

眼窩下神経損傷モデルラットにおける神経障害性疼痛の発症機構

佐 藤 有 華

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

(指導: 今村佳樹教授, 岩田幸一教授, 岡田明子准教授)

要旨: ラットの眼窩下神経(infraorbital nerve: ION)を半結紮した IONI 群の神経障害性疼痛の発症機構を調べることを目的とした。IONI 群の口髭部における機械刺激に対する頭部逃避反応閾値および Vc における pERK と AMPA 受容体のサブユニットである GluR1 のリン酸化(pGluR1)の相互作用を調べた。その結果、IONI 群において機械刺激に対する痛覚過敏が発症し、ERK のリン酸化阻害で有意に抑制された。Vc における pERK 陽性細胞数は有意な増加を認め、侵害受容ニューロンが活性化していることがわかった。また、Vc における pERK 陽性細胞は pGluR1 と共に発現しており、pERK と pGluR1 は機能的に関連する可能性が示された。pGluR1 タンパク発現量は増加傾向を認め、ERK のリン酸化阻害により減少する傾向を認めたが、GluR1 タンパク発現量は変化を認めなかつた。以上より、ION の傷害により ERK のリン酸化が亢進し、続いて GluR1 がリン酸化され、AMPA 受容体を介した Vc ニューロンの感受性が増大することで機械痛覚過敏が発症すると推察された。ION 損傷による機械痛覚過敏には ERK のリン酸化と GluR1 のリン酸化が重要な役割を担っていると考えられる。

キーワード: pGluR1, pERK, 神経障害性疼痛, 眼窩下神経

緒 言

抜歯や外科的矯正手術などの口腔外科的処置により三叉神経が傷害されると、口腔粘膜や顔面皮膚に痛覚過敏や感覚異常などが引き起こされることがある¹⁾。その症状は難治性で、治療に苦慮することが多く、このような難治性の異常疼痛の適切な診断および治療法を確立するためにはその発症のメカニズムを解明することが非常に重要である。

三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)は口腔顔面領域の侵害情報を中継する代表的な核として知られており²⁾、口腔顔面の炎症や三叉神経傷害モデル動物では、Vc ニューロンにおいて様々な分子の発現変化が生じていることが報告されている^{3,4)}。たとえば、口腔顔面領域に侵害刺激が加わると、数分以内に Vc ニューロンに extracellular signal-regulated kinase(ERK)のリン酸化が生じ、リン酸化 ERK(pERK)陽性細胞が検出される。pERK 陽性細胞数は機械刺激や熱刺激の強度に依存して増加する^{5,6,7)}。異常疼痛の原因と考えられている中枢感作やワインドアップ現象にも pERK が関与していると報告されている^{8,9)}。これらの知見は Vc ニューロンにおける ERK のリン酸化が侵害受容ニューロンの興奮性増強に関与していることを示している。

Vc における三叉神経の一次ニューロンから二次ニューロンへのシナプス伝達は、グルタミン酸が alpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

(AMPA)受容体と結合することによって成立するといわれている。末梢に加わった侵害刺激によって一次ニューロン終末からグルタミン酸の放出が持続すると、AMPA 受容体はリン酸化され、これにより細胞内に多くの Na⁺や Ca²⁺流入が生じ、Vc ニューロンの興奮性を増強する。特に、興奮性シナプス伝達の長期増強(LTP)に関しては AMPA 受容体の trafficking が注目されており、その中で AMPA 受容体の細胞膜への挿入には ERK が重要な役割を果たしているとの報告がある^{10,11)}。LTP の発現には、AMPA 受容体サブユニットの一つである GluR1 がリン酸化された phosphorylated GluR1(pGluR1)が必要であることが分かっている¹²⁾。また、神経障害性疼痛モデルにおいては、pGluR1 が中枢神経で増加しており、疼痛発症に関与している可能性が報告されている^{13,14)}。以上より、三叉神経損傷後に生じる口腔顔面領域の異常疼痛には、Vc の侵害受容ニューロンにおける pERK と pGluR1 間の機能的な相互作用が関与することが推察される。

本研究では、ラットの三叉神経第二枝の枝である眼窩下神経(infraorbital nerve: ION)の傷害による異常疼痛発症メカニズムを明らかにするため、眼窩下神経部分結紮(IONI)ラットを用いて侵害刺激に対する頭部逃避反射閾値(HWT)を測定するとともに、延髄のニューロンにおける pERK と pGluR1 の発現変化を免疫組織化学的手法および Western blot 法を用いて解析した。

(受付: 平成 30 年 1 月 18 日)

