

平成22年5月10日現在

研究種目：若手研究（B）  
 研究期間：2008～2009  
 課題番号：20791552  
 研究課題名（和文） 顔面神経因性疼痛に対するアストログリアの関与  
 研究課題名（英文） Astroglia in medullary dorsal horn are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms.  
 研究代表者  
 岡田 明子（旧姓 小川） (OKADA AKIKO)  
 日本大学・歯学部・専任講師  
 研究者番号：10434078

研究成果の概要（和文）：下顎の歯（三叉神経第三枝;V3 支配領域）を抜歯することにより、上顎の歯や頬部皮膚（三叉神経第二枝;V2 支配領域）に痛みを引き起こすこと（関連痛）があるが、その発症機構は明らかでない。また、難治性であるために患者は長年苦しむことがある。本研究により、神経の補助的役割しかなさないとされていたアストログリアが延髄で増加し活性化することにより、近傍の神経を活性化して、V3 障害後の V2 支配領域に関連痛を引き起こす可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：The present findings suggest that astroglia are involved in the enhanced excitability of medullary dorsal horn (MDH) nociceptive neurons and the associated referred pain in the superior maxillary nerve area from inferior alveolar nerve injury.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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：歯学，神経科学，生理学，脳・神経，細胞・組織

## 1. 研究開始当初の背景

下顎臼歯の抜歯などによる三叉神経第三枝の傷害後、三叉神経第二枝により支配されている上顎の歯牙や頬部皮膚に神経因性疼痛様の関連痛を引き起こすことがあるが、その関連痛の発症機構の詳細は明らかにされていない。また、患者が主訴とする疼痛部位と原因部位が異なるために誤診断、誤治療され、患者が長年苦しむこともある。正しく診断されても、関連痛は難治性であることが多

く、治療に難渋する。従来、神経因性疼痛の研究は末梢神経傷害モデル動物を用いて、神経細胞に焦点をあてたものであった。我々も、これまでに末梢神経傷害モデル動物を用いて、中枢神経細胞の研究を行ってきた。その結果、三叉神経脊髄路核尾側亜核（延髄後角：MDH）表層や第2頸髄後角表層の神経が深く関与していることを示した。また、神経細胞内ではc-fosやCaMKII $\alpha$ などがその情報伝達を担っていることを報告した。しかし、

未だにそのメカニズムには不明な点が多く存在する。近年になり、情報伝達に対し補助的な役割しか果たさないと考えられていたグリア細胞の活性が、神経因性疼痛に関与するという報告がなされるようになった (Clark et al 2006, Zhang and Koninck 2006)。グリアの一つであるアストログリアからグルタミンが遊離され、神経のシナプス前終末部から取り込まれて神経伝達物質として機能するといわれている (グルタミン-グルタメイトシャトル機構)。我々はこの機構に着目し、神経損傷後にアストログリアが活性化して神経のシナプス伝達を促進させると考えた。そこで我々は、三叉神経第三枝切断モデル (IAN ラット) を用いて、グリアの TCA 回路阻害薬であるフルオロ酢酸 (FA) を三叉神経脊髄路核に局所投与し侵害受容ニューロンの活動性変化について検索した。

