

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09732

研究課題名(和文) 下歯槽神経損傷後の顎顔面部異所性疼痛発症機構の解明

研究課題名(英文) Ectopic orofacial pain mechanisms following inferior alveolar injury

研究代表者

澁田 郁子(鈴木郁子)(SHIBUTA, Ikuko)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：60459906

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、下歯槽神経切断モデルラットを作製して三叉神経節に発現するサテライト細胞にターゲットを絞り、下歯槽神経切断後の異所性疼痛メカニズムを明らかにすることを目的とした。下歯槽神経切断後、口髭部への機械刺激に対する逃避反射閾値が低下した。NO合成酵素阻害薬の三叉神経節内投与およびサテライト細胞活性化阻害により、異所性疼痛が抑制された。よって、三叉神経の損傷によって三叉神経節のサテライト細胞が活性化し、その結果として口腔顔面領域に異所性疼痛が引き起こされる可能性がある。さらに、下歯槽神経切断後に生じる異所性疼痛にはNT3-TrkCを介したシグナルも関与する可能性があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、三叉神経損傷によって口腔顔面領域に引き起こされる異所性疼痛に関しては、対症療法としてリリカを初めとする数種類の薬物が使用されるのみで、サテライト細胞あるいはサテライト細胞間の機能連絡をターゲットとした薬物療法に関しては全く情報が得られていない。本研究は、三叉神経損傷によって口腔顔面領域に発症した異所性の異常疼痛治療に対して、サテライト細胞の結合タンパクあるいはサテライト細胞の活性化阻害薬の臨床応用を視野に入れた新たな臨床研究プロジェクトへとつなげることが可能である。

研究成果の概要(英文)：Ectopic orofacial pain occurs after trigeminal nerve injuries. In this study, we focused the involvement of functional interaction between neuron and satellite glial cells via NO- and TrkC-dependent mechanisms in orofacial ectopic pain with inferior alveolar nerve injury (IANI).

The findings in this study suggest that IANX leads to satellite glial cell activation via NO released from TG neurons. The activation of satellite glial cells spreads to large areas within the TG and can affect uninjured branches of the trigeminal nerve, resulting in orofacial mechanical hypersensitivity not directly associated with the IANI. Moreover, the amount of NT-3 increased in Schwann cells in the injured IAN. The TrkC neutralization inhibited the orofacial mechanosensory disturbance. Therefore, functional interaction between neuronal ganglion and satellite glial cells via NO- and TrkC-dependent mechanisms play an important role in orofacial ectopic pain associated with IANI.

研究分野：口腔生理学

キーワード：異所性疼痛 三叉神経節 サテライト細胞 下歯槽神経損傷

1. 研究開始当初の背景

口腔顔面領域に様々な外科的処置を施すと、創傷が治癒した後にも口腔顔面の広い領域に異常疼痛が発症することがある。このような異常疼痛には通常使用されている解熱鎮痛薬が奏効せず、しばしば治療に苦慮する。正しい治療法を確立するためには、三叉神経傷害後の異所性異常疼痛発症機構を究明することが不可欠である。

末梢神経損傷後、損傷神経の支配部位を超えた領域に疼痛異常(異所性疼痛)が発症するが、このメカニズムには中枢神経だけでなく、グリア細胞が重要な役割を果たすことが明らかになりつつある。一方、損傷神経や炎症部位を支配する神経節細胞の活性化に伴って、神経節細胞を取り囲むように存在するグリア細胞であるサテライト細胞の活性化も亢進して三叉神経節全体に興奮が広がり、結果的に口腔顔面の広い領域に異所性異常疼痛が引き起こされることが分かってきた。このことから、口腔顔面領域の異所性異常疼痛には三叉神経節全体への興奮の伝播が重要であり、この伝播にはサテライト細胞同士の機能連絡が関与していると考えられる。しかしながら、どの様なメカニズムでサテライト細胞活性が神経節全体に広がり、神経節細胞の活性化を亢進するのかについてはほとんど明らかにされていない。さらに、末梢神経系のグリア細胞として知られるシュワン細胞も神経節細胞の興奮性を調節する可能性があるが、詳細は不明である。現在、グリア細胞の活性化阻害薬として実際に臨床の場で使用できる漢方薬が散見されるが、実際にそれらの薬物が異所性異常疼痛の治療薬として用いられるケースは非常に少ない。特に三叉神経損傷によって口腔顔面領域に引き起こされる異所性疼痛に関しては、対症療法としてリリカ(プレギャバリン)を初めとする数種類の薬物が使用されるのみで、シュワン細胞、サテライト細胞あるいはサテライト細胞間の機能連絡をターゲットとした薬物療法に関しては全く情報が得られていない。本研究が順調に進行し、予想される研究結果が得られれば、三叉神経損傷によって口腔顔面領域に発症した異所性疼痛治療に対して、シュワン細胞、サテライト細胞の結合タンパクあるいはサテライト細胞の活性化阻害薬の臨床応用を視野に入れた新たな臨床研究プロジェクトへとつなげることが可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は口腔顔面領域に発症する異所性疼痛の発症機序の一端を解明するもので、これまでに多くの研究が行われてきた神経節細胞だけに着目するのではなく、神経細胞の栄養や支持細胞と考えられてきたサテライト細胞およびサテライト細胞と神経節細胞の機能連絡、さらにシュワン細胞の関与に主眼を置いた全く新しい研究である。