〒 101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

材料および方法

1. 実験動物

本研究は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認(承認番号 AP15 D008)を得て、また動物の処置は国際疼痛学会のガイドラインに従って行われた¹⁵⁾。実験にはSprague-Dawley系雄性ラット(Japan SLC)を用い、恒温、恒湿($24 \pm 1^\circ\text{C}$, $55 \pm 5\%$)の環境下で12時間の明暗サイクルを保ち、感染防止策を施した施設で飼育した。さらに、苦痛を最小限にとどめ、頭数の削減に努めた。

2. IONI ラットの作製

塩酸メデトミジン 0.15 mg/kg, ミダゾラム 2 mg/kg と酒石酸プロトルファノール 2.5 mg/kg を混合した三種混合麻酔下でラットの左側上顎臼歯部歯肉頬移行部に 1 cm の縦切開を施し、三叉神経第二枝である ION を剖出して神経束の腹側半分に糸を通して結紮した後、切開部を縫合し、これを IONI 群とした。また神経の結紮は行わず、神経の剖出だけを行った後に縫合したものを作成した。

3. ERK リン酸化阻害薬の大槽内持続投与

大槽内へのカテーテル挿入は先行研究と同様の方法を用いて行った³⁾。IONI または Sham 処置の3日前にラットを三種混合麻酔薬で麻酔し、脳定位固定装置に固定後、後頭骨を露出し、小穴をあけ、長さ約 5 mm のポリエチレンチューブ(直径 0.8 mm, Natsume)の先端が大槽へ到達するように設置した。チューブは後頭骨に接着剤で固定した後、頭蓋骨に立てたスクリューピンとともに歯科用レジンで固定した。チューブは浸透圧ミニポンプ(Alzet model 2001, Durect Corporation)に接続し、ラットの背部皮下に埋入り縫合した。ERK リン酸化阻害薬である PD98059(1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, DMSO に溶解: PD 群)、またはその溶媒である 10%DMSO(Vehicle 群)で浸透圧ポンプを満たし、薬物を 1 $\mu\text{L}/\text{hour}$ の速度で 7 日間持続投与した。

4. 三叉神経第二枝支配領域への機械刺激に対する HWT の測定

逃避行動観察は先行研究と同様の方法を用いて行った⁶⁾。まず、ラットの馴化を 1 週間かけて行った。ラットを小窓のあるプラスチックケージに入れ、20 分間以上小窓から顔面を突出して静止することができるよう訓練した。さらに、左側口髭部中央にフォンフライヘア(Stoelting)を用いて機械刺激を加え、痛みを伴わない刺激に対しては逃避反応を示さないように訓練した。このように馴化してから機械刺激に対する HWT の測定を行い、この値をコントロール値とした。その後、免疫組織化学的解析に合わせて、IONI 後 3 日目に HWT を測定した(n = 6)。HWT は 3 回測定し、その中央値を求めた。また PD 群(n = 7)と Vehicle 群(n = 8)ではそれぞれの

薬物を Vc 領域の大槽内に投与開始してから 3 日後に IONI 処置を行い、機械刺激に対する HWT を測定した。

5. 免疫組織化学的解析

IONI または sham 処置後 3 日目の IONI 群(n = 5), Sham 群(n = 5), PD 群(n = 6), Vehicle 群(n = 6)において免疫組織化学的解析を行った。三種混合麻酔下にフォンフライヘアを用いて口髭部に侵害機械刺激(強度: 60 g, 持続時間: 10 分, 間隔: 1 秒, 刺激回数: 600 回)を加え、5 分後に灌流を行った。生理食塩液に次いで 4% パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝溶液(pH7.4, PFA)を用いて灌流固定を行い、延髄を摘出した。次に 4% PFA 溶液で 48 時間後固定し、20% スクロース加 0.01 M TBS に 24 時間浸漬した。その後、ミクロトーム(Leica SM2000 R, Leica Microsystems)にて厚さ 30 μm の前額断の連続切片を作製し、4 枚毎に 1 切片を取り出して 0.01 M PBS 中に保存した。抗 pERK 抗体染色のために、浮遊切片を室温で 2 時間、0.3% Triton X-100/3% normal goat serum 加 0.01 M PBS に浸漬し、ブロッキングを行った。次に、4°C で 72 時間 rabbit anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) 抗体(1:1000; Cell Signaling)と反応させた。その後 0.01 M PBS にて洗浄し、室温で 2 時間 goat anti-rabbit IgG (1:600; Vector Laboratories) と反応させた。その後 0.01 M PBS にて切片を洗浄し、室温で 1 時間 ABC(1:100; Vector Laboratories)で酵素抗体反応を行った。さらに、0.01 M PBS にて洗浄後、0.05 M Tris buffer(TB)で 10 分間洗浄し、0.035% 3,3'-diaminobenzidine-terephthaleic acid(DAB, Sigma-Aldrich), 0.2% nickel ammonium sulfate、そして 0.05 M TB(pH 7.4)に 0.05% H₂O₂ で発色させた。切片は 0.01 M PBS で洗浄し、スライドガラス(Matsunami)に貼り付け、乾燥させ、一連のアルコール(50-100%)とキシレンで脱水および脱脂し、カバーガラスと封入剤(Eukitt, O. Kindler)を用いて封入した。光学顕微鏡下に均質で灰-黒色の点状の構造物を有する pERK 陽性細胞を確認した。切片を 4 枚毎に 1 枚抽出し、各切片に発現した pERK 陽性細胞数をカウントし、3 枚分の切片に発現した pERK 陽性細胞数を平均し、吻尾方向における pERK 陽性細胞数について解析を行った。

