

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23390461

研究課題名(和文) 三叉神経障害性疼痛発生機序の網羅的解析

研究課題名(英文) Analysis of pain induced mechanism after trigeminal nerve injury

研究代表者

瀬尾 憲司 (SEO, KENJI)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40242440

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：損傷した末梢神経の治癒は損傷局所の様々な因子により影響される。その一つの機序として神経損傷は線維芽細胞を刺激して神経栄養因子BDNFを放出し、切断後24時間で最高量となりその後減少することが確かめられた。このBDNFを不活化すると神経突起はその伸長が抑制され軸索の再結合が抑制された。末梢感覚は触覚において回復が抑制されることが認められ、神経切断による痛覚過敏も抑制された。神経切断局所には神経再生の阻害因子であるセマフォリン3Aの存在が認められた。以上の結果は末梢神経の再生は切断局所におけるBDNFやセマフォリン3Aなどが、それぞれ回復促進または再生阻害などに影響していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：When peripheral nerve is injured, the some local factors can be produced and affect the regeneration. Brain derived neurotrophic factor BDNF was released from fibroblasts in the vicinity of the injury site, and its quantity increased within 24 hours after the incidence of injury and decreased after that, resulting in the disappearance. When this BDNF was inactivated at the local site immediately after the injury, elongation of neurites and reconnection of the injured axons were inhibited. This inactivation also inhibited regeneration of mechanical touch sensation, and allodynia, which appeared after the nerve injury, was inhibited. As another factor, the existence of nerve growth inhibitory protein semaphoring-3A was observed after the nerve injury. These results suggested that local facilitator and inhibitory factors are induced at the local site of nerve injury, and these can affect the regeneration, resulting in the prognosis.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：trigeminal nerve nerve injury regeneration BDNF Semaphrin-3A

### 1. 研究開始当初の背景

下顎埋伏智歯の難抜歯や嚢胞摘出術などの口腔外科手術に限らず多くの歯科治療においても下歯槽神経損傷は稀なことではない。しかし実際には術中に神経損傷を認めても発症することを心配しながら経過観察しているだけである。そこで当分野では三叉神経損傷を Neurography という MRI による特殊な撮影方法に外科的手術所見と病理組織所見を加えてその病態の詳細な解析を行ってきた。さらに神経損傷後に慢性痛が発生した場合には PGA-collagen tube による人工神経を使って神経腫を切除し、再建する外科的手法による治療を行ってきた。これらの症例から経験されることは、神経障害性疼痛などのニューロパシックペインに対する治療とは、麻薬性鎮痛薬などにより発生した痛みに対してのシナプス伝達抑制や神経の興奮抑制による対症療法が主であり、ニューロパシックペインの発症自体に対する予防策ではなかった。そこで本研究の発展には、末梢神経損傷後の回復過程における疼痛発生を系統的に解明する必要がある。

そのためには(1)損傷部の神経内における癒痕形成の抑制、(2)神経再生阻止因子の抑制、(3)損傷部位におけるシュワン細胞活性化の抑制、(4)中枢の異常痛発生機序への関与、などを考慮する必要がある。

すなわち、末梢の三叉神経を損傷後に続発する神経障害性疼痛の発生予防には、これらの各要因への対応を系統的に行う治療戦略が必要である。

### 2. 研究の目的

末梢神経損傷後の様々な因子による神経再生に対する影響を検討するに当たり、以下の研究目標を立てた。

- (1) 損傷した三叉神経の再生モデルの確立：ラットまたはマウスを用いて三叉神経の切断後の標準的回復過程を観察できるモデルを作成する。
- (2) 形態学的末梢神経再生の検討：先に使用したモデルを用いて様々な因子による影響を検討する。
- (3) 末梢神経損傷と BDNF の関係：損傷部における BDNF の誘導を確認する。
- (4) 再生神経の機能的回復の検討：神経再生した後に、もしくは何らかの影響が加わった時に異常経過を検討できる機能的回復を検討する。
- (5) 末梢神経回復過程における BDNF の役割：局所 BDNF の効果を変化させることにより、BDNF の末梢神経再生への役割を検討する。
- (6) 神経切断による線維化に対する外傷性神経腫の形成に及ぼす影響を検討する。
- (7) 神経損傷による Semaphorine-3A の確認：末梢神経損傷により誘導される病態を観察する。

以上を目標とし、末梢神経損傷後の回復過程のうち、おもに BDNF と Semaphorine-3A の役割について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) 損傷した三叉神経の再生モデルの確立：

ラットまたはマウスをセボフルラン吸入により麻酔を導入し、抱水クロラルを腹腔内に注射して麻酔状態を維持する。頬部皮膚を切開した後、下顎骨皮質骨を切除して下歯槽神経を完全に切断する。切断部位に生理食塩水または抗 BDNF 抗体 1  $\mu$ l を投与した後に骨蠟で覆い閉創する。麻酔覚醒後 2-3 週間生存させて、1 週間後、2 週間後、3 週間後に深麻酔下で心腔内より還流・固定を行う。免疫染色またはアザン染色により形態学的に神経再生を確認する。

#### (2) 形態学的末梢神経再生の検討：

先の方法で得られた標本を基に形態学的に分析する。神経再生と結合組織の分布の観察のためにはアザン染色を、神経組織の同定のためには PGP9.5 の免疫染色を用いた。

さらに神経再生組織における TrkB を、抗 TrkB 受容体抗体を用いて免疫組織学的に同定し、それらの分布状態と経時的変化について検討する。

軸索の再生の検討としては切断後 13 日目でオトガイ部の皮下に 4% Fluorogold (FG) 10  $\mu$ l を注射し、24 時間後に動物を深麻酔下で還流固定を行った。その後三叉神経節における FG の発現を調べ、三叉神経節におけるニューロンとの比率を計算した。本実験はコントロールとして生理食塩水投与群とし、薬剤投与群との比較を行った。

#### (3) 末梢神経損傷による BDNF 誘導の検討：

切断局所に BDNF が遊走されているか否かを検討