

機関番号：27102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成20～22

課題番号：20592377

研究課題名（和文） 顔面部癌性疼痛および神経因性疼痛における脊髄路核知覚神経の
再建機構の解明研究課題名（英文） **The elucidation of the reconstruction mechanism of the nucleus tractus
spinalis sensory nerve in region of face cancer pain and the neuropathic pain**

研究代表者

仲西 修 (NAKANISHI OSAMU)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50137345

研究成果の概要（和文）：本研究では、ラットの顎・顔面部レベルにおける癌性疼痛および神経因性疼痛の病態について脊髄の神経－グリア相互作用の時系列的・局所的変化を解明し、神経栄養因子誘導による治療が予防的および慢性期に治療応用できるか否か、基礎的知見を得る目的で研究を行った。

まず、眼下部に Freund's adjuvant あるいは Walker256 B を注入した炎症性疼痛と癌性疼痛ラットモデルを作成し、抗炎症薬インドメタシンを炎症性疼痛ラットおよび癌性疼痛ラットに投与し、両疼痛の相違を明らかにした。さらに神経因性および癌性疼痛ラットの組織切片での c-fos 遺伝子の発症初期での発現を明らかにした。さらに、神経因性疼痛ラットに COX-II 阻害薬、p38MAPK 阻害薬、マイクログリア不活性化薬をそれぞれ投与すると、各薬物で疼痛行動は有意に抑制した。このことより神経因性疼痛は発症初期に脊髄グルタメート神経系の活性化が引き金になり、連鎖する p38-MAPK の活性化がおこり、脊髄神経系のシナプス伝達が著しく修飾され、近傍の炎症担当細胞マイクログリアが活性化し、COX-II、p38-MAPK の活性化や BDNF (脳由来神経栄養因子) 遊離を伴うことが統合して発症することが判明した。神経因性疼痛および癌性疼痛ラットにおけるマイクログリアおよびアストロサイトの関与を検討するため三叉神経節組織切片の免疫染色をそれぞれ GFAP、Iba1 で行った。その検討、神経因性疼痛および癌性疼痛のいずれ疼痛発症初期にマイクログリアの活性化が見られ、遅れてアストロサイトの活性化が認められた。また、癌性疼痛ラットへのマイクログリア不活性化薬の皮下注を行うと癌性疼痛の有意な低下が認められた。このことより、神経因性疼痛および癌性疼痛のいずれの疼痛機構においても脊髄-マイクログリアの相互作用が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, we elucidated effect of the spinal nerve - glia interaction on cancer pain and/or neuropathic pain of the rat regio infraorbitalis and studied it for the purpose of obtaining an underlying finding whether or not the treatment by the neurotrophin factor was effective. At first we made the inflammatory pain and cancer pain rat model that injected Freund's adjuvant or Walker256 B into the rat regio infraorbitalis and gave antiphlogistic indomethacin to an inflammatory pain rat and a cancer pain rat to determine difference in both pain. Furthermore, we determined manifestation by the early period of onset of the c-fos gene in the merotomy of the neuropathic pain and the cancer pain rat. The pain behavior significantly inhibited it with each drug when COX-II inhibitor, p38MAPK inhibitor, microglial inactivator were given to the neuropathic

pain and the cancer pain rat, respectively. In the neuropathic pain, activation of the spinal cord glutamate nervous system occurs early in the onset, and activation of p38-MAPK occurs successively, Synaptic transmission of the spinal nerve system was modified remarkably, and the microglia which was inflammation charge cells nearby activated it, and what it integrated it to be accompanied with COX-II, activation and BDNF (brain-derived neurotrophic factor) isolation of p38-MAPK, and developed in neuropathic pain became clear. We performed immunostaining of the trigeminal ganglion merotomy in GFAP, Iba1 to examine the microglia and astrocytic in neuropathic pain and the cancer pain rat contribution, respectively. Microglial activation was found early in the pain onset in both of the examination of the neuropathic pain and the cancer pain, and astrocytic activation was found late. Also, a significant decrease of cancer pain was found when subcutaneous injection of the microglial inactivator to a cancer pain rat was provided. By this result, It was found that spinal cord - microglial interaction was involved in both pain mechanisms of neuropathic pain and cancer pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,500,000	450,000	1,950,000
21年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22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・外科系歯学

キーワード：癌性疼痛、神経因性疼痛、グリア、細胞再生

1. 研究開始当初の背景

近年、さまざまな難治性神経疾患は、患者の生活の質低下、医療費高騰に大きな影響を及ぼしている。したがって、それら疾患の病態メカニズムの解明とそれに基づく治療法の確立が極めて急務と考えられる。神経因性疼痛や癌性疼痛などの慢性疼痛も例外ではなく未だ有効な治療法が無い。我々は、末梢組織障害後の三叉神経痛覚過敏の発現およびその維持機構の研究に平成10年度より着手し、ラット口唇部の末梢神経組織の障害後に誘発される痛覚過敏行動での末梢組織グルタミン酸神経系の過剰興