二重蛍光免疫組織化学的解析では、上記と同様にしてブロッキングを行い、rabbit anti-phospho-AMPA 受容体(GluR1, Ser845)抗体(1:300, Cell Signaling), mouse anti-phospho-p44/42 MAPK(Thr202/Tyr204)抗体(1:300, Cell Signaling)または mouse anti-NeuN(1:1000; Millipore)抗体に 4°C、3 日間反応させた。Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 IgG(1:200; Invitrogen)と goat anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG(1:200; Invitrogen)に、暗室において室温で 2 時間反応させ、その後 0.01 M PBS で 10 分ずつ 3 回洗浄し、PermaFluor

(Thermo Fisher scientific)を用いて封入した。次いで、標本を共焦点レーザー顕微鏡(LSM510, Carl Zeiss)と蛍光顕微鏡(BZ9000, Keyence)を用いて観察した。

6. Western blot 法

IONIによるGluR1とpGluR1のタンパク発現量の変化をWestern blot法を用いて検討した。

IONIまたはsham処置後3日目のラット(IONI群:n=6, Sham群:n=6, PD群:n=6)を三種混合麻酔下に生理食塩液で灌流し, Vcを含む延髄領域を取り出した。また未処置のラット(Naïve群:n=6)についても同様に延髄を摘出した。各組織を4°Cのlysis bufferに溶解し, さらにLaemmli sample buffer(Bio-Rad)に溶解した。95°C, 5分間熱処理した後, 10%TGX gels(Bio-Rad)にて電気泳動(200V, 30分間)した後, polyvinylidene difluoride membrane(Bio-Rad)に転写した。転写膜を0.1%Tween20を含む0.01M TBS(TBST)で30分間洗浄した後, 3%bovine serum albumin blocking solution中で, 室温にて1時間ブロッキングした。その後, rabbit anti-phospho-GluR1抗体(1:1000, Abcam)またはrabbit anti-GluR1抗体(1:1000, Abcam)に対して4°Cで12時間反応させた。TBSTで洗浄した後, anti-rabbit IgG-HRP(1:5000, Santa Cruz Biotechnology)に室温で2時間作用させ, Western Lightning ECL Pro(Perkin Elmer)で処理した。ChemiDoc MP system(Bio-Rad)にて可視化し, 画像ソフト(Image J, NIH)を用いて発現タンパク量の解析を行った。タンパク発現量はNaïve群に対する各群の発現量で表した。

7. 統計学的解析

機械刺激に対するHWTの結果およびVehicle群とPD群のHWTの結果は二元配置分散分析(ANOVA)を行った後にTukey testの多重比較を行った。IONI群とSham群, およびPD群とVehicle群のpERK陽性細胞数の解析にはStudent's t-testを使用した。Naïve群, Sham群, IONI群, PD群におけるタンパク発現量の比較には, 一元配置分散分析(ANOVA)を使用し, その後の検定としてTukey testを使用した。統計学的解析後, $P < 0.05$ を有意差ありと判定し, 各データは平均値±SEMとして示した。

結 果

1. 機械刺激に対するHWT

IONI後3日目における口髭部への機械刺激に対するHWTは, IONI群では, 処置前と比較して13.7%まで低下し, Sham群と比較して17.0%まで低下した($P < 0.01$)。

