット舌の側縁に接種したものを SCC 群, 溶媒である 0.1 M phosphate buffer saline(PBS)を接種したものを PBS 群として実験を行った。浅麻酔下においてラット舌へ機械刺激を加え, それらに対する機械頭部引込め反射閾値(MHWT)を測定した。また, SCC 接種 14 日後に Vc における活性化マイクログリアと P2X₇ 受容体の発現を, 免疫組織化学的に検索した。選択的 P2X₇ 受容体アンタゴニスト(A-438079)を持続的に髄腔内投与した SCC ラットについても MHWT の解析を行った。SCC 接種 14 日後にマイクログリアの顕著な活性化が認められた。一方, A-438079 を髄腔内投与したラットでは SCC 接種 3 日後まで MHWT の低下およびマイクログリア活性化の有意な抑制が認められたが, 14 日後では再び MHWT の低下およびマイクログリアの活性化を認めた。以上のことから, 舌の癌性疼痛の初期段階では P2X₇ 受容体を介して Vc に存在するマイクログリアが活性化し, さらに何らかの作用によって Vc の侵害受容ニューロン活動が亢進し, 腫瘍が発育・増大するに従って病的な舌に異常疼痛が発症する可能性が示された。

キーワード: P2X₇ 受容体, マイクログリア, 舌扁平上皮癌, 延髄, 舌痛

緒 言

口腔癌は咀嚼や嚥下などの重要な機能を低下させ, それらの機能が欠如することにより患者の QOL は著しく損なわれる¹⁾。口腔癌に伴う痛みで苦しむ患者に適切な治療と QOL の向上の為に口腔癌に起因する病的疼痛の発症メカニズムを明らかにすることは極めて重要である²⁾。神経障害性あるいは炎症性疼痛のメカニズムが口腔の癌性疼痛に関与していることは広く知られている³⁾。口腔領域に炎症が引き起こされる, あるいは三叉神経が傷害を受けると, 三叉神経節(TG)ニューロンは強く活性化して興奮性が異常に増加し, 末梢神経系が過敏状態に陥る^{4,5)}。

顔面領域の炎症または三叉神経損傷に引き続き, TG ニューロンには高頻度の活動電位が発生し, さらに, 高頻度の活動電位は中枢神経系に伝えられ, 三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)の侵害受容ニューロンの興奮性増強を誘導し, Vc 侵害受容ニューロンの中樞性感作を引き起こすことが知られている^{6,8)}。顔面領域の炎症, 三叉神経傷害や口腔癌モデルラットの Vc において, マイクログリアとアストロサイトが活性化することが知られている⁹⁻¹¹⁾。これまでの脊髄後角(SDH)をターゲットにした研究では, 活性化したマイクログリアは brain-derived neurotrophic factor(BDNF)を放出し, 放出された BDNF は SDH ニューロンにおける tropomyosin 受容体

キナーゼ B(TrkB)と結合し, これらのニューロンの過興奮を引き起こすことが知られている^{12,13)}。以上の研究結果を勘案すると, 舌の腫瘍が増大するとともに Vc におけるマイクログリアの活性化が亢進し, このメカニズムによって Vc 侵害受容ニューロンの中樞感作が誘導され, 結果的に舌の痛覚過敏が引き起こされる可能性があると考えられる。

P2X₇ 受容体はアデノシン三リン酸(ATP)受容体ファミリーの一つとして, 情報伝達に対する重要な機能を持っており, SDH における様々な細胞の中で ATP と結合することにより活性化する¹⁴⁾。最近の報告ではマイクログリアに発現する P2X₇ 受容体が坐骨神経損傷後あるいは骨癌において SDH におけるマイクログリアの活性化に関与することが知られている^{15,16)}。しかしながら, P2X₇ 受容体を介した情報伝達がどのように癌性疼痛の発症メカニズムに関与するかは完全には理解されていない。

そこで本研究ではラットの舌に扁平上皮癌(SCC)細胞を接種して舌癌モデルラットを作製し, 舌への機械刺激により引き起こされる頭部引込め反射閾値(MHWT)を解析することにより機械痛覚過敏を行動学的に明らかにした。さらに Vc に存在するマイクログリアに着目し, 活性型マイクログリアおよび P2X₇ 受容体の発現状態を解析し, P2X₇ 受容体を介したメカニズムが口腔の癌性疼痛に関係しているかどうかを解明することを目的とした。