奮、及び GABA/Glycine 含有ニューロンの脱抑制の関与を神経-グリア相互作用を含めた、時系列的メカニズムの解明に取り組んでいる。これらの基本的なメカニズムは最近、Woolf ら (Pain, 114:2005, 149-159) がグリア細胞の転写因子に時系列的変化が起きること、また Tanga ら (Neuroscience, 140:2006, 1003-101) も、アストロサイトの関与を報告したが三叉神経脊髄路核における神経-グリア相互作用を時系列に解明したものはない。また、平成15年度より顔面部の神経因性疼痛や癌性疼痛をもたらす病態の初期での三叉神経脊髄路核における

シナプス伝達の変調におけるグリア活性の関与は考えられるが、その詳細についてはいまだ全く不明なのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では炎症性疼痛と癌性疼痛の差異を明らかにするとともに顔面部の神経因性疼痛や癌性疼痛をもたらす病態の初期での三叉神経脊髄路核におけるシナプス伝達の変調を明らかにする。また、グリア活性と密接な神経栄養因子の役割や、その治療の可能性について解明する。すなわち、本研究では神経因性疼痛および癌性疼痛の分子機構解明、つまり脊髄の神経—グリア相互作用の時系列的・局所的变化を解明する。

3. 研究の方法

1. 動物モデルの作製

炎症性疼痛、神経因性疼痛および癌性疼痛モデルの作製：疼痛モデルとして4週齢のWistar ラットを用いた。抱水クロラル腹腔内投与による麻酔下でラット眼下部に Freund's adjuvant を注入した炎症性疼痛群およびラット右側眼下窩神経管内に生体用シリコン 0.1ml 注入した神経因性疼痛群あるいは右側眼下部に 1 ml 注射器にて、癌細胞（Walker256B carcinocarcinoma ; 2×10^6 ）を注入した癌性疼痛群を作成した。炎症性疼痛群と癌性疼痛群の疼痛機構の差異を明らかにするため、抗炎症薬インドメタシンを両群ラットの腹腔内に投与した。

2. 分子病理学的検討

神経因性疼痛群と癌性疼痛の疼痛機序を検討するため、モデル作成 1、3、7 日目の脊髄を摘出、凍結し、クライオスタットで厚さ 10-40 μm の凍結切片を作成した。これらの組織切片に対して c-fos 遺伝子発現を in situ hybridization 法にて検討した。また、異なる組織切片で DNA 断片化に対する TUNEL 染

色と Fas、Fas-ligand に対する免疫染色を検討した。

PCR データの処理に画像解析装置を用い、能率良くまた高次解析を行った。

4. 研究成果

眼下部に Freund's adjuvant を注入した炎症性疼痛群あるいは Walker256 B を注入した癌性疼痛群の両者に抗炎症薬インドメタシンを腹腔内投与すると炎症性疼痛群では有意に疼痛軽減が認められたが、癌性疼痛群では有意な変化は認められなかった。このことより、炎症性疼痛と癌性疼痛の疼痛機序の差異が明らかとなった。神経因性および癌性疼痛ラットの組織切片での c-fos 遺伝子の発症初期での発現を明らかにした。さらに、神経因性疼痛ラットに COX-II 阻害薬、p38MAPK 阻害薬、マイクログリア不活性化薬をそれぞれ投与すると、各薬物で疼痛行動は有意に抑制した。このことより神経因性疼痛は発症初期に脊髄グルタメート神経系の活性化が引き金になり、連鎖する p38-MAPK の活性化が起こり、脊髄神経系のシナプス伝達が著しく修飾され、近傍の炎症担当細胞マイクログリアが活性化し、COX-II、p38-MAPK の活性化や BDNF (脳由来神経栄養因子) 遊離を伴うことが統合して発症することが判明した。神経因性疼痛および癌性疼痛ラットにおけるマイクログリアおよびアストロサイトの関与を検討するため三叉神経節組織切片の免疫染色をそれぞれ GFAP、Iba1 で行った。その検討、神経因性疼痛および癌性疼痛のいずれ疼痛発症初期にマイクログリアの活性化が見られ、遅れてアストロサイトの活性化が認められた。また、癌性疼痛ラットへのマイクログリア不活性化薬の皮下注を行うと癌性疼痛の有意な低下が認められた。このことより、神経因性疼痛および癌性疼痛のいずれの疼痛機構においても脊髄-マイクログリアの相

相互作用が関与することが明らかとなった。

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)