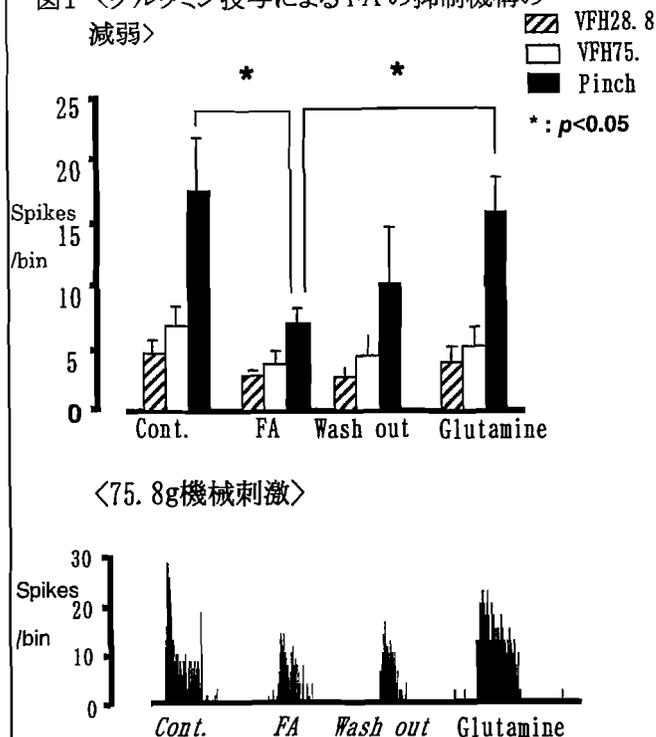
その結果、三叉神経第二枝領域受容野に対する機械刺激、熱刺激、冷刺激により誘発される三叉神経脊髄路核神経活動は、侵害刺激レベルにおいて FA 投与により有意に低下することを確認した。また、この FA の抑制効果はグルタミンを投与することにより減弱し、機械および熱冷刺激に対する応答が回復することを確かめた (図1)。

(1) Miller G. (2005) Neuroscience. The dark side of glia. Science. 308. 778-781.

(2) Clark AK et al (2006) Role of spinal microglia in rat models of peripheral nerve injury and inflammation. Eur J Pain. 11. 223-230.

(3) Zhang J, Koninck Y (2006) Spatial and temporal relationship between monocyte chemoattractant protein-1 expression and spinal glial activation following peripheral nerve injury. J Neurochem. 97. 772-783.

図1 <グルタミン投与による FA の抑制機構の減弱>



## 2. 研究の目的

上記背景のもと、我々はアストログリアが三叉神経脊髄路核内で増加、活性化することにより、三叉神経第三枝損傷後の三叉神経第二枝支配領域に及ぶ関連痛を引き起こす可能性があると考えた。よって、三叉神経第三枝神経障害モデルを作成し、行動学的観察法、電気生理学的手法、免疫組織化学的手法を用いて、三叉神経損傷により発症する神経因性疼痛に対し、アストログリアがどのような神経メカニズムで関与するかを解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) IAN 切断モデル作成 - 適麻酔下、SD 系雄性ラットの三叉神経第三枝 (V3) を切断 (IAN ラット)。また、神経の切断は行わず、下顎骨の切削のみ (Sham ラット) を行った。

(2) 行動学的観察 - IAN ラットと Sham ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核 (延髄後角: MDH) くも膜下腔にアストログリアの TCA 回路阻害薬であるフルオロ酢酸 (FA) または生食を、7日間持続投与した。手術前と手術後の FA ラットと Sham ラットの顔面三叉神経第二枝 (V2) 領域に、フォンフライヘアによる機械刺激や熱刺激を加え、逃避反応行動閾値を測定した。

(3) 電気生理学的研究 - 適麻酔下、IAN ラッ

トまたは Sham ラットを脳定位固定装置に固定後、MDH を露出した。臭化パンクロニウムにて非動化し単一ニューロン活動を記録した。V2 領域の顔面受容野に、侵害または非侵害性の機械刺激、熱刺激、冷刺激を与え、これらの刺激に応答する侵害受容ニューロンを同定し、受容野の大きさを測定した。次に MDH に FA を局所投与し、再び刺激に対するニューロン反応を測定した。その後、薬剤投与を中止し、0.9% 生食にて MDH 上プールを Wash out し、再び刺激に対するニューロン反応の測定を行った。その後、グルタミン酸を MDH に局所投与し、再び刺激に対するニューロン反応の測定を行った。

(4) 免疫組織化学的染色法 - IAN ラットまたは Sham ラットのくも膜下腔に、FA または生食を 7 日間持続投与し、さらに三叉神経第二枝領域に侵害または非侵害機械刺激を加えた。そして、4% パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。MDH 脳幹を取り出し、一次抗体 pERK (anti-Phospho-P44/42-Map Kinase; 細胞活性マーカー) または BrdU (細胞増殖マーカー) を用いて陽性発現を調べた。また、それぞれの抗体に GFAP (アストログリアのマーカー) または Iba1 (マクログリアのマーカー) 抗体を引き続き反応させ 2 重蛍光免疫染色発現様式を詳細に調べた。さらに、FA を MDH くも膜下腔に持続投与したラットの GFAP 発現を調べた。