(受付: 平成 28 年 1 月 27 日)

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

材料及び方法

1. 実験動物

実験には Fischer 系雄性ラット 6 週齢 ($n = 118$) を用いた。ラットは 12 時間明暗サイクルで恒温恒湿の環境下におき、十分な飼料と水で飼育した。実験に際し、動物の苦痛を最少限にするよう配慮し、動物数は必要最少限とした。本実験は日本大学歯学部動物実験委員会の承認を受け (承認番号: AP15 D0024)、実験動物の取り扱い は国際疼痛学会の指針に従った¹⁷⁾。

2. 舌癌モデルの作製

Sodium pentobarbital (50 mg/kg.i.p.) でラットを麻酔し、開口させ舌を引き出した後に SCC 細胞 (SCC-158, JCRB) の懸濁液 (SCC 細胞 5×10^6 を 0.1 M phosphate buffer saline (PBS) に攪拌したもの) を 30 μ l 26 G 針で舌左側縁部、先端から 5 mm 後方の位置に接種した (SCC 群)。対照として 0.1 M PBS を vehicle として用い、同様の方法で行った (PBS 群)。

3. 舌の MHWI の測定

Isoflurane 2% (Mylan) 浅麻酔下において、機械刺激を舌左側縁部、先端から 5 mm 後方の接種部位にデジタルピンチを用いて加え、それらに対する MHWI の測定を行った^{18,19)}。Isoflurane 2% を吸入させた後に側臥位に寝かせ、麻酔深度を左側後肢のピンチ刺激により弱い屈曲反射が生じるレベルとし、実験中はこのレベルを維持した。また、機械刺激強度は 0-150 g (cutoff 値 150 g) とした。ラットの舌を口腔外に引き出し、機械刺激強度を徐々に増加させ、頭部引込め反射が見られた所で刺激を止め、この時の刺激強度を MHWI とした。同一個体で接種前、接種 3, 14, 21 日後において各 3 回ずつ計測を行い、その平均値を MHWI として算出した。

4. 免疫組織学的染色

Naïve ラット、SCC あるいは vehicle を接種後 3, 14 日後のラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg.i.p.) で麻酔し、生理的食塩水 (500 ml) で脱血後に 0.1 M phosphate buffer (PB) に溶解した 4% paraformaldehyde 固定液 (pH 7.4) で灌流固定を行った。その後、延髄を摘出し、4% paraformaldehyde にて 4℃ で 48 時間浸漬した後固定を行った。その後標本を 12 時間 20% スクロースに浸漬した後に -80℃ 環境下で、クライオスタット (CM1850, Leica) を用いて obex から ± 1 mm の部位で 30 μ m の間隔で連続凍結切片を作製し、5 切片毎に 1 切片取り出し、以下の方法に従って免疫組織学的染色を行った。

70℃ で抗原を賦活化させた後に 0.3% TritonX-100 in 0.01 M PBS containing 4% normal donkey serum にてブロッキングを行い、4℃ 下にて一次抗体として rabbit anti-P2X₇R polyclonal antibody (1:100; Abcam) および

goat anti-ionized calcium-binding adaptor molecule-1 (Iba1) polyclonal antiserum (1:500; Wako Chemicals), rabbit anti-gial fibrillary acidic protein (GFAP) antibody (1:1000; Chemicon) または mouse anti-NeuN monoclonal antibody (1:1000; Millipore) に 24 時間インキュベートさせた。0.01 M PBS で 10 分間 3 回洗浄し、二次抗体 Alexa Fluor 488 anti-rabbit IgG (1:200 in 0.01 M PBS; Invitrogen), Alexa Fluor 568 anti-goat IgG (1:200 in 0.01 M PBS; Invitrogen) and/or Alexa Fluor 568 anti-mouse IgG (1:200 in 0.01 M PBS; Invitrogen) に 2 時間、切片を遮光下に常温でインキュベートした。0.01 M PBS で 10 分間 3 回洗浄後、切片を封入して二重標識細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-9000, Keyence) にて観察した。Noma らの報告²⁰⁾により舌の侵害刺激一次ニューロンが投射する Vc 領域は特定されているので、本研究ではこの領域に注目し、各切片の舌投射領域に、 $313.37 \times 313.69 \mu\text{m}^2$ の範囲を設定し、その範囲内に発現した Iba1 陽性細胞の密度を、画像解析ソフト (Image J 1.37 v, NIH) を用いて解析した。

