

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19592111
 研究課題名（和文） 神経損傷に起因する口腔顔面領域の病的疼痛の発症機序に関する研究
 研究課題名（英文） Study on Pathogenesis of Oro-facial Neuropathic Pain Following Peripheral Nerve Injury
 研究代表者
 杉本 朋貞（SUGIMOTO TOMOSADA）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：50135729

研究成果の概要（和文）：ラット新生仔において末梢神経切断やカプサイシンの全身投与を行うと、損傷を受けた末梢知覚神経細胞は、神経栄養因子の欠乏に起因するカスパーゼの連鎖的活性化によるアポトーシスに陥ると考えられる。成熟ラットでは神経切断後のアポトーシスは稀で、切断された神経は興奮伝達を行うことができるが、脳内のニューロンの興奮性が上昇し些細な刺激に対して過剰反応を起し、病的疼痛が発症すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Both peripheral nerve section and systemic capsaicin treatment in newborn rats cause caspase-mediated apoptosis of injured peripheral sensory neurons. Nerve growth factor-deprivation appears to underlie the phenomenon. In adult rats the injury does not induce the neuronal death, and the surviving neurons appear to contribute to the post-traumatic neuropathic pain by excessive pain signal transmission.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：神経切断、三叉神経、神経因性疼痛、カスパーゼ、カプサイシン、ニューロン

1. 研究開始当初の背景

口腔や顔面は疼痛を主訴とする各種疾患の好発部位である。口腔顔面痛はその症状自体がおおきな苦痛であるばかりでなく、摂食や会話など口腔顔面の機能を大きく損なう場合が多いため、その原因・発症機序を解明し、ひいては予防や治療の方法を確立することが歯学研究の重要な課題のひとつである。口腔顔面痛は、歯髄炎、歯周疾患、粘膜疾患、顎関節疾患など、末梢組織に起こった器質的な変化が原因として特定できるものも多いが、原因不明のものも多く残されている。しかし、従来原因不明とされていた疼痛の代表例である三叉神経痛の症例の多くが三叉神経根の減圧術によって治療可能となるなど、近年の臨床的研究の成果から、口腔・顔面領域の疼痛の中には、末梢神経系に加わる各種の侵襲によって引き起こされる神経因性疼痛が多く含まれるものと考えられるようになってきた。

一方、動物実験において、末梢神経に切断や慢性的圧迫などの侵襲を加えた場合、痛覚過敏 (hyperalgesia) や異痛症 (allodynia) などの神経因性疼痛が起こることが報告されている。三叉神経の末梢枝は顔面頭蓋の複雑な骨構造の間を走行するため、顎骨の炎症や変形によって刺激や圧迫を受けやすく、また歯科疾患の治療に際しては規模の大小にかかわらず観血的処置が含まれることが多いため、微小な神経損傷が不可避となる場合が多い。また口腔顔面領域では、不正咬合など病的かつ慢性的な刺激が起きやすいことに加えて、義歯装着や矯正の歯牙移動に際しての持続的圧力など、医療行為によっても末梢神経に慢性的な刺激に加わる場合が多い。以上の状況より本研究代表者は実験動物における三叉神経系や脊髄神経系をモデルとして、体性感覚系の侵害情報処理機構の解明と末梢神経損傷が末梢及び中枢神経系内の侵害情報処理機構

に与える影響の分析を研究テーマとして研究活動を行ってきた。その結果、体性感覚を伝える1次求心ニューロンは、成熟後に末梢神経切断などの侵襲をこうむった場合には細胞死に陥ることなく生存を続けるが、それら1次ニューロンに接続する中枢内2次ニューロンには器質的及び機能的な変化が誘発されることが明らかとなった。一方出生直後のラットの末梢神経に侵襲を加えると、1次ニューロンは急激にアポトーシスによる細胞死に陥り、それらに接続する中枢内の2次及び3次ニューロンにも連鎖的にアポトーシスが誘発されることがわかった。またこの1次ニューロンの細胞死に伴い、侵襲を受けなかった1次ニューロンは中枢内で可塑的な変化を起こし、新たなシナプス回路を形成することが証明された。

2. 研究の目的

末梢神経切断や圧迫が神経因性疼痛の原因となることは既に知られているが、そのような刺激がどのような機序で神経因性疼痛を発症させているかは未だに不明である。既に述べたように、末梢神経切断は1次ニューロンの機能を低下させ、場合によっては1次ニューロンに細胞死を誘発する。本研究では種々の神経毒の投与や外科的侵襲によって幼若及び成熟ラットの末梢神経に損傷を与え、体性感覚系の神経組織に誘発される変化を解明する。外科的侵襲は臨床的に遭遇することの多い、痛みを伴う末梢神経損傷（切断や挫滅）を想定しているが、神経毒の投与は特定の生化学的特性を持つニューロンを選択的に破壊し、それによって惹起される痛覚関連行動の変化を分析することにより、どのような種類のニューロンの障害が末梢神経切断による神経因性疼痛の発症にかかわっているのかを解明する目的で行う。