これまで、異常疼痛の発症機構に関する研究において、神経節細胞に注目して研究を進め、非神経細胞であるグリア細胞に関してはあまり目が向けられなかった。サテライト細胞はもともと神経細胞の栄養細胞あるいは支持細胞として知られていたが、最近の研究により神経細胞活動を調節する働きがあることが明らかにされてきた。申請者は最近、サテライト細胞と神経節細胞の機能連絡に注目して研究を進めており、舌神経に障害を加えることによって三叉神経節に存在するサテライト細胞が著しく活性化し、それに伴って多くの神経節細胞活動が増強することを明らかにした。また、このサテライト細胞の活性化は損傷神経の支配領域を超えた広い領域にまで及んでおり、サテライト細胞どうしが何らかの機能連絡を形成し、三叉神経節の広い領域への活動性の拡大に貢献する可能性について報告してきた。このような結果から、三叉神経の損傷によって三叉神経節に存在する多くのサテライト細胞が活性化し、その活性化が神経節全体に広がることによって損傷神経の支配領域を超えた部位に分布する神経細胞活動を増強し、その結果として口腔顔面領域に異所性の異常疼痛が引き起こされる可能性があると考えられる。さらに、口腔顔面領域の感覚障害には神経損傷部のシュワン細胞が関与している可能性もある。

具体的には、以下の項目を解明することを目的とした。

- 下歯槽神経損傷後、神経損傷を受けていない三叉神経節細胞周囲に存在するサテライト細胞に発現するかを明らかにする。
- 神経損傷を受けていない三叉神経節細胞活動の変調に対してサテライト細胞がいかなるメカニズムで関与するかを解明する。
- 神経損傷を受けていない三叉神経節細胞が興奮性増強を示すなら、これらの神経節細胞の興奮性亢進によって神経節細胞においてどのような分子の関与があるかを解明する。
- 損傷下歯槽神経のシュワン細胞がどのような変化をするのかを明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 下歯槽神経損傷モデルラットの顔面皮膚機械刺激逃避閾値の測定
全身麻酔下で Sprague Dawley 系雄性ラットの顔面皮膚および咬筋の一部を切開し下歯槽神経を露出切断し、下顎管内に戻す。下歯槽神経切断 5 日目まで顔面皮膚の三叉神経第 II 枝支配領域の皮膚に機械刺激を与え逃避行動閾値を測定する。
- (2) 三叉神経節 Nitrate-Nitrite の検出
下歯槽神経切断 3 日目、三叉神経節を摘出し、免疫組織学的手法および Western blotting 法

を用いて活性型サテライト細胞および一酸化窒素(NO)の発現変化を明らかにする。NOは不安定なフリーラジカルガスとして生体内に存在するため、NOレベルの定量化として血清NO代謝産物であるNitrate-Nitriteを測定した。ホモジナイズした三叉神経節から抽出された上清中の総Nitrate-Nitriteを、Nitrate-Nitrite比色分析キットを使用して測定した。