5. A-438079 の持続髄腔内投与

ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg.i.p.) で麻酔し、頭頂部から尾側へ 20 mm の皮膚切開を加え、後頭骨を露出し直径 2 mm の小孔を開け、ポリエチレンチューブ (直径 0.8 mm, ナツメ) を髄腔に挿入して髄腔内に薬剤の連続投与を行った。選択的 P2X₇ 受容体アンタゴニスト (A-438079, 5 mM, 0.5 μ l/day, Tocris) を 0.01 M PBS に溶解させ、浸透圧ミニポンプ (Alzet model 2002, Durect Corporation) を用いて SCC 接種 14 日後まで持続髄腔内投与を行った。A-438079 を投与した SCC 群 MHWI の測定は前述の方法と同様に行った。

6. 統計解析

全てのデータは平均値 \pm 標準誤差で表し、有意差の検定には Student's *t*-test, one-way or two-way repeated-measures analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's multiple-comparison test を用いた。有意水準は $P < 0.05$ とした。

結 果

1. 舌の MHWI

SCC 群あるいは PBS 群は、共に接種 3 日後には MHWI の有意な低下を示した。また、SCC 群の MHWI は接種 14 日後以降でも有意に低下していたのに対し、PBS 群では接種後 14 日を経過すると、有意な回復を示していた (第 1 図)。

2. Vc における P2X₇, Iba1, GFAP および NeuN 発現

本研究では Iba1 をマクログリアの活性化マーカーとして用いた。SCC 接種後 3 日を経過すると、Vc 背側部の比較的限局した領域に多数の Iba1 陽性細胞集団お

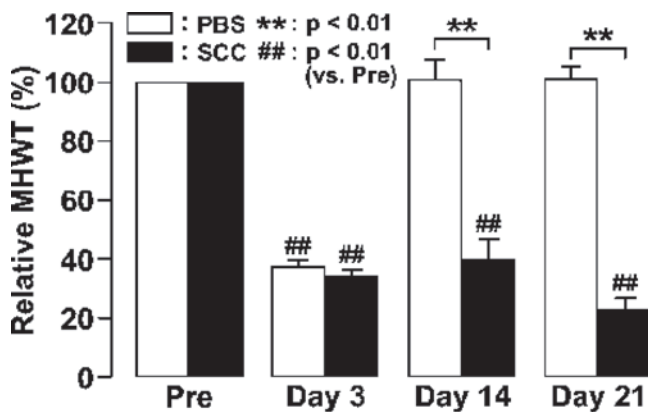
よび GFAP 陽性細胞集団が認められた(第2図 B, E)。NeuN 陽性細胞は切片全体に一樣に多数分布していた(第2図 H)。さらに、それぞれの陽性細胞において、Iba1, GFAP および NeuN と P2X₇ の共存性について検索した。その結果、Iba1 と P2X₇ が Vc において多数の細胞で共存を示した。また、NeuN 陽性細胞の中には Iba1 陽性を示す細胞が少数ではあるが認められた。これに対し、GFAP と P2X₇ が共存する細胞は全く検出されなかった(第2図 C, F, I の白色矢印で示した細胞)。