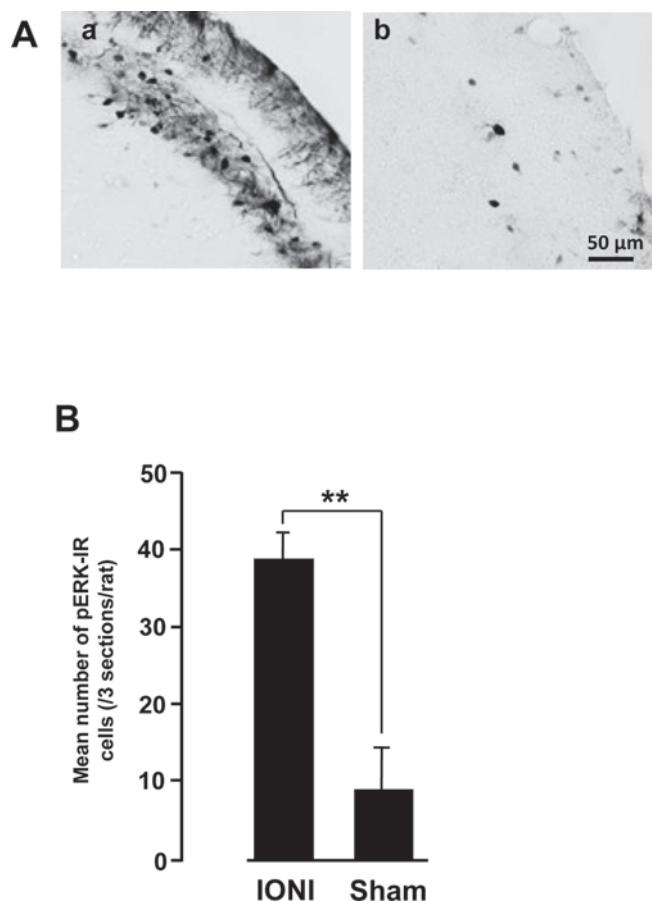
2. VcにおけるpERK陽性細胞数の比較

IONI群の口髭部への機械刺激により発現したpERK陽性細胞は, obexより尾側2400μm付近のVc表層の三

叉神経第二枝領域に多く認められた(第1図Aa)。しかし, Sham群では同部に少數の発現が認められただけであり(第1図Ab), 尾側2400μmにおけるIONI群のpERK陽性細胞数は, Sham群と比較して有意に多かった(第1図B)。

3. PD98059投与によるHWTとERKのリン酸化

Vehicle群のHWTは, IONI前と比較し, 結紮1日目から21日目において有意に低下したが, PD群のHWTでは, IONI前と比較して有意な閾値の低下は認められなかった。また, IONI結紮1日目から21日目においては, PD群のHWTは, Vehicle群と比較し, 有意な上昇が認められた(第2図A)。さらに, obexより尾側2400μm付近のVc表層において, IONI群の口髭部への機械刺激により多数のpERK陽性細胞が認められた(第1図A)に対し, PD群ではpERK陽性細胞は少なかった(第2図Ba)。しかし, Vehicle群では, IONI群と同様, Vc表層に多数のpERK陽性細胞が認められた(図2Bb)。Obexより2400μm尾側におけるPD群のpERK陽性細胞数は, Vehicle群と比較して著しく少なかった(第2図Bc)。



第1図 IONI後のVcにおけるpERK陽性細胞発現

A: VcのpERK免疫組織染色像。

a: IONI後3日目, b: Sham処置後3日目。

B: VcにおけるpERK陽性細胞数の平均。**: $P < 0.01$

4. Vc ニューロンにおける GluR1 のリン酸化

次に、IONI ラットの Vc 背側に局在する pERK 陽性細胞において GluR1 がリン酸化されるか否かを検討した。IONI 後 3 日目には、Vc 領域の細胞に pGluR1 発現が認められ、その多くが pERK 陽性を示した(第 3 図 A)。また、pGluR1 陽性細胞のほとんどは NeuN 陽性であり、pGluR1 陽性細胞がニューロンであることが示された(第 3 図 B)。

IONI 群の Vc 細胞の多くは pGluR1 陽性であったが、Sham 群ではほとんど認められなかった(第 4 図 A)。さらに、Western blot 法を用いた解析では、Naïve 群、Sham 群、IONI 群、PD 群とも Vc 領域における GluR1 タンパ

