

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791562

研究課題名（和文）三叉神経損傷動物を用いた三叉神経痛の発症機構の解明

研究課題名（英文）The elucidation of the onset organization of the trigeminal neuralgia using a trigeminal nerve damage animal.

研究代表者阿部 徹也 (ABE TETSUYA)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：60412053

研究成果の概要（和文）：口腔・顔面領域は皮膚領域と、粘膜領域とが入り組み、ラットへのホルマリンの注入刺激は顔面皮膚領域の方が口腔内の粘膜領域より多くの疼痛関連行動を起こす。その行動は脳内抑制性伝達物質である GABA 受容体を通して制御され、その制御効果も顔面の疼痛に対する方が大きい。口腔粘膜領域は C 線維が顔面皮膚領域より少なく、そのことが中枢の制御機構にも差を生じさせている。

ペプチド性の C 線維に含まれるサブスタンス P (SP) の受容体であるニューロキニン 1 (NK-1) は三叉神経尾側亜核 (Vc) の I 層と III 層に分布し、侵害受容に関わっている。私たちは細胞質内に入って毒性を発揮するライボソーム非活性化毒素であるサポリンを SP に結合させた SP-サポリン (SP-Sap) を延髄の後角 (Vc; 三叉神経尾側亜核) に作用させ、I 層や III 層に存在する SP の受容体であるニューロキニン 1 受容体 (NK1) を持つニューロンを削除することに成功した。SP-Sap を小脳-延髄槽 (大槽) に投与して 2-4 週間後のラットでは、Vc の I 層と III 層の NK-1 受容体免疫陽性ニューロンの数が減少した。SP-Sap 処置ラットではホルマリン誘導侵害受容反応 Vc がコントロールラットに比べ減少した。コントロールラットではホルマリン注射の前にピククリンを全身投与すると侵害受容反応は減少するが、SP-Sap 処置ラットでは逆に増加した。すなわち NK-1 を持つニューロンが侵害刺激の受容だけでなく、上位脳の GABA<sub>A</sub> 受容体を介した制御系に関与することを示した。

研究成果の概要（英文）：The orofacial region has skin and mucous region and the formalin injection into the two different region induces different nocifensive behavior. The subcutaneous injection of diluted formalin into the rat upper lip induced more nocifensive behaviour than into the tongue. The behavior was inhibited more by the preadministration of an antagonist of GABA<sub>A</sub> receptor, bicuculline, when formalin was injected into the lip than into the tongue. The resultant differences of nocifensive behaviour and pharmacology could be caused by the differences in the quantitative and qualitative distribution of C-fiber population. The tongue has fewer primary afferent neurons (trigeminal nerve) in the range of C-fiber than the lip skin.

Considerable number of neurons-bearing receptors of substance P (SP), neurokinin-1 (NK-1) are distributed in lamina I and less in lamina III of trigeminal subnucleus caudalis (Vc). We have eliminated these NK-1-bearing neurons by preadministration of SP conjugated with a ribosome-inactivating toxin, saporin (SP-Sap) into the rat cisterna magna. In these SP-Sap-pretreated rats, the formalin-induced nocifensive behaviour was reduced and the preadministration of bicuculline enhanced the nocifensive behaviour, when bicuculline reduced it in the naïve rats. These results show that NK-1-bearing neurons are involved in pro-nociceptive transducer through ascending and descending nociceptive facilitating loop, where GABA acts as prnociceptive.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2008年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 年度     |           |         |           |
| 総計     | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

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：三叉神経、機械刺激受容ニューロン、サイトカイン、サブスタンス P、GABAA

c-Fos

1. 研究開始当初の背景

口腔・顔面領域は身体の中でも場所ゆえに外傷が多く、特に口腔も日々の食物摂取や、異物の刺激を受け、外傷ならびに細菌感染などによる炎症が多発し、痛みを経験する人は高率に上っている。私たちは口腔・顔面領域を支配する三叉神経が、脊髄神経と形態学的に異なり、その中枢へ投射する様式も口腔支配神経と顔面支配神経とで異なっていることを明らかにしてきた (Abe et al., 2006)。つまり顔面皮膚領域を支配する感覚神経は侵害受容ニューロンや、微妙な触刺激 (センシュアルタッチ) に反応すると考えられる小型ニューロンの割合が多く、逆に口腔領域を支配する感覚神経は機械刺激受容ニューロンと考えられる大型ニューロンの割合が多い。身体の外表面を被う皮膚では侵害刺激やセンシュアルタッチに対して敏感となるように、摂食の入り口である口腔では、含んだものの性状 (温度、体積、粘膜ざわり) にたいする感覚を判断して嚥下すべきか吐き出すべきかを決定できるように構成されているようである。最近の脊髄系での研究では、末梢神経の損傷によりニューロンの生理学的特長が変化することが明らか