3. Vc における P2X₇, Iba1, GFAP および NeuN 陽性細胞数の比較

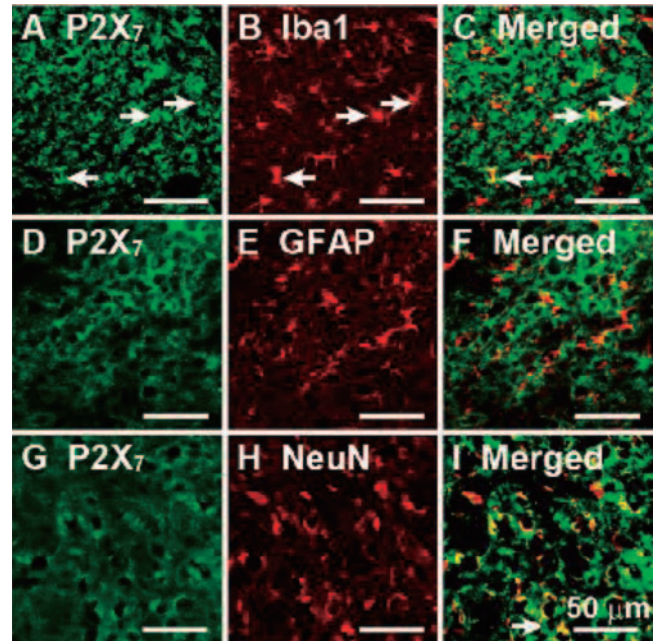
SCC 群においては、接種後3日目および14日目で、naïve に比べ有意な Iba1 陽性細胞の平均領域の増大を認めた。一方、vehicle を接種した群では、接種後3日目には naïve 群に比べ有意な Iba1 陽性細胞の平均領域の増大を認めたのに対し、14日目においては naïve と比較して有意差は認められなかった(第3図 A)。P2X₇ のアンタゴニストである A-438079 投与の髄腔内投与により、SCC 接種後3日目においては、Iba1 陽性細胞の平均領域は有意に減少したのに対し、14日目においては SCC 接種後3日目と比較して発現領域は有意に増大していた。SCC 接種群のラットに vehicle を投与しても、接種後3日目および14日の両日で有意な差は認めなかった。PBS 群に vehicle を投与すると、3日目に比べ14日目には Iba1 陽性細胞の平均領域は有意に減少していた。(第3図 B)

4. A-438079 投与の機械痛覚過敏に対する影響

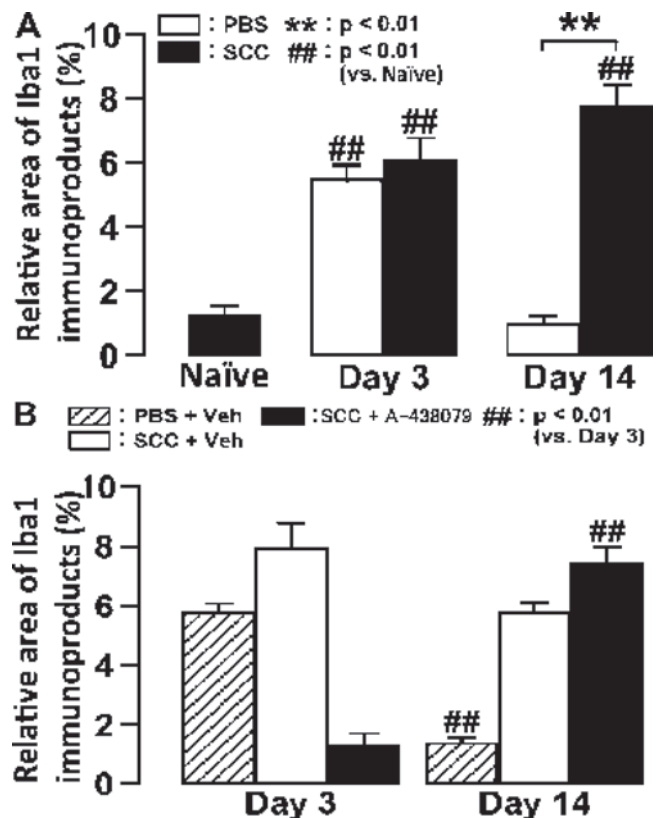
A-438079 投与により SCC 接種3日後の MHWT の低下は有意に抑制されたが、14日後では vehicle を投与した SCC ラットと同程度の値を示した(第4図)。また、vehicle を投与した PBS 群においては、MHWT は3日後では接種前と比較し有意に低下したが、14日後には有意な低下は認められなかった。