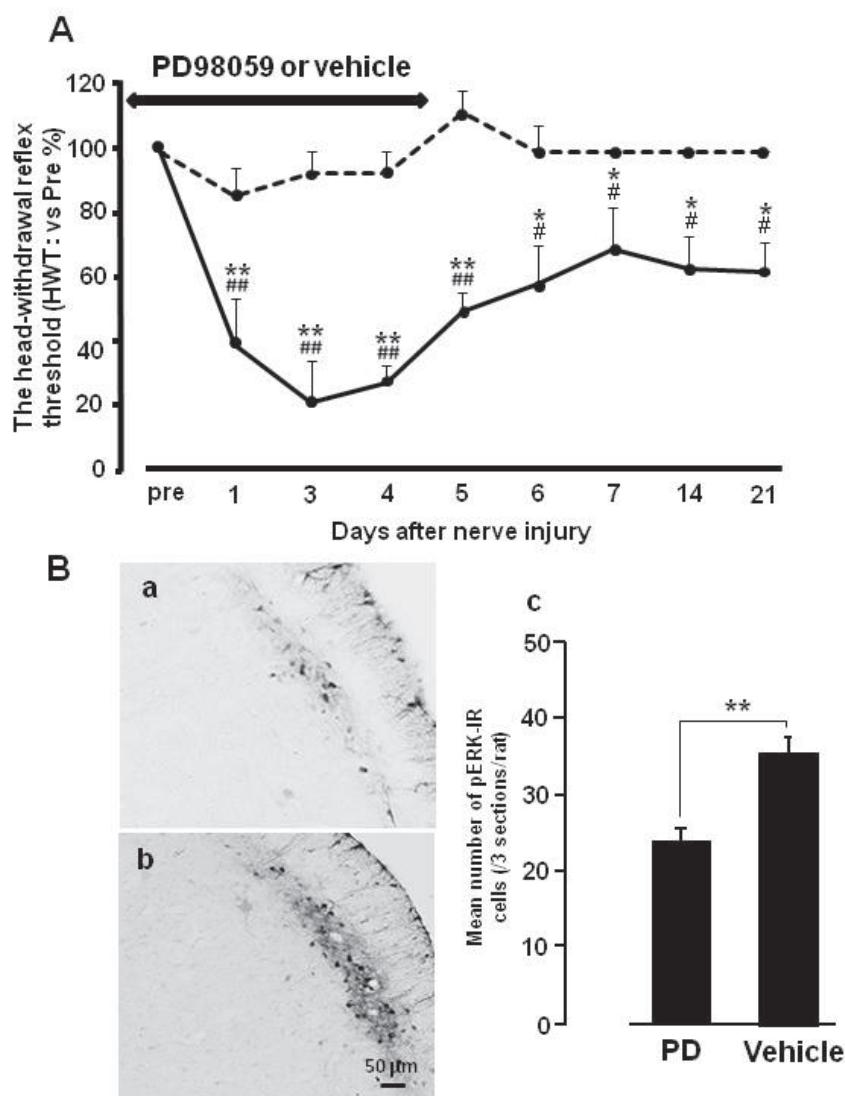
ク発現の差は認められなかった(第 4 図 B)。一方、pGluR1 タンパクにおいては、Naïve 群、Sham 群、PD 群に対し、IONI 群で発現量が多い傾向にあった(第 4 図 B)。

考 察

本研究では、三叉神経第二枝の枝である ION を部分結紮することによって口髭部に生じる機械痛覚過敏の発症機構について検討した。その結果、Vc ニューロンにおける ERK のリン酸化および GluR1 のリン酸化が重要な役割を担っている可能性が示された。