1. Ono K, Asami R, Miyahara N, Nakanishi O, Inenaga K., Neuronal effects of neurokinin B on the rat subfornical organ. *Neuroreport*. 2011 11,22(8):374-81.
2. Harano N, Ono K, Hidaka K, Kai A., Nakanishi O, Inenaga K. Differences between orofacial Inflammation and cancer Pain, *J. Dent. Res.*, Vol 89, 2010, 615-620.
3. Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O., The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. *Oral Dis*. 2010 Dec 23. doi:
4. Hidaka K, Ono K, Harano N, Sago T, Nunomaki M, Shiiba S, Nakanishi O, Fukushima H, Inenaga K., Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. *Neuroscience*. Vol180, 2011, 334-43.
5. Asami R, Ono K, Nakanishi O, Inenaga K. Distinct mechanisms underlie the regulation of body fluid balance by neurokinin B and angiotensin II in the rat brain. *Brain Res*. Vol180, 2011, 179-86.
6. 山田史子、吉田充広、椎葉俊司、布巻昌仁、仲西修、ラット炎症性疼痛の機構に脊髄神経-グリア相互作用が関与する、*九歯学会誌*、180, 2011, 334-34
7. Y Shizuoka, T Ariyoshi, O Nakanishi, K Fukuhara, S Yamamoto, M Yamamoto, T Ishikawa: The analgesic Effect of agmatine in formalin-induced Pain is enhanced by a non-competitive NMDA receptor antagonist, *Pain Research*, 2010, 25(1), p55-63
8. K Fukuhara, K Ishikawa, S Yasuda, O

Nakanishi, T Ishikawa ; The brain derived neurotrophic factor potently mediate neuro-plasticity of sensory-limbic systems with a concurrent depression-like behavior in chronic pain. *Pain Research*, 2011, 26(1) (in printing)

9. 長畑佐和子、小野堅太郎、原野望、仲西 修, ラット三叉神経領域における癌性疼痛モデルの開発、*日歯麻誌*、35, 21-28, 2007.
10. 石川敏三, 松本吉洋, 仲西 修, 石川浩三; 痛みの分子機構 {総説}: 脊髄の神経可塑性と脊髄上位下行性抑制系, *日本歯科麻酔学会誌*, 2010, 38(3), p249-256

[雑誌論文] (計 10 件)

1. KISHISHITA, S. YASUDA, K. ISHIKAWA, Y. IDA, O. NAKANISHI, T. ISHIKAWA. Biphasic activation of p-ERK in Limbic System evoked by persistent pain in rats , *Neuroscience 2011*, Washington Convention center, 2011, November, 14, S-12186.
2. Yasuda, K Ishikawa, K Fukuhara, O Nakanishi, T Ishikawa; The brain derived neurotrophic factor potently mediate neuroplasticity of sensory-limbic systems with a concurrent depression-like behavior in chronic pain, *Neuroscience2010* (2010,11,17) San Diego Convention Center, 741.19, p12-12
3. O. Nakanishi, Y. sizuoka, N. Harano, S. shiiba, M. Nunomaki. M. Yoshida, H. Kawahara, Agmatine is Enhanced by NMDA ReceptorAntagonist in Formalin-induced Pain 88th General ssection & Exhibition of the **ADR (2010, 7, 15)**, Centre Convencion Internacional Barcelona, Spain.
4. Nakanishi O, Ishikawa T, Harano N, Ishikawa K, Shizuoka Y, Shiibs S, The

analgesic effect of agmatine in formalin-induced pain is enhanced by an NMDA receptor antagonist. **Pain in Europa VI, Lisbon**, Portugal, Sep. 4-12, 2009.

5. **Nakanishi O.**: The clinic and the research of the orofacial pain in Japan 第2回アジア歯科麻酔学会、上海、Nov. 1-3, 2008.

6. Inenaga K, Ono K, **Kai A.**, **Nakanishi O.**; Temperature-dependent properties of rat subfornal organ neuron, **Neuroscience2008** (2008,11,17) Washington, USA, Nov, 15-19, 2008.

7. Nakamura S., Ariyosi T., Kagawa Y., Sasaki H., Furuta T., Mine Y., Matsumoto Y., **Nakanishi O.**, **Ishikawa T.**: Analgesic effects of agmatine enhanced by non-competitive NMDA receptor antagonist in formalin induced Pain. **Neuroscience2008** (2008,11,17) Washington, USA, Nov, 15-19, 2008.

[学会発表] (計7件)

歯科鎮静法ハンドブック 監修
永末書店(2011,5,16)

歯科麻酔学第7版
医歯薬出版 (2011,4,1)

[図書] (計2件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計1件)

名称：口腔内薬剤
投与具
発明者：仲西 修、株式会社石川鉄工所
権利者：
種類：
番号：特許3947784
取得年月日：平成19年4月27日
国内外の別：国内

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲西 修 (Nakanishi Osamu)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：50137345

(2) 研究分担者

石川 敏三 (Ishikawa Toshizo)
山口大学・医学部・教授
研究者番号：90034991

研究分担者

原野 望 (Harano Nozomu)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：50423976

研究分担者

甲斐 絢 (Kai Aya)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80453231

(3) 連携研究者

吉田充広 (Yoshida Mitsuhiro)
九州歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：40364153