- (3) サテライト細胞活性阻害薬およびNO基質三叉神経節内投与の効果
下歯槽神経切断3日目まで、サテライト細胞活性阻害薬(フルオロクエン酸塩(FC))またはNO合成酵素阻害薬(N-プロピル-L-アルギニン塩酸塩(NPLA))を浸透圧ポンプによって、三叉神経節内に投与した。下歯槽神経切断3日目、上述のように顔面皮膚機械刺激逃避閾値の測定を行った。また、無処置ラットへのNO基質(L-arginine)の三叉神経節内投与後の顔面皮膚機械刺激逃避閾値の変化を測定した。
- (4) サテライト細胞活性化の免疫組織化学的解析
下歯槽神経切断3日目、FC投与群、NPLA投与群およびvehicle投与群ラットを灌流固定し、三叉神経節を摘出した。三叉神経節の凍結切片を作製し、マウス抗GFAP(サテライト細胞のマーカー)モノクローナル抗体、ヤギ抗nNOS(NO合成酵素)ポリクローナル抗体を用いて、免疫組織化学染色を行った。三叉神経節細胞体の1/2を超えるGFAP陽性細胞に囲まれた三叉神経節ニューロンの数をサテライト細胞活性化の指標とした。さらにnNOS陽性三叉神経節ニューロンの数をカウントした。
- (5) 下歯槽神経切断部シュワン細胞の免疫組織化学的および生化学的解析
下歯槽神経切断5日目、切断部を含む左下顎骨を摘出し、脱石灰化を実施した。切片を作製し、抗Neurotrophin 3(NT-3)ウサギポリクローナル抗体または抗グルタミンシンターゼ(GS:シュワン細胞マーカー)マウスモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的手法にて、NT-3陽性シュワン細胞を同定した。
また、下歯槽神経切断5日目、切断部を含む下歯槽神経を摘出し、Western blotting法を用いて、NT-3量を定量した。

4. 研究成果

- (1) 下歯槽神経切断後の顔面皮膚機械刺激逃避閾値
神経切断部位と同側または反対側の顔面皮膚機械刺激逃避閾値を計測した。機械刺激逃避閾値は、同側の損傷前の値と比較して、下歯槽神経切断後5日目まで有意に低下した。下歯槽神経切断側の反対側で機械刺激逃避閾値の変化は観察されなかった。
- (2) 三叉神経節 Nitrate-Nitrite
三叉神経節のNOレベルを定量化するために、三叉神経節でNitrate-Nitriteの測定を行った。下歯槽神経切断3日目、同側の三叉神経節では、Nitrate-Nitriteの量が増加した。下歯槽神経切断6時間後においても、Nitrate-Nitriteの量が増加していたことから、下歯槽神経切断後にNOの生成が早期に開始すると考えられる。
- (3) サテライト細胞活性阻害薬およびNO基質三叉神経節内投与の効果
下歯槽神経切断3日目、三叉神経節ではnNOS陽性細胞数が増加し、NPLA三叉神経節内投与によって、その増加が抑制された。また、下歯槽神経切断3日目の顔面皮膚機械刺激逃避閾値の低下は、NPLA三叉神経節内投与によって抑制された。また、三叉神経節においてGFAP陽性細胞に囲まれたnNOS陽性細胞を解析した。三叉神経節においてはGFAP陽性細胞に囲まれたnNOS陽性細胞が増加した。しかしながらNPLA三叉神経節内投与によって、GFAP陽性細胞に囲まれたnNOS陽性細胞の増加が抑制された。
無処置ラットへのL-arginineの三叉神経節内投与によって、顔面皮膚機械刺激逃避閾値が低下した。
下歯槽神経切断3日目、三叉神経節においてGFAP陽性細胞が増加したが、その増加はFCの三叉神経節内投与によって抑制された。また、FCの三叉神経節内投与は顔面皮膚機械刺激逃避閾値の低下を抑制した。
- (4) 下歯槽神経切断部シュワン細胞の免疫組織化学的および生化学的解析
下歯槽神経切断5日目、切断部を含む左下顎骨を摘出し、脱石灰化を実施した。切片を作製し、抗Neurotrophin 3(NT-3)ウサギポリクローナル抗体または抗グルタミンシンターゼ(GS:シュワン細胞マーカー)マウスモノクローナル抗体を用いて、免疫組織化学的手法にて、NT-3陽性シュワン細胞を同定した。
- (5) 下歯槽神経切断部シュワン細胞の免疫組織化学的および生化学的解析
下歯槽神経切断5日目、切断部を含む下歯槽神経において、ほとんどのシュワン細胞にNT-3発現が認められた。Western blotting法を用いて、NT-3タンパク量が増加していることが確認された。

以上より、下歯槽神経損傷が三叉神経節ニューロンから放出されるNOを介してサテライト細胞の活性化につながることを示唆した。さらに、サテライト細胞の活性化は三叉神経節内の広い領域に広がり、非損傷ニューロンの興奮性に影響を与え、これが下歯槽神経損傷後の口腔顔面領域の異所性疼痛を引き起こすと考えられる。また、下歯槽神経損傷部のシュワン細胞でNT-3の合成およびその放出が促進され、NT-3シグナルが損傷三叉神経節ニューロンの可塑的变化を引き起こしている可能性がある。本研究成果は、下歯槽神経損傷部のNT-3シグナルおよび三叉神

