

令和 4 年 5 月 16 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10049

研究課題名(和文) 下歯槽神経損傷後の異所性異常疼痛に対する三叉神経節内マクロファージの役割

研究課題名(英文) Macrophages in trigeminal ganglion contributes to the ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury

研究代表者

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：20362238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：下歯槽神経損傷後、口髭部に異所性機械アロディニアが生じた。下歯槽神経損傷後、三叉神経節のNO量が増加した。口髭部に投射する一酸化窒素合成酵素(nNOS)陽性三叉神経節ニューロン数が増加した。nNOS阻害により口髭部の発症する異所性機械アロディニアが减弱した。NaiveラットへのNO基質投与後、三叉神経節内の非神経細胞であるサテライト細胞の活性化と口髭部機械アロディニアが生じた。また、下歯槽神経損傷後のサテライト細胞活性化阻害は機械アロディニアを减弱した。以上より、下歯槽神経損傷後に合成が促進されるNOが三叉神経節ニューロンの興奮性を増強し、異所性疼痛が発症する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔顔面領域における異所性異常疼痛は、二次侵害受容ニューロンの興奮性増強により発症することが知られている。現在、口腔顔面領域における異所性異常疼痛に対して使用されている治療薬は、いずれも二次侵害受容ニューロンの興奮性増強を抑制することにより異常疼痛発症を抑制している。しかし、このような薬物が奏功しない口腔顔面痛患者は多い。本研究によって異所性異常疼痛発症に対する三叉神経節内の非神経細胞活性化の役割が解明できれば、従来の薬物では奏功しない難治性疼痛発症を抑制できる新規治療法の創造につながる。

研究成果の概要(英文)：Orofacial ectopic mechanical allodynia was developed following inferior alveolar nerve injury (IANI). The amount of nitric oxide (NO) in the trigeminal ganglion increased after IANI. The number of nitric oxide synthase (nNOS)-positive trigeminal ganglion neurons projected into the facial skin was increased. Inhibition of nNOS attenuated the ectopic mechanical allodynia. Following administration of NO substrate to the trigeminal ganglion in naive rats, activation of satellite cells which are non-neuronal cells in the trigeminal ganglion and the ectopic mechanical allodynia were induced. In addition, inhibition of satellite cell activation after IANI attenuated the ectopic mechanical allodynia. These results indicate that NO is a key molecule involved in neuron-satellite glial cell communication and associated with mechanical allodynia in the broad orofacial area following trigeminal nerve injury.

研究分野：口腔生理学

キーワード：異所性疼痛 下歯槽神経損傷 一酸化窒素 三叉神経節

### 1. 研究開始当初の背景

下歯槽神経損傷後に損傷神経の支配部位を超えた顎口腔顔面の広い領域に異常疼痛が発症することは、よく知られている。このような損傷神経の支配部位を超えた異常疼痛(異所性異常疼痛)の発症には中枢神経系の可塑的变化が関与するだけでなく、下歯槽神経の損傷に起因した非損傷三叉神経節ニューロンの興奮性増強により発症することを明らかにされている。我々は、下歯槽神経損傷後に起こる、三叉神経節に存在する非神経細胞の活性化、活性化非神経細胞からの Chemical Mediator の放出、放出される Chemical Mediator による非損傷三叉神経節ニューロンの興奮性増強、が損傷神経の支配部位を超えた顎口腔顔面の広い領域生じる異常疼痛を発症させることを明らかにしてきた。しかしながら、どのようなメカニズムで三叉神経末梢枝の損傷が三叉神経節に存在する非神経細胞を活性化させるのか、明らかにされていない。

これまでに、非神経細胞であるマクロファージの活性化因子の一つである Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) はマクロファージを強力に活性化して、一酸化窒素(NO)放出を促すことが知られている。また申請者は、下歯槽神経損傷後に三叉神経節内に放出される NO が非損傷三叉神経節ニューロンの興奮性を増大することを見出ししている。したがって、IFN- $\gamma$  シグナルは NO 合成・放出増強シグナルである可能性が非常に高い。以上から、下歯槽神経損傷に起因した異所性異常疼痛発症には IFN- $\gamma$  シグナルによる非神経細胞の活性化と NO 放出が重要な役割を果たしているとの仮説をたて、実験を計画した。また、本研究は IFN- $\gamma$  /NO シグナルをターゲットとしているが、別のシグナルが非神経細胞活性化に関与する可能性も十分考えられる。その場合は、候補シグナルを変更するなど適切に軌道修正を行うこととした。

得られる成果は、下歯槽神経損傷後に発症する口腔顔面領域の異所性異常疼痛発症に対する新たなメカニズムを示すだけでなく、三叉神経節内における非神経細胞の活性化をターゲットとした新規異常疼痛治療法の開発に寄与するものである。