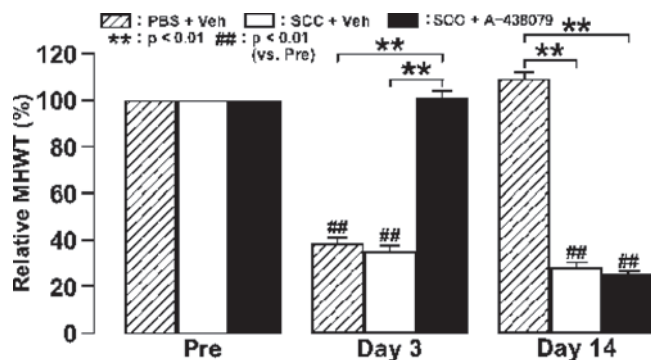
第1図 ラットの舌に SCC, vehicle(PBS) を接種する前(Pre)、接種後3, 14, 21 日目の舌の MHWT



第2図 SCC 接種14日後の Vc における P2X₇ 受容体(A, D, G), Iba1 陽性細胞(B), GFAP 陽性細胞(E), NeuN 陽性細胞(H), およびそれぞれの Merge(C, F, I)の組織標本写真



第3図 SCC, vehicle(PBS)接種3, 14日後および naïve の Vc における Iba1 陽性細胞が占める領域の比較(A) SCC を接種し、A-438079 あるいは vehicle(PBS) を14日間持続髄腔内投与したモデルの Vc における Iba1 陽性細胞が占める領域の比較(B)



第4図 PBS接種し vehicle(PBS)を14日間持続髄腔内投与したモデル(PBS + Veh), SCC接種し, A-438079あるいは vehicleを14日間持続髄腔内投与したモデル(SCC + A-438079, SCC + Veh)の直前(Pre)および接種後3, 14日目の舌のMHWT

考 察

1. 舌癌モデル

舌癌は口腔癌の中で最も多く見られるもので, 患者のQOLを著しく低下させる。その一因として癌性疼痛が挙げられるが, その原因として腫瘍の増大による周囲組織への浸潤による炎症あるいは神経傷害が関与していると考えられている。また, 一般に舌癌の多くは扁平上皮癌であり, 非常に悪性度が高く, 舌の深部組織への強い浸潤を示す癌として知られている¹³⁾。そこで, 本研究では, ヒトの舌癌に近い細胞として知られるSCC-158をラットの舌に接種して舌癌モデルラットを作製し, 舌の癌性疼痛の発症メカニズムの一端を解明することを目的とした。

2. 舌の癌性疼痛に対するマイクログリアの働き

中枢神経系にはマイクログリア, アストロサイト, オリゴデンドロサイトなどのグリア細胞が存在することが知られている, その中でもマイクログリアは中枢神経系のマクロファージとして存在しており, 脊髄後角ニューロンの保護, 栄養供給の役割があると言われている¹³⁾。近年, 中枢や末梢組織の損傷にตอบสนองしてマイクログリアが活性化し, 活性型マイクログリアの作用によって, 二次ニューロンの活動性が亢進して異常疼痛が引き起こされることが報告されている¹⁵⁾。不活性時のマイクログリアは分岐の多い突起を伸ばしたラミファイド型を有しているが, 活性時には太く短い突起を伸ばしたアモイブ型に変化する²¹⁾。これまでは活性型マイクログリア数を算定した研究が多くみられたが, 形態が複雑であるため, 活性型グリア細胞数の正確な算出が不可能であると考えられる。そこで, 本研究では, 活性型マイクログリアのマーカーであるIba1陽性細胞の出現領域の面積を解析した。

末梢神経の傷害や組織の炎症によって, 脊髄あるいは

Vcにおいてマイクログリアやアストログリアの活性化が亢進することが報告されている^{9, 22-25)}。これらの報告によれば, マイクログリアの活性化はアストログリアに比べ非常に早く, 受傷後2日目には多くの活性型マイクログリアが出現するといわれている²⁴⁾。また, マイクログリアは一度活性化されると長期間にわたって活性化状態が続くことも明らかにされている。本研究においても, マイクログリアの活性化マーカーであるIba1は, SCC接種後3日目には有意な発現増加を認め, 14日を経過しても活性化は継続しており, 舌癌モデルにおいてもその時間経過は炎症や神経傷害モデルにおける研究結果と同様であると考えられる。