経節における NO シグナルが下歯槽神経損傷後の口腔顔面領域の異所性疼痛に対する治療標的になることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Lee Jun, Ohara Kinuyo, Shinoda Masamichi, Hayashi Yoshinori, Kubo Asako, Sugawara Shiori, Asano Sayaka, Soma Kumi, Kanno Kohei, Ando Masatoshi, Koyama Ryo, Kimura Yuki, Sakanashi Kousuke, Iinuma Toshimitsu, Iwata Koichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Involvement of Satellite Cell Activation via Nitric Oxide Signaling in Ectopic Orofacial Hypersensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1252 ~ 1252
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21041252	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugawara Shiori, Shinoda Masamichi, Hayashi Yoshinori, Saito Hiroto, Asano Sayaka, Kubo Asako, Shibuta Ikuko, Furukawa Akihiko, Toyofuku Akira, Iwata Koichi	4. 巻 20
2. 論文標題 Increase in IGF-1 Expression in the Injured Infraorbital Nerve and Possible Implications for Orofacial Neuropathic Pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6360 ~ 6360
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20246360	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ikutame Daisuke, Urata Kentaro, Oto Tatsuki, Fujiwara Shintaro, Iinuma Toshimitsu, Shibuta Ikuko, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Aging-Related Phenotypic Conversion of Medullary Microglia Enhances Intraoral Incisional Pain Sensitivity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7871 ~ 7871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21217871	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ando Masatoshi, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Shibuta Ikuko, Furukawa Akihiko, Oto Tatsuki, Inada Takanobu, Matsui Tomoyuki, Fukaya Chikashi, Noma Noboru, Okubo Masakazu, Yonehara Yoshiyuki, Kaneko Tadayoshi, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Oxytocin-Dependent Regulation of TRPs Expression in Trigeminal Ganglion Neurons Attenuates Orofacial Neuropathic Pain following Infraorbital Nerve Injury in Rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9173 ~ 9173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21239173	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Asano Sayaka, Hayashi Yoshinori, Iwata Koichi, Okada-Ogawa Akiko, Hitomi Suzuro, Shibuta Ikuko, Imamura Yoshiki, Shinoda Masamichi	4. 巻 21
2. 論文標題 Microglia-Astrocyte Communication via C1q Contributes to Orofacial Neuropathic Pain Associated with Infraorbital Nerve Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6834 ~ 6834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21186834	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Tomoyuki, Hitomi Suzuro, Hayashi Yoshinori, Shibuta Ikuko, Otsuji Jo, Ando Masatoshi, Inada Takanobu, Soma Kumi, Iwata Koichi, Shirakawa Tetsuo, Shinoda Masamichi	4. 巻 63
2. 論文標題 Microglial activation in the trigeminal spinal subnucleus interpolaris/caudalis modulates orofacial incisional mechanical pain hypersensitivity associated with orofacial injury in infancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 170 ~ 173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.20-0648	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Koizumi Momoko, Asano Sayaka, Furukawa Akihiko, Hayashi Yoshinori, Hitomi Suzuro, Shibuta Ikuko, Hayashi Katsuhiko, Kato Fusao, Iwata Koichi, Shinoda Masamichi	4. 巻 26
2. 論文標題 P2X3 receptor upregulation in trigeminal ganglion neurons through TNF production in macrophages contributes to trigeminal neuropathic pain in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Headache and Pain	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s10194-021-01244-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsuchimochi Akane, Endo Chitose, Motoyoshi Mitsuru, Tamura Miki, Hitomi Suzuro, Hayashi Yoshinori, Shinoda Masamichi	4. 巻 in press
2. 論文標題 Effect of low-intensity pulsed ultrasound on orofacial sensory disturbance following inferior alveolar nerve injury: role of neurotrophin-3 signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 李 淳, 篠田雅路, 岩田幸一
2. 発表標題 Nitric oxide を介した衛星細胞の活性化は口腔顔面異所疼痛発症に關与する
3. 学会等名 第95回日本生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠田 雅路 (SHINODA Masamichi) (20362238)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	
研究分担者	岩田 幸一 (IWATA Koichi) (60160115)	日本大学・歯学部・特任教授 (32665)	
研究分担者	久保 亜紗子 (KUBO Asako) (70733202)	生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員 (63905)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------