にされてきたが、口腔と顔面を支配する三叉神経神経損傷によるニューロンの表現型の変化については詳細が明らかでない。末梢神経を損傷すると、しばしば時間をおいて痛覚過敏が起こることが知られている (神経因性疼痛)。その発症のメカニズムが明らかでないために神経因性疼痛は難治性で、多くの鎮痛剤に対して抵抗を示す。神経損傷後に各種生理活性物質、サイトカイン、受容体、イオンチャンネルなどの末梢神経および中枢神経や神経膠細胞で表現型が変化することも知られている。しかしどういった細胞の何がどのように変化するのが明らかとなっても、その変化が生体の疼痛感覚にどのようにかかわっているのかは不明である。私たちは侵害刺激に相当する三叉神経節 (TG) の電気刺激後に三叉神経感覚核内では c-Fos 発現はもっぱら侵害受容神経 (C-線維、A $\delta$ -線維) の投射領域である延髄後角 (Vc) の浅層部 (VcI/II) 全体に認められることを明らかにしてきた (下図左参照; Abe et al., 2006)。末梢神経切断後に TG を刺激すると VcI/II では切断神経の中枢投射領域での発現が減少し、本来の非侵害刺激受容神経 (A- $\beta$  線維) の投射領域

である、主感覚核 (Vp)、吻側核 (Vo)、中位核 (Vi) および Vc の大細胞部 (VcIII/IV) での発現が増加する (下図右参照)。逆に切断されていない侵害受容神経の投射領域 (VcI/II) での発現が増加することを発見した。多くの神経因性疼痛モデルでは、侵害受容ニューロンの興奮性が低下することが最も大きな原因とされる。神経因性疼痛モデルでのこういったニューロンの表現型が変化し、その変化がこういった感覚の異常につながるかの詳細が明らかでない。経験的に抗うつ薬が神経因性疼痛に効く場合があると報告されているが、効かないという報告もある。近年選択的セロトニン再取り込み阻害剤 (SSRI) や選択的ノルアドレナリン再取り込み阻害剤 (SNRI) を投与してうつ状態が改善されるが、長期間 (1 ヶ月) 連続投与して効き始めることと海馬でのニューロンの増殖が 1 ヶ月して認められることの関連性がとりざたされているが、鎮痛作用との関連性は明らかではない。こういった疑問を解決するためには神経損傷に伴う侵害受容動態と同時に多くの脳での形態学および生理学的変化を明らかにしてゆく必要がある。脊髄系では侵害受容動態を測定するには侵害熱刺激に対する逃避反応の潜時を計る方法 (プランターテスト)、太さが異なるワイヤーの断端をしなるまで身体に押し付けることにより単位面積あたりの加重を変化させて加え逃避反応を示す加重を測定する方法 (フォンフライテスト) などがある。しかし口腔・顔面領域は構造が複雑で、非麻酔下の動物の一定領域に刺激を加えるのが困難である。ホルマリンテストは希釈ホルマリンを皮下または粘膜下に注射した後の疼痛関連行動 (顔面では手や足で注射部位をこする運動、口腔では空口咀嚼運動) の単位時間あたりの度数を計測する方法である。

私たちはこの方法が口腔・顔面領域でも侵害受容動態を定量する方法として適し、口腔領域へのホルマリン注射後の疼痛関連行動が顔面領域へのホルマリン注射に比べ少ないことを明らかにしている (Takemura et al., 2006)。こういった口腔・顔面領域特有の性質が神経損傷時には逆転する可能性があり、臨床的に重篤な症状を呈する三叉神経痛の発症機構の基盤を明らかにする本研究課題を申請するに至った。

## 2. 研究の目的

神経損傷後に、異常な疼痛 (神経因性疼痛) が起こることが知られているが、こういった神経の何が変化するのかといった詳細な研究は始まったばかりである。神経の切断により、末梢組織で産生され、中枢方向へ軸索輸送されはずの、NGF、GDNF といった神経成長因子がニューロンの興奮性に関わるナトリウムチャンネル、カリウムチャンネル、ATP 受容体等の表現型を変化させる主要な原因と考えられている、ニューロンの種類によって変化する方向と大きさが異なる。損傷を受けた神経だけでなく、周辺の無傷の神経の表現系が変化し、異常な痛覚過敏を引き起こす可能性を形態学的に示すことは重要である。神経損傷後に神経の興奮性が変化するが、その表現型を維持するのは末梢で作られ軸索輸送される NGF、GDNF とされる。今まで治療法が確立していなかった神経因性疼痛にたいしてこういった成長因子が効果を表す可能性をさぐる。最近 GDNF ファミリーの一つであるアルテミンが全身投与により神経因性疼痛の症状を改善すると報告されている。脊髄系では坐骨神経の損傷により脊髄後角の表層ニューロンのアルテミン受容体である GFR $\alpha$ 3 の活性が上昇し、その発現がカプサイチン受容