また本研究結果では, SCCあるいは vehicle を接種したどちらの群も, とともに接種3日後にIba1陽性細胞の有意な平均領域は増大し, 同時にどちらの群においても有意なMHWTの低下を認めた。さらに, PBS群では接種14日後にMHWTの有意な回復およびIba1陽性細胞の平均領域の有意な減少を示したのに対し, SCC群では接種14日後においても, MHWTの有意な低下およびIba1陽性細胞の平均領域の有意な増大が認められた。このような結果から, おそらくPBS群では, 接種後3日目に局所の炎症が引き起こされ, 機械刺激に対する過敏化およびIba1陽性細胞の発現増加が誘導された可能性があると考えられる。一方, SCC群においては接種後3日目においては炎症が引き起こされ, 接種後14日を経過すると, 癌の浸潤による組織破壊や神経損傷が誘導され, MHWTの低下が持続したものと思われる。

3. 舌の癌性疼痛に対するP2X₇受容体の役割

末梢神経傷害や末梢組織の炎症により, 脊髄後角に存在するマイクログリアが活性化することが知られている²⁶⁻²⁸⁾。このマイクログリアの活性化にはATPの受容体であるP2X受容体が関与すると報告されている²⁹⁾。P2X受容体はイオン透過型受容体として知られているが, この受容体の中でも特にP2X₇受容体は炎症性疼痛や神経障害性疼痛に関与していることが知られている^{15, 29)}。しかし, この受容体が癌性疼痛に関与しているかは明らかにされていない。そこで本研究では, P2X₇受容体が舌の癌性疼痛の発症に関与するかどうか, また関与するならば, いかなるメカニズムで関与するかについて解析を行った。

本研究結果では, SCCモデルラットのVcには多くのIba1陽性細胞発現が認められ, さらにP2X₇受容体アンタゴニストであるA-438079を14日間持続髄腔内投与したところ, SCC接種後初期のIba1発現抑制だけでなく低下したMHWTが有意に回復した。これらの結果は, 舌癌に起因する舌痛にはVcにおけるP2X₇受容体を介したマイクログリアの活性化が関与する可能性を示している。このように, 舌の癌性疼痛には炎症性疼痛および

神経障害性疼痛が関与している可能性が考えられるが、SCC 接種後のどの段階から炎症や神経傷害による疼痛から癌細胞そのものに起因した舌痛に移行するのか、あるいは炎症や神経損傷と癌細胞の働きが共同して舌痛が生じるのかを判断する明確な基準が不明なため、舌における癌性疼痛の詳細な発症機構を明らかにするためには、今後さらなる検討が必要であると思われる。

以上より、舌の癌性疼痛の初期段階では P2X₇ 受容体を介して Vc に存在するマイクログリアが活性化し、さらに何らかの作用によって Vc の侵害受容ニューロン活動が亢進し、腫瘍が発育・増大するに従って病的な舌に異常疼痛が発症する可能性が示された。

結 論

舌癌モデルラットにおいて、舌の MHWT、Vc におけるマイクログリアの活性化およびマイクログリアにおける P2X₇ 受容体発現について詳細に検討し、以下の結論を得た。

1. 舌癌モデルラットの舌の MHWT は SCC 接種により有意に低下した。
2. SCC 接種により Vc における活性型マイクログリア発現が有意に増大した。
3. P2X₇ 受容体アンタゴニストの持続髄腔内投与により舌癌モデルラットの舌の MHWT は、舌癌の初期では有意な低下の抑制を認めたが後期には有意な変化は認められなかった。
4. 舌癌モデルラットの Vc には多くの活性型マイクログリアが発現したが、この細胞のほとんどには P2X₇ 受容体が共発現した。
5. P2X₇ 受容体アンタゴニストの持続髄腔内投与により舌癌モデルラットの Vc における活性型マイクログリアは初期では増大の抑制が認められるのに対し、後期では有意な変化は認められなかった。