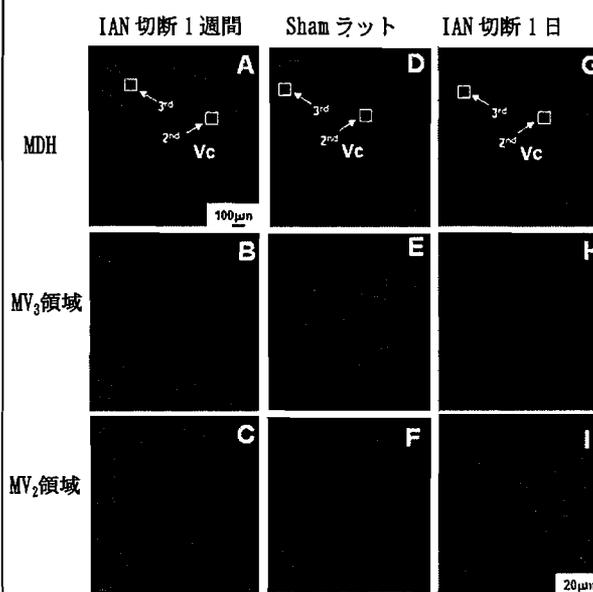
#### 4. 研究成果

MDH の三叉神経第三枝領域 (MV<sub>3</sub>) における GFAP (アストログリアのマーカー) 発現は、三叉神経第三枝切断後、MV<sub>3</sub> において有意に増加し、1 週間後には MDH の三叉神経第二枝領域 (MV<sub>2</sub>) にまで有意に広がった (図 2)。一方、Iba1 (マクログリアのマーカー) 発現は MV<sub>3</sub> において増加し始めたが、MV<sub>2</sub> にまでの広がりには認められなかった。また、GFAP や Iba1 と pERK (細胞活性マーカー) や BrdU (細胞増殖マーカー) との 2 重蛍光免疫染色では、MV<sub>3</sub> における GFAP、Iba1 陽性発現細胞共に、pERK と BrdU の陽性発現が認められた。一方、MV<sub>2</sub> における GFAP 陽性発現細胞において、pERK 陽性発現が認められたが、BrdU 陽性発現は認められなかった。以上の結果より、マクログリアでなく、アストログリアの MDH 内での広がりが、三叉神経領域に引き起こされる関連痛を引き起こす可能性が考えられた。また、MV<sub>2</sub> において増加した GFAP は細胞増殖によるものではなく、活性化 (アストログリアの肥大) によることが推察された。

また、IAN 切断後にみられた MV<sub>3</sub> と MV<sub>2</sub> における多くの GFAP 発現は、FA をくも膜下腔に 1 週間持続投与することにより、有意に減少した。

また、IAN ラットにおいて、V2 領域受容野に対する機械刺激、熱刺激、冷刺激により誘発される MDH 神経活動反応を再確認した。そして、侵害刺激レベルにおいて FA 投与により有意に低下したが、非侵害刺激レベルにおいては変化がないことを確認した。また、この FA の抑制効果はグルタミンを投与することにより減弱し、機械および熱冷刺激に対する応答が回復した。

図 2 <MDH 領域における BDNF 発現>



また、IAN ラットの三叉神経第二枝領域に侵害または非侵害機械刺激を与えると、MDH 表層に多くの pERK 陽性発現がみとめられた。しかし、FA を持続投与することにより、侵害機械刺激による pERK 陽性発現のみ有意に抑制された。この結果は、アロデニアよりも痛覚過敏の発症にグルタミン-グルタメトシヤトル機構が関与していることを示唆した。