1. HWT 低下に対する ERK リン酸化の関与

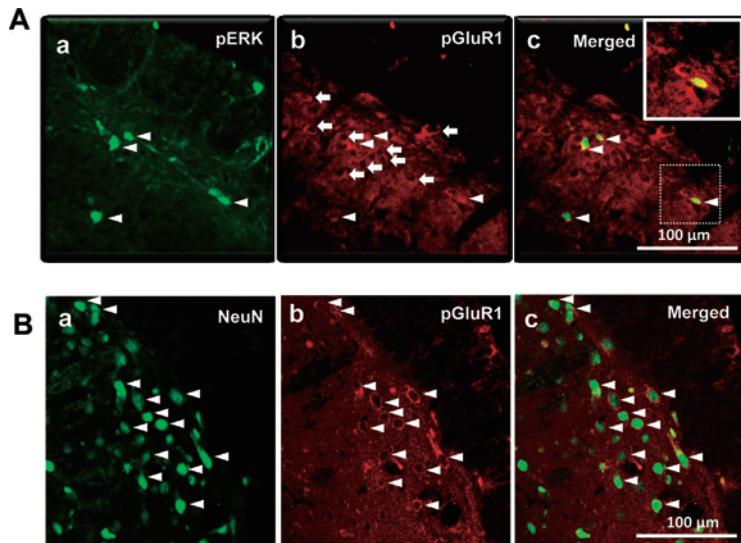
口腔顔面領域の侵害刺激により、Vc 領域や上部頸髄



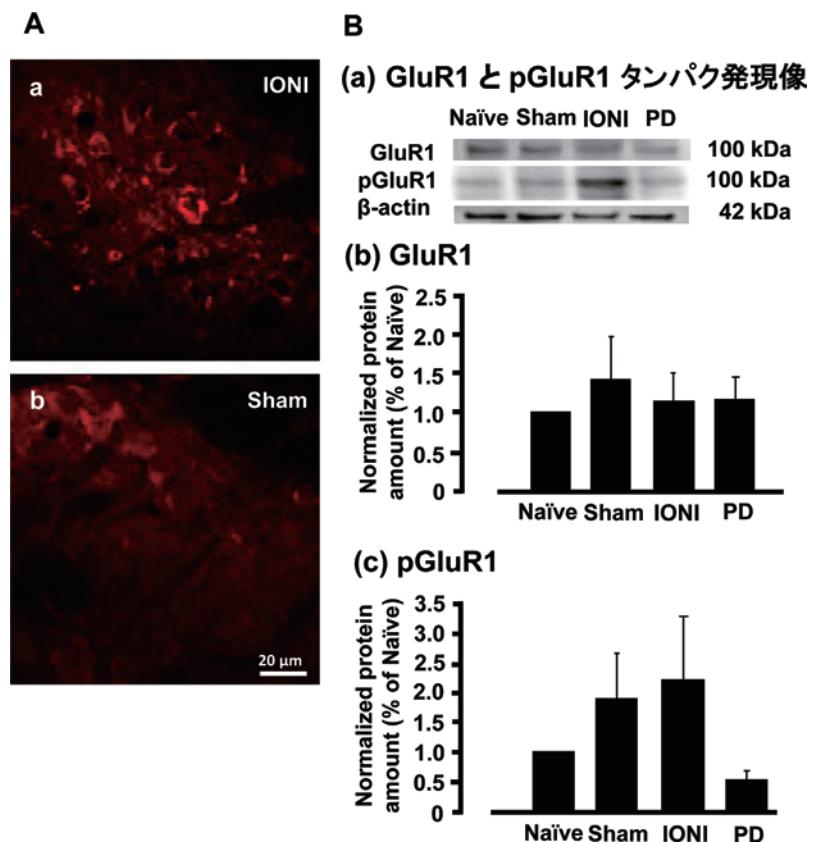
第 2 図 HWT および pERK 陽性細胞の発現に対する PD98059 の効果

A: 口髭部における機械刺激に対する HWT。実線が Vehicle 群、破線が PD 群。
#: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, pre との比較。*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, PD 群との比較。

B: IONI 後 3 日目の Vc における pERK 陽性細胞発現。a: PD 群, b: Vehicle 群, c: pERK 陽性細胞数の比較。**: $P < 0.01$ 。



第3図 VcにおけるpERK, pGluR1, NeuNの免疫染色蛍光画像
A : IONI後3日目のVcにおけるpERK(a)とpGluR1陽性細胞(b)および重ね合わせ画像(c)。挿入図は点線で囲んだ部位の強拡大像。
B : IONI後3日目のVcにおけるNeuN(a)とpGluR1陽性細胞(b)および重ね合わせ画像(c)。矢印はpGluR1のみ陽性の細胞。矢頭はpERKとpGluR1陽性細胞(A)およびpGluR1とNeuN陽性細胞(B)。



第4図 VcにおけるpGluR1とGluR1の発現
A : IONI群(a)とSham群(b)におけるpGluR1免疫染色蛍光画像。
B : Western blot法によるGluR1とpGluR1タンパク発現(a)と発現量の比較 (b, c)。

後角のニューロンにおいて ERK のリン酸化が誘導されることが知られている^{16,17)}。ERK のリン酸化は侵害刺激を与えて数分以内に生じ、侵害刺激強度に依存して pERK 陽性細胞数が増加する⁸⁾。また、脊髄後角侵害受容ニューロンのワインドアップ現象にも ERK のリン酸化が関与すると報告されている⁸⁾。これらの知見は二次ニューロンにおける ERK のリン酸化が侵害受容ニューロンの活性化を示す信頼性の高いマーカーであることを示している。本研究では、HWT が最も低下した IONI 後 3 日目に、ラットの口髭部に機械的侵害刺激を与えると、Vc 表層のニューロンに限局して多くの pERK 陽性細胞発現を認めたが、Sham 群ではこの細胞発現が認められなかった。この発現部位は、以前の解剖学的、電気生理学的研究により三叉神經第二枝領域から入力を受ける侵害受容ニューロンが存在する部位に相当する¹⁶⁾。したがって、Vc 表層における pERK 陽性細胞の発現は、ION 損傷によって Vc に存在する侵害受容ニューロンが活動して生じたもので、その結果、機械痛覚過敏を惹起した可能性を示している。