以上から、SCC 接種による舌癌モデルラットの舌に生じる初期の癌性疼痛は活性型マイクログリアに発現した P2X₇ 受容体が関与することが示された。

本研究の一部は日本大学歯学部佐藤研究費、日本大学歯学部上村安男・治子研究費、日本大学歯学部総合私学研究所一般研究 B の補助により行われた。

文 献

- 1) Benoliel R, Epstein J, Eliav E, Jurevic R, Elad S (2007) Orofacial pain in cancer: part I-mechanisms. *J Dent Res* 86, 491-505.
- 2) Connelly ST, Schmidt BL (2004) Evaluation of pain in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Pain* 5, 505-510.
- 3) Nagamine K, Ozaki N, Shinoda M, Asai H, Nishiguchi H, Mitsudo K, Tohnai I, Ueda M, Sugiura Y (2006) Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia induced by experimental squamous cell carcinoma of the lower gingiva in rats. *J Pain* 7, 659-670.
- 4) Shinoda M, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y (2005) Changes in P2X₃ receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats. *Pain* 116, 42-51.
- 5) Shinoda M, Kawashima K, Ozaki N, Asai H, Nagamine K, Sugiura Y (2007) P2X₃ receptor mediates heat hyperalgesia in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *J Pain* 8, 588-597.
- 6) 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.
- 7) Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M, Shibuta K, Honda K, Katagiri A, Kiyomoto M, Sessle BJ, Matsuura S, Ohara K, Urata K, Iwata K (2013) Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One* 8, e57278.
- 8) 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.
- 9) Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle BJ, Chiang CY, Salter MW, Dostrovsky JO, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y, Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29, 11161-11171.
- 10) Sago T, Ono K, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M, Yoshida M, Shiiba S, Nakanishi O, Matsuo K, Inenaga K (2012) Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model. *Brain Res* 1457, 70-80.
- 11) Old EA, Clark AK, Malcangio M (2015) The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handb Exp Pharmacol* 227, 145-170.
- 12) Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y (2005) BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438, 1017-1021.
- 13) Ren K, Dubner R (2010) Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat Med* 16, 1267-1276.
- 14) Inoue K, Tsuda M (2012) Purinergic systems, neuropathic pain and the role of microglia. *Exp Neurol* 234, 293-301.
- 15) Kobayashi K, Takahashi E, Miyagawa Y, Yamanaka H, Noguchi K (2011) Induction of the P2X₇ receptor in spinal microglia in a neuropathic pain model. *Neurosci Lett* 504, 57-61.

- 16) Yang Y, Li H, Li TT, Luo H, Gu XY, Lu N, Ji RR, Zhang YQ (2015) Delayed activation of spinal microglia contributes to the maintenance of bone cancer pain in female Wistar rats via P2X7 receptor and IL-18. *J Neurosci* 35, 7950-7963.
- 17) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 18) Honda K, Noma N, Shinoda M, Miyamoto M, Katagiri A, Kita D, Liu MG, Sessle BJ, Yasuda M, Iwata K (2011) Involvement of peripheral ionotropic glutamate receptors in orofacial thermal hyperalgesia in rats. *Mol Pain* 7, 75.
- 19) Liu MG, Matsuura S, Shinoda M, Honda K, Suzuki I, Shibuta K, Tamagawa T, Katagiri A, Kiyomoto M, Ohara K, Furukawa A, Urata K, Iwata K (2012) Metabotropic glutamate receptor 5 contributes to inflammatory tongue pain via extracellular signal-regulated kinase signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord. *J Neuroinflamm* 9, 258.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) Bedi SS, Yang Q, Crook RJ, Du J, Wu Z, Fishman HM, Grill RJ, Carlton SM, Walters ET (2010) Chronic spontaneous activity generated in the somata of primary nociceptors is associated with pain-related behavior after spinal cord injury. *J Neurosci* 30, 14870-14882.
- 23) 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.
- 24) Ji RR, Berta T, Nedergaard M (2013) Glia and pain: Is chronic pain a gliopathy?. *Pain* 154 Suppl 1, S10-28.
- 25) Smith AK, O'Hara CL, Stucky CL (2013) Mechanical sensitization of cutaneous sensory fibers in the spared nerve injury mouse model. *Mol Pain* 9, 61.
- 26) Sessle BJ (2000) Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev Oral Biol Med* 11, 57-91.
- 27) Chiang CY, Dostrovsky JO, Iwata K, Sessle BJ (2011) Role of glia in orofacial pain. *Neuroscientist* 17, 303-320.
- 28) Sessle BJ (2011) Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. *Int Rev Neurobiol* 97, 179-206.
- 29) Murasaki K, Watanabe M, Takahashi K, Ito G, Suekawa Y, Inubushi T, Hirose N, Uchida T, Tanne K (2013) P2X7 receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain. *J Dent Res* 92, 260-265.