以上の結果より、三叉神経第三枝損傷により、MDH の三叉神経第三枝領域から第二枝領域にかけてアストログリアが広がり、活性化されることがわかった。そして、アストログリアにおいて合成されたグルタミンにより、MDH 神経細胞の異常興奮が生じることがわかった。活性化された神経細胞内では、細胞内情報伝達系である ERK のリン酸化が重要な働きをなすと考えられた。この神経細胞の

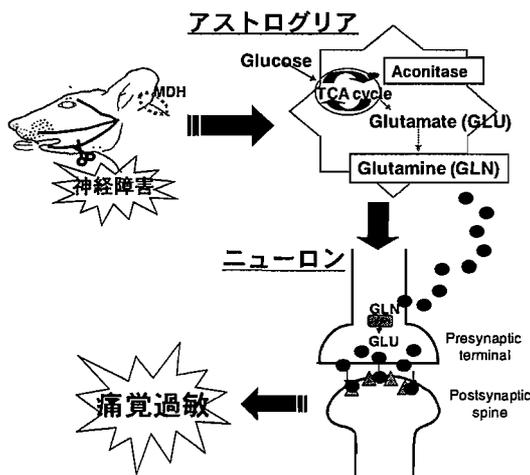
興奮により、三叉神経第二枝領域の関連痛、特に痛覚過敏が発症する可能性が示された(図3)。

本研究は、三叉神経系由来の神経因性疼痛発症と関連痛における中枢神経機構の新たな解明となり得る重要な発見であることが示唆された。また、顔面領域だけでなく、関連痛の発症にアストログリアの広がりと活性が関与している可能性は世界で初めての報告となった。

そして、本研究は神経因性疼痛発症の新たな基礎的知見を提供するものであり、グリア細胞の活性化誘導分子を標的にした薬剤を検索することにより、三叉神経系に発症する関連痛、神経因性疼痛の有効な治療薬の開発につながる可能性があると考えられる。

また、今までに国内外の研究者から、アストログリアとGABAニューロンとの関係性を問うものが多かった。これまでに、グルタミン-グルタメイトシャトル機構の障害により、神経細胞のGABAシナプス伝達が抑制されることがわかっている。よって、アストログリアとGABAニューロンとの関係性を調べることを、次の研究課題とした。現在、GABAトランスポーターを黄色発光蛋白により標識させた遺伝子組み換えラットを用いて、免疫染色によりアストログリアとGABAニューロンとの関連性を調べているところである。さらに、パッチクランプ法を用いて、詳細に調べていく予定である。

図3 <本実験のまとめ>



#### 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6件)

①Okada-Ogawa A, Imamura Y (他7名, 4番目)

(2010) A possible case of complex regional pain syndrome in the orofacial region. Pain Med. 11, 274-280. 査読有

②岡田明子 (2010) 口腔領域におけるペインコントロールの臨床-1. 口腔顔面痛の分類と概説. 歯科医療 冬号. 査読無

③Okada-Ogawa A, Suzuki I, Imamura Y (他10名, 1番目) (2009) Astroglia in Medullary Dorsal Horn (Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis) Are Involved in Trigeminal Neuropathic Pain Mechanisms. J Neurosci. 29, 11161-11171. 査読有

④Okada-Ogawa A, Porreca F, Meng ID. (2009) Sustained morphine-induced sensitization and loss of diffuse noxious inhibitory controls in dura-sensitive medullary dorsal horn neurons. J Neurosci. 29, 15828-15835. 査読有

⑤Ogawa A, Meng ID (2009) Differential effects of the cannabinoid receptor agonist, WIN 55, 212-2, on lamina I and lamina V spinal trigeminal nucleus caudalis neurons. Pain 14, 269-275. 査読有

[学会発表] (計3件)

①小川明子, 鈴木郁子, 今村佳樹, 岩田幸一: ラット下歯槽神経切断による神経因性疼痛に対するアストログリアの関与. 第85回日本生理学会大会(東京) 2008.

[図書] (計3件)

①今村佳樹, 小川明子他 スタンダード全身管理・歯科麻酔-1 4章ペインクリニック(疼痛治療) (2008) 241-253

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡田 明子 (OKADA AKIKO)

日本大学・歯学部・専任講師

研究者番号: 10434078