2. Vc ニューロン感作における GluR1 リン酸化の関与
AMPA 受容体のサブユニットである GluR1 のリン酸化は末梢神經傷害や炎症に続いて生じ、脊髄後角における侵害受容ニューロンの感作に関与すると報告されている¹⁸⁾。また、GluR1 のリン酸化を抑制することにより、足底の炎症モデルラットの疼痛反応行動が抑制され、脊髄後角における ERK のリン酸化や Fos の発現が抑制されるといわれている¹⁹⁾。しかし、侵害受容ニューロンにおける GluR1 のリン酸化と pERK の相互関係に関する報告はほとんどみられない。中谷らは、口腔乾燥モデルラットを用いて、舌乾燥により発症する舌の機械痛覚過敏には Vc 侵害受容ニューロンにおける ERK のリン酸化に続く GluR1 のリン酸化が関与する可能性を示した⁹⁾。本研究では、IONI 後 3 日目の Vc において、GluR1 タンパクの発現量は、Naïve、Sham 処置群と同程度であった。ERK のリン酸化阻害薬である PD98059 の持続投与でも GluR1 タンパク発現に変化は認められなかった。一方、pGluR1 タンパク発現は、有意差は認められなかったものの、IONI 後に増大する傾向が認められた。さらに PD98059 の持続投与により、IONI 後の pGluR1 発現が減少する傾向が認められたことから、ERK のリン酸化抑制によって GluR1 のリン酸化も抑制される可能性が示された。

ところで、侵害受容性疼痛の発症には NMDA 受容体を介した ERK のリン酸化の関与も知られており、NMDA 受容体のブロックによって、足の侵害刺激で生じた ERK のリン酸化が脊髄後角ニューロンで抑制されると報告されている²⁰⁾。pGluR1 を含む AMPA 受容体の trafficking に pERK が関与し、LTP が生じることが知ら

れている。それ以外にも NMDA 受容体の活性化に関連してカルシウム / カルモジュリン依存性タンパクキナーゼ II が賦活化されて AMPA 受容体の膜への trafficking が生じるとの報告がある²¹⁾。これらの知見は IONI ラットにおいて、GluR1 リン酸化と NMDA 受容体の活性化、それに引き続いて ERK のリン酸化が誘導される可能性も示唆しており、本研究で示したメカニズムの他にも様々な機構が機械的痛覚過敏の発症に関わっていると考えられる。

結論

今回の研究結果から考えられる仮説を第 5 図にまとめた。ION の結紮により一次求心性ニューロンの活動性が増大し、Vc 二次ニューロンの ERK のリン酸化が亢進する。それに引き続いて GluR1 がリン酸化され、AMPA 受容体を介した二次ニューロンの活動性が増大する結果、口髭部における機械痛覚過敏が発症すると考えられた。

稿を終えるあたりに、本研究遂行に格別なご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科口腔診断学講座の今村佳樹教授に謹んで心より感謝申し上げます。

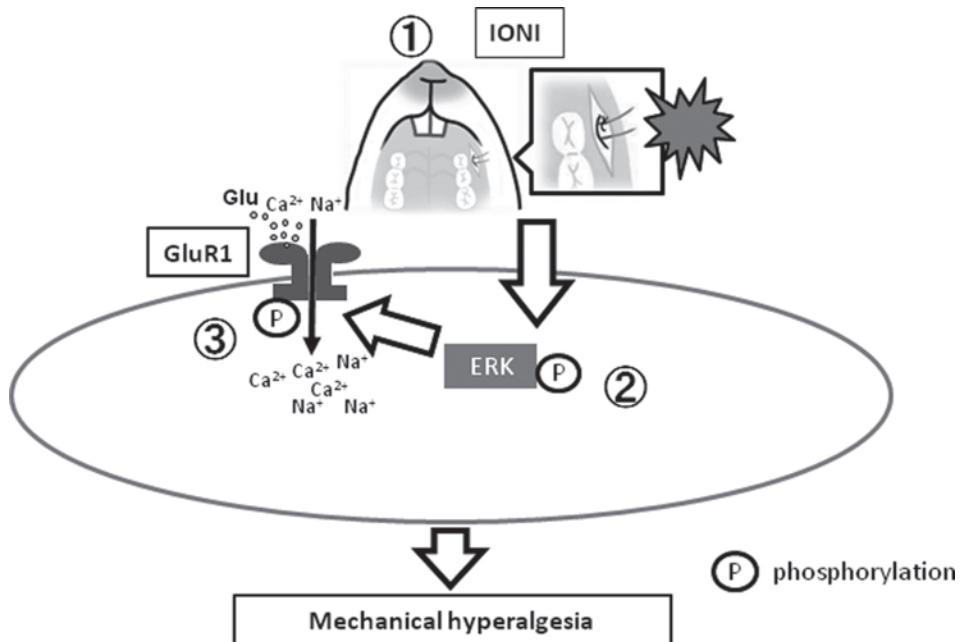
また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました、生理学講座の岩田幸一教授、口腔診断学講座の岡田明子准教授はじめ、生理学講座、口腔診断学講座の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究は、平成 27 ~ 29 年度総合歯学研究所研究費(B)によってなされました。