### 2. 研究の目的

本研究では、下歯槽神経損傷後に IFN- $\gamma$  /NO シグナルを介した三叉神経節内非神経細胞の活性化および三叉神経節ニューロンの興奮性増強が生じるのか、その三叉神経節ニューロンの興奮性増強が異所性異常疼痛発症に関与するのか、という「問い」に対する回答を得ることを目的とした。

本研究の仮説が正しければ、下歯槽神経損傷に起因した非神経細胞活性化を抑制することで非損傷三叉神経節ニューロンの興奮性増強を抑制し、効率的に口腔顔面領域における異所性異常疼痛発症を抑制するという学術的独自性のあるアイデアに基づく口腔顔面領域の新規異所性異常疼痛治療薬の創造につながる。

### 3. 研究の方法

#### (1) 下歯槽神経切断 (IANX) モデルの作製と口腔顔面領域の異所性疼痛の評価

本研究では、Sprague Dawley 雄ラットを使用した。深麻酔下にて、左顔面皮膚と咬筋を切開して歯槽骨の表面を露出させた。下歯槽神経上の歯槽骨をラウンドバーにて除去した後 IANX を露出させた。露出させた IANX の 2 カ所 (5 mm 間隔) を 4-0 絹糸できつく結紮し、2 カ所の結紮糸の間を切断し、切断 IANX を両切断端にギャップがないように下顎管に再配置した (IANX 群)。またコントロールとして、IANX の結紮切断以外、上記と全く同じ操作を行った (sham 群)。両群とも切開した皮膚は 6-0 の絹糸を使用して縫合された。

まず、ラットを穴の開いたプラスチックケージに入れた状態で von Frey filaments を用いて左口髭部皮膚に機械刺激を行い、非侵害機械刺激を加えたときには頭をプラスチックケージの穴から突き出した状態を保つようにラットを訓練した。訓練終了後、左口髭部皮膚へ 4、6、8、10、15、26、および 60g の機械刺激を強度の低い順に行った。5 回の機械刺激のうち 3 回以上頭を引っ込める行動を引き起こした場合、その機械刺激強度を機械刺激に対する頭部逃避閾値 (MHWT) とした。MHWT の測定は IANX または sham 処置後 5 日間行った。すべての MHWT の測定は盲検条件下で実施された。

#### (2) NO の測定

NO は、生体膜を自由に通過し、細胞シグナル伝達因子として作用する不安定なフリーラジカルガスとして生体内に存在することが知られている。したがって、NO レベルの定量化として血清 NO 代謝物 (硝酸塩/亜硝酸塩) を測定した。IANX または sham 処置後 3 日目、深麻酔下にてラットを生理食塩水で経心的に灌流した。三叉神経節を取り出してリン酸緩衝生理食塩水中でホモジナイズしたのち、抽出液を遠心分離した。抽出液の上清中の硝酸塩量および亜硝酸塩量は、硝酸塩/亜硝酸塩比色分析キットを使用して測定した。iMark マイクロプレート吸光度リーダーを使用してそれぞれの吸光度値を測定した。

#### (3) 三叉神経節内薬物投与

深麻酔下にて、ラット頭部を固定して頭蓋骨を露出させ、三叉神経節直上に穴（直径：1 mm）を開けた。この穴を通してガイドカニューレを IANX と同側の三叉神経節に設置し、頭蓋骨に固定した。ガイドカニューレ設置後 7 日目、IANX または sham 処置を行った。

IANX または sham 処置後より、グリア細胞活性化阻害薬であるフルオロシトレート（FC; 100 fmol）または vehicle をガイドカニューレに挿入したシリコンチューブを介して浸透圧ポンプで 3 日間連続投与した。また、ガイドカニューレを介して NO 合成酵素阻害薬である N-プロピル-L-アルギニン塩酸塩（NPLA; 0.4 μM）または vehicle を 1 日 1 回 3 日間投与した。

無処置ラットにガイドカニューレを介して NO 基質である L-アルギニン（0.5 μM）または vehicle を 1 日 1 回 3 日間投与した。

#### （4）免疫組織化学染色

左口髭部皮膚を支配する三叉神経節ニューロンを同定するため、IANX または sham 処置 7 日前に逆行性標識トレーサー（DiI）を左口髭部皮膚に注射した。FC、NPLA、L-アルギニンまたは vehicle を投与したラットにおいて、IANX または sham 処置後 3 日目、深麻酔下にて 4% パラホルムアルデヒドを含む固定液で経心的に灌流固定した。灌流後に三叉神経節を摘出し、後固定後 20% スクロースに 12 時間浸漬した。三叉神経節の凍結切片を作成し、切片をマウス抗 glial fibrillary acidic protein (GFAP) モノクローナル抗体およびヤギ抗 neuronal nitric oxide synthase (nNOS) ポリクローナル抗体に反応させた。洗浄後、AlexaFluor488 標識ヤギ抗マウス IgG または AlexaFluor594 標識ロバ抗ヤギ IgG と反応させ、封入した。GFAP 陽性細胞に囲まれた DiI 標識三叉神経節ニューロンおよび nNOS 免疫反応性 TG ニューロン数を解析した。