体である TRPV1 の発現と共存することが明らかとなっている。本研究では神経因性疼痛の動物実験モデルを使用しその動物の侵害受容動態を調べると同時に場所により変化する表現型の詳細を明らかにして、三叉神経系での詳細なデータを集積することにより、口腔・顔面領域といった場所特異的な神経因性疼痛の治療の可能性を示すことを目的とする。

### 3. 研究の方法

動物の外科手術、神経損傷ラットの作製、特定の脳の領域に神経毒であるサポリンとセロトニントランスポーターの抗体を接合させた antiSERT-Saporin (Advanced Targeting Systems) を注入し、セロトニン作動性ニューロンを削除した脳改変動物を作製する。侵害受容行動の評価や脳の生理学的特性の変化を捉える研究を行う。脳の免疫組織化学法による染色や脳や末梢組織での生理活性物質の定量も行う。

神経損傷ラットの三叉神経節 (TG) を電気刺激した後に認められる異常な c-Fos 発現のメカニズムをさぐるにより、神経因性疼痛のメカニズムに迫れると考えられる。三叉神経主感覚核 (Vp) , 吻側亜核 (Vo) , 中位亜核 (Vi) 及び尾側亜核 (Vc) の大細胞部 (VcIII/IV) に新たに認められ、浅層部 (VcI/II) で減少する異常な c-Fos 発現は神経因性疼痛の指標となり、実験動物モデルになりうる。戦略として、侵害受容動態 (ビヘイビア) の研究、侵害受容ニューロンの細胞レベルでの研究、および侵害受容プロセッシング特定ニューロンの破壊動物作製の 3 種類の研究結果を有機的に結びつけ総合的な脳の理解につなげる

### 4. 研究成果

口腔・顔面領域は皮膚領域と、粘膜領域とが入り組み、多くの疼痛関連行動を起こす。その行動は脳内抑

制性伝達物質である GABA 受容体を通して制御され、その制御効果も顔面の疼痛に対する方が大きい。口腔領域は C 線維が顔面皮膚より少なく、そのことが中枢の制御機構にも差を生じさせている。ライボソーム非活性化毒素であるサポリンを SP (サブスタンス P) に結合させた SP-サポリンを小脳-延髄槽(大槽)に投与したラットでは、Vc の I 層と III 層の NK-1 (ニューロキニン 1) 受容体免疫陽性ニューロンの数が減少した。三叉神経節を電気刺激した後の Vc での c-Fos 発現がコントロールラットに比べ減少した。コントロールラットでは電気刺激前にピククリンを全身投与すると Vc での c-Fos 発現は減少するが、SP-サポリン処置ラットでは逆に増加した。すなわち NK-1 を持つニューロンが侵害刺激の受容だけでなく、上位脳の GABAA を介した制御系に関与することを示した。臨床において歯科口腔外科では抜髄処置や抜歯を行うことが多く、微小環境での神経切断が必然的に行き、異常な疼痛が起りやすい(神経因性疼痛)。この異常な疼痛の主因は、神経損傷後に、損傷されたニューロンだけでなく、近傍の無傷のニューロンが異常な活動をすると考えられている。三叉神経を切断すると支配領域からの入力遮断されるが、ニューロンの表現型を変化させ、異所性の発火を起こす。ラットの三叉神経切断後に三叉神経節を電気刺激し、脳内の c-Fos 活動を調べると、切断神経からの侵害受容ニューロンの活動は低下し、機械刺激受容ニューロンの活動は増加した。逆に非切断神経からの侵害受容ニューロンの活動が増加することがわかった。

### 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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. S.Sugiyo, D.Uehashi, F.Satoh, T.Abe, N.Yonehara, M.Kobayashi, Motohide Takemura. Effect of systemic bicuculine or morphine on formarin-evoked pain-related behaviour and c-Fos expression in trigeminal nuclei after formalin injection into the lip or tongue in rats. Exp Brain Res, 2009 査読あり;196:229-237.

〔学会発表〕(計2件)

1. 阿部徹也, 本田公亮, 山村倫世, 藤原正識, 浦出雅裕, 奥井森. 三叉神経慢性切断ラットの三叉神経節電気刺激が誘導する三叉神経感覚核のc-Fos発現. (第22回日本顎関節学会総会・学術大会) 2009.7 東京

2. Abe T, Takemura M, Sugiyo S, Ohyamaguchi A, Masawaki A, Hasegawa M, Honda K & Urade M. (2008) Neurokinin-1-receptor bearing neurons in the trigeminal caudal nucleus are crucial for intensity-dependent bidirectional sensory processing through GABAA receptors. 6th FENS Forum 2008. 7 ジュネーブ

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

阿部 徹也 (ABE TETSUYA)  
兵庫医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 60412053