本研究に関して、開示すべき利益相反はありません。

文献

- 1) Renton T, Yilmaz Z, Gaballah K (2012) Evaluation of trigeminal nerve injuries in relation to third molar surgery in a prospective patient cohort. Recommendations for prevention. Int J Oral Maxillofac Surg 41, 1509–1518.
- 2) Sessle BJ (2011) Peripheral and central mechanisms of orofacial inflammatory pain. Int Rev Neurobiol 97, 179–206.
- 3) 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.
- 4) Okada-Ogawa A, Nakaya Y, Imamura Y, Kobayashi M, Shinoda M, Kita K, Iwata K (2015) Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. Exp Neurol 267, 42–52.
- 5) Honda K, Kitagawa J, Sessle BJ, Kondo M, Tsuboi Y, Yonehara Y, Iwata K (2008) Mechanisms involved in an increment of multimodal excitability of medullary and upper cervical dorsal horn neurons following cutaneous capsaicin treatment. Mol Pain 4, 59.



第5図 IONIによる機械的痛覚過敏発症におけるVc侵害受容ニューロンのERK-GluR1カスケード
ION損傷後(①), Vc侵害受容ニューロン内にてERKがリン酸化され(②),細胞膜に存在するAMPA型グルタミン酸受容体(GluR1)がリン酸化される(③)ことで細胞内にNa⁺とCa²⁺が流入して、ニューロンが活性化され、機械的痛覚過敏が生じる。

- 6) 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.
- 7) Shimizu K, Matsumoto K, Noma N, Matsuura S, Ohara K, Komiya H, Watase T, Ogiso B, Tsuboi Y, Shinoda M, Hatori K, Nakaya Y, Iwata K (2014) Involvement of trigeminal transition zone and laminated subnucleus caudalis in masseter muscle hypersensitivity associated with tooth inflammation. *PLoS One* 9, e109168.
- 8) Fukui T, Dai Y, Iwata K, Kamo H, Yamanaka H, Obata K, Kobayashi K, Wang S, Cui X, Yoshiya S, Noguchi K (2007) Frequency-dependent ERK phosphorylation in spinal neurons by electric stimulation of the sciatic nerve and the role in electrophysiological activity. *Mol Pain* 3, 18.
- 9) Nakaya Y, Tsuboi Y, Okada-Ogawa A, Shinoda M, Kubo A, Chen J Y, Iwata K (2016) ERK-GluR1 phosphorylation in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons is involved in pain associated with dry tongue. *Mol Pain* 12, 1-14.
- 10) Zhu J J, Qin Y, Zhao M, Van Aelst L, Malinow R (2002) Ras and Rap control AMPA receptor trafficking during synaptic plasticity. *Cell* 110, 443-455.
- 11) Song R S, Massenburg B, Wenderski W, Jayaraman V, Thompson L, Neves SR (2013) ERK regulation of phosphodiesterase 4 enhances dopamine-stimulated AMPA receptor membrane insertion. *PNAS* 110, 15437-15442.
- 12) Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR (1997) Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-K II during long-term potentiation. *Science* 276, 2042-2045.
- 13) Lin TB, Hsieh MC, Lai CY, Cheng JK, Chau YP, Ruan T, Chen GD, Peng, HY (2015) Fbxo3-dependent Fbxl2 ubiquitination mediates neuropathic allodynia through the TRAF2/TNIK/GluR1 cascade. *J Neurosci* 35, 16545-16560.
- 14) Miyamoto K, Kume K, Ohsawa M (2017) Role of microglia in mechanical allodynia in the anterior cingulate cortex. *J Pharm Sci* 134, 158-165.
- 15) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 16) 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.
- 17) Tsujimura T, Shinoda M, Honda K, Hitomi S, Kiyomoto M, Matsuura S, Katagiri A, Tsuji K, Inoue M, Shiga Y, Iwata K (2011) Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis, upper cervical cord, NTS and Pa5 following capsaicin injection into masticatory and swallowing-related muscles in rats. *Brain Res* 1417, 45-54.
- 18) Wang JQ, Guo ML, Jin DZ, Xue B, Fibuch EE, Mao LM (2014) Roles of subunit phosphorylation in regulating glutamate receptor function. *Eur J Pharmacol* 728, 183-

187.

- 19) Pezet S, Marchand F, D' Mello R, Grist J, Clark AK, Malcangio M, Dickenson AH, Williams RJ, McMahon SB (2008) Phosphatidylinositol 3-kinase is a key mediator of central sensitization in painful inflammatory conditions. *J Neurosci* 28, 4261–4270.
- 20) Ji RR, Baba H, Brenner GJ, Woolf CJ (1999) Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nature Neurosci* 2, 1114–1119.
- 21) Kakegawa W, Tsuzuki K, Yoshida Y, Kameyama K, Ozawa S (2004) Input- and subunit-specific AMPA receptor trafficking underlying long-term potentiation at hippocampal CA3 synapses. *Eur J Neurosci* 20, 101–110.