### 4. 研究成果

#### （1）IANX による口腔顔面領域の異所性疼痛と三叉神経節内 NO 放出

IANX 後 1 から 5 日目まで、IANX 側の左口髭部皮膚の MHWT は有意に低下した。sham 処置後 1 日目、同側の左口髭部皮膚の MHWT は有意に低下したものの、3 日目には回復した（図 1）。

三叉神経節の NO レベルを解析するため、三叉神経節における硝酸塩と亜硝酸塩を定量した。IANX 後 6 時間で硝酸塩と亜硝酸塩量が増加した。IANX 後 3 日目の硝酸塩と亜硝酸塩量は増加傾向にあった（図 2）。

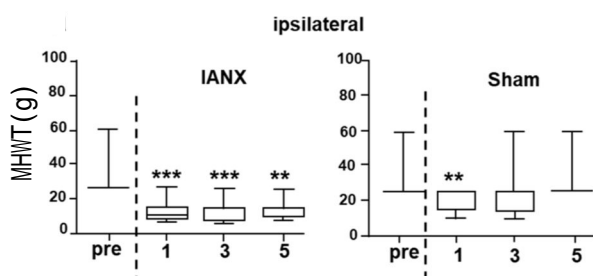


図 1 IANX 後の MHWT

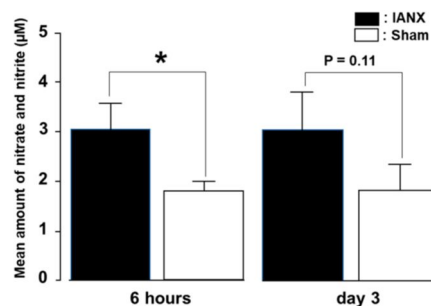


図 2 IANX 後の三叉神経節内 NO 量

#### （2）三叉神経節内薬物投与による異所性疼痛の変化

IANX 後 3 日目に低下した左口髭部皮膚の MHWT は、三叉神経節内 NPLA 投与によって抑制された（図 3）。さらに、無処置ラットの三叉神経節への L-アルギニン投与は、15 分後から 120 分後まで MHWT を有意に低下させた（図 4）。

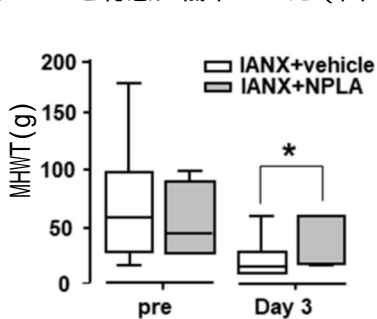


図 3 NPLA 投与後の MHWT

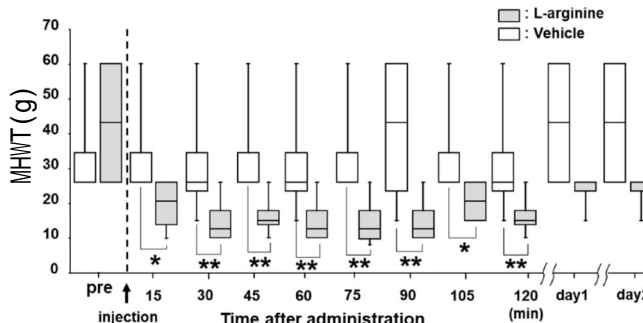


図 4 L-アルギニン投与後の MHWT

#### （3）IANX 後の三叉神経節内薬物投与による非神経細胞の変化

IANX 後 3 日目に非神経細胞であるサテライト細胞が活性化し、その活性化は三叉神経節内 NPLA 投与によって抑制された（図 5a）。さらに、無処置ラットの三叉神経節への L-アルギニン投与は、非神経細胞であるサテライト細胞を活性化させた（図 5b）。