実験的神経損傷の後、幼若ラットでは、主として直接的に侵襲を受けた1次ニューロン及びそれら1次ニューロンのシナプス入力を受ける中枢内の知覚ニューロンに誘発される細胞死の様態を分析する。この実験系ではTUNEL染色や免疫組織化学染色により、1次ニューロンの細胞死がcaspase-3の活性化と、それに続くDNAの断片化によるものであることを研究代表者等が報告しているが、caspase-3を活性化するメカニズムについて同じ遺伝子ファミリーに属する他の酵素群の動態を早急に解明する必要がある。また中枢内では眼窩下神経の切断により、視床の知覚ニューロンにDNAの断片化が起こることを証明しているが、ここでも同様にcaspaseファミリーの酵素群が関与することを本研究によって実証できると期待している。一方、成熟ラットでは脊髄神経損傷後も大部分の1次ニューロンが生存を続けるが、本来触覚や圧覚の感覚情報を伝える延髄後索核のニューロンが微弱な刺激に反応してc-fos遺伝子を発現し、病的な痛みの発生に関与する可能性が示唆されている。本研究では、坐骨神経切断後に見られる延髄後索核でのc-fos誘発に相当する病的興奮が三叉神経系においてもみられるか否かを検討する。さらに、そのメカニズムを解明するため、痛みの伝達物質サブスタンスPの受容体であるNK1を合成するニューロンを、合成神経毒であるSP-saporinを用いて選択的に破壊することにより、末梢神経切断後の病的疼痛のメカニズムを解明する。なお幼若ラットと成熟ラットでは侵襲を受けた1次ニューロンの運命（生死）に大きな隔りがあることに着目し、成熟期と幼若期の神経損傷実験のコントロールとしてそれぞれ幼若ラットと成熟ラットを用い、比較することで研究の完成に導く計画である。

3. 研究の方法

(1) ラット新生仔において誘発される1次知覚ニューロンの細胞死： ラット新生仔に神経損傷（末梢神経の切断あるいは神経毒の全身投与）を加え、1次ニューロンの細胞死を誘発する。損傷後12～48時間の生存期間をおいた後、ラットを灌流固定し、損傷を受けた1次ニューロンを含む知覚神経節の凍結切片を作成し、caspase-3, 8, 9の免疫染色を施す。必要に応じてTUNEL染色やNissl染色をも行う。顕微鏡像を形態計測額的手法によって分析する。

(2) 成熟ラットの神経切断による神経因性疼痛の発症： 成熟ラットの三叉神経末梢枝を切断し、2週間後に切断神経の近位端に電極を設置し、電気刺激（0.1 mA、0.5 msの矩形波で5 Hz、10分間）を加える。2時間後にラットを灌流固定し、三叉神経知覚核群を含む下位脳幹の凍結切片を作成し、c-Fosの免疫染色を施す。顕微鏡像を形態計測額的手法によって分析する。

4. 研究成果

ラット新生仔の坐骨神経切断後、16時間から48時間にかけて受傷一次ニューロンの細胞体を含む切断側第5腰神経後根神経節のニューロンに、TUNEL染色によって標識されるDNAの断片化及び活性型caspase-8、-9と-3の免疫活性が観察された。坐骨神経切断後24時間の非切断側ではいずれのcaspase陽性ニューロンは極めて少なかった（<0.1%）が、切断側では4.4%、2.7%、4.2%のニューロンにcaspase-3、-8、-9の免疫活性を認めた。なお、坐骨神経切断12～72時間のいずれの時間においてもcaspase-8の発現率は-3や-9と比較して少なかった。TUNEL染色とcaspaseの二重染色による分析の結果、今回検索した3種のcaspaseの活性を示すニューロンの大

部分(92.5~94.6%)がTUNEL陽性反応を示したことから、これらのcaspaseがcascadeを構成し、アポトーシスの開始期に必要なシグナル伝達を行っているものと考えられる。

神経切断と対比するため、ラット新生仔にカプサイシン50mg/kgを全身投与(背部皮下)することによってnerve growth factor依存性の1次求心ニューロンの細胞死を誘発し、第3-5腰髄後根神経節で活性化型caspase-3、-8、-9の免疫活性の検出を試みた。溶媒のみを投与した24時間後およびカプサイシン投与12時間後ではいずれのcaspaseについても免疫活性を示すニューロンは稀(<0.5%)であったが、カプサイシン投与24時間後ではcaspase-3、-8、-9陽性ニューロンはそれぞれ9.7%、4.7%、11.2%に達した。caspase-9は細胞内カルシウム濃度の上昇などによってミトコンドリアから細胞質に放出されるチトクロムCなどの作用によって活性化され、caspase-8は細胞表面におけるFas ligandの受容体結合によって活性化される。これらのcaspaseはカスケードの下流に位置するcaspase-3を活性化することによって細胞死を実行することが知られている。前年度の研究では刺激として末梢神経切断を行ったが、今回の結果もcaspase-3陽性ニューロンと-9陽性ニューロンの数はほぼ同数であり、-8陽性ニューロンの約2倍であった点で類似しており、神経切断とカプサイシン投与は1次求心ニューロンの細胞死の誘発に関して共通したメカニズムを持つものと考えられる。

三叉神経末梢枝の切断によって惹起される三叉神経核内2次ニューロンの興奮性変化を研究するため、成熟ラットの舌神経を切断し、2週間後に神経の切断端に電気刺激を加えたところ、三叉神経脊髄路核のうち、尾側亜核吻側部の背側部のI~IV層および吻

側亜核の背内側部にc-Fos陽性ニューロンがみられた。吻側亜核背内側部のc-Fos発現部位の周辺の孤束核および付近の網様体にもc-Fos陽性ニューロンがみられた。尾側亜核では1切片あたり約77個のc-Fos陽性ニューロンがみられ、対照群(切断のシャム手術と電気刺激)の約71個と比較して有意差がみられなかった。一方吻側亜核では、実験群で1切片あたり約40個のc-Fos陽性ニューロンがみられ、対照群の約25個と比較して有意の増加を示した。吻側亜核の背内側部は口腔内の受容野に特化した侵害情報の中継核と考えられており、口腔内の神経因性疼痛の発症においても重要な役割を果たしていると考えられる。

本研究代表者は、舌神経に替えて眼窩下神経の切断と刺激を行う実験に着手しているが、眼窩下神経に上記条件で電気刺激を行った場合、事前の神経切断の如何にかかわらず吻側亜核にはc-Fosの発現はほとんどみられないことがわかってきた。このことから、吻側亜核は神経損傷後の病的疼痛の発現メカニズムにおいても口腔内受容野に特化した病態発現部位であり、口腔内の神経因性疼痛の予防法や治療法開発のターゲットとなる可能性が高い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

1. H. Ichikawa, B.R. Zhao, M. Kano, Y. Shimizu, T. Suzuki, R. Terayama, S. Matsuzumi and T. Sugimoto. Tunicamycin-Induced Cell Death in the Trigeminal Ganglion is Suppressed by Nerve Growth Factor in the Mouse Embryo. 査読有り, Cell Mol Neurobiol., 電子版, 2009 Oct 17.

2. H. Ichikawa, R. Terayama, T. Yamaai, D.M. Jacobowitz, F. Qiu, M. Xiang and T. Sugimoto. Brn-3a deficiency transiently

increases expression of calbindin D-28 k and calretinin in the trigeminal ganglion during embryonic development. 査読有り, Cell Mol Neurobiol., 29:691-698, 2009

3. H. Ichikawa, R. Terayama, T. Yamaai and T. Sugimoto. Peptide 19 in the rat superior cervical ganglion. 査読有り, Neuroscience, 161: 86-94, 2009

4. H. Ichikawa, R. Terayama, T. Yamaai, Y. De Repentigny, R. Kothary and T. Sugimoto. The number of nociceptors in the trigeminal ganglion but not proprioceptors in the mesencephalic trigeminal tract nucleus is reduced in dystonin deficient dystonia musculorum mice. Brain Res., 1226: 33-38, 2008

5. R. Terayama, S. Omura, N. Fujisawa, T. Yamaai, H. Ichikawa and T. Sugimoto. Activation of microglia and p38 mitogen-activated protein kinase in the dorsal column nucleus contributes to tactile allodynia following peripheral nerve injury. Neuroscience, 153: 1245-1255, 2008

6. H. Ichikawa, R. Terayama, T. Yamaai, Z. Yan and T. Sugimoto. Brain-derived neurotrophic factor-immunoreactive neurons in the rat vagal and glossopharyngeal sensory ganglia; co-expression with other neurochemical substances. Brain Res., 1155: 93-99, 2007

7. H. Ichikawa, H-W. Jin, R. Terayama, T. Yamaai, S. Matsuo and T. Sugimoto. The reduction of proprioceptors in the mesencephalic trigeminal tract nucleus after neonatal masseteric nerve transection; effect of brain-derived neurotrophic factor. Brain Res., 1153: 98-102, 2007

[学会発表] (計 1 件)

1. 藤澤直子、寺山隆司、大村晋司、市川博之、山城 隆、杉本朋貞. 舌神経損傷後の三叉神経知覚核群におけるニューロンの興奮性の変化. 第 32 回歯科基礎医学会大会. 2009. 9. 10. 新潟.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 50135729

(2) 研究分担者 : なし

(3) 連携研究者

市川 博之 (ICHIKAWA HIROYUKI)
東北大学・大学院歯学部研究科・教授
研究者番号 : 20193435

寺山 隆司 (TERAYAMA RYUJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 : 60333689

山合 友一郎 (YAMAAI YUICHIRO)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 00158057