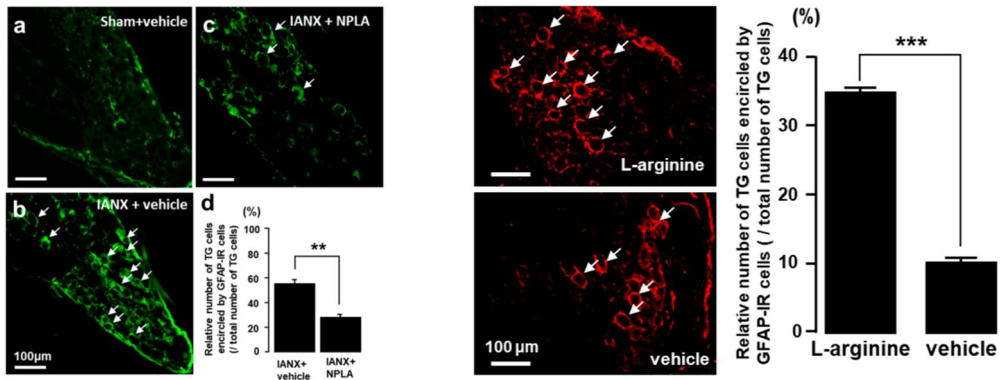


図5 NPLA(a)またはL-アルギニン(b)三叉神経節内投与後のサテライト細胞活性化

(4) IANX 後の nNOS 陽性三叉神経節ニューロンの変化

IANX 後、非神経細胞であるサテライト細胞に囲まれた nNOS 陽性三叉神経節ニューロンが観察された。IANX により nNOS 陽性三叉神経節ニューロン数が有意に増加した(図6)

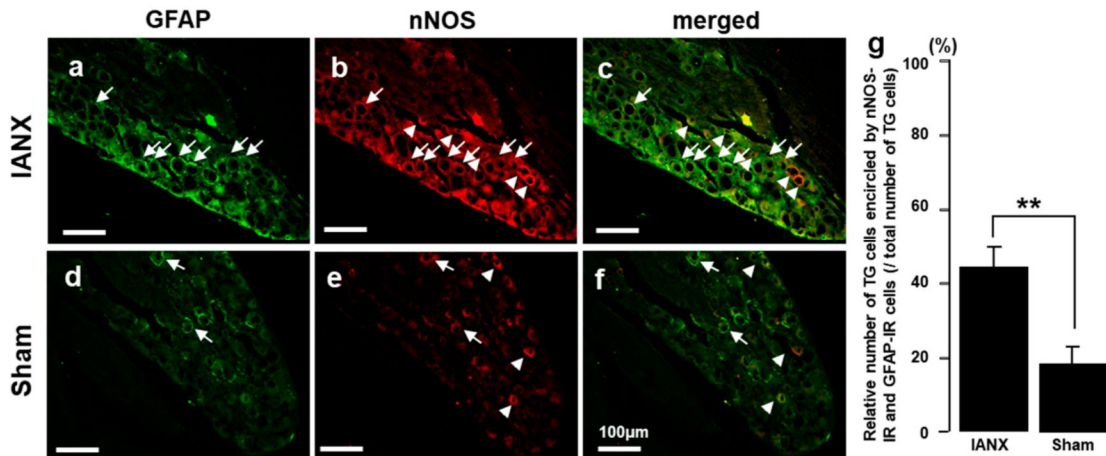


図6 IANX 後の nNOS 陽性三叉神経節ニューロン数

本研究の成果は以下のように要約される。 IANX によって口髭部皮膚に機械アロディニアが発症した。 IANX によって同側の三叉神経節ニューロンが NO の合成を促進し、NO は三叉神経節内に放出された。 NO 合成阻害は、IANX による非神経細胞の活性化と機械アロディニアを抑制した。 三叉神経節への NO 基質投与は、口髭部皮膚に機械アロディニアを引き起こした。以上より、IANX によって生じる口腔顔面領域の異所性疼痛には NO を介した三叉神経節ニューロンと非神経細胞のコミュニケーションの増強が関連することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Shinoda Masamichi
2. 発表標題 Common pathophysiological features in burning mouth syndrome and irritable bowel syndrome.
3. 学会等名 第68回JADR総会・学術大会Symposium 3 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠田雅路
2. 発表標題 口腔内疼痛に対するTRPチャネルの関与
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会企画シンポジウム7「内臓痛・内臓感覚の機能形態学的基盤とその異常がもたらす病態」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 篠田雅路
2. 発表標題 顎関節症と痛み
3. 学会等名 日本線維筋痛症学会第11回学術集会シンポジウム5「基礎研究における線維筋痛症とその関連疾患」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠田雅路
2. 発表標題 摂食行動を障害する舌異常疼痛
3. 学会等名 第97回日本生理学会大会企画シンポジウム26「摂食行動に影響する感覚・脳機能の新知見：概日リズム、嚥下、味覚、疼痛」
4. 発表年 2020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	林 良憲 (HAYASHI Yoshinori) (80582717)	日本大学・歯学部・准教授  (32665)	
研究分担者	人見 涼露 (HITOMI Suzuro) (70548924)	日本大学・歯学部・講師  (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 亜抄子 (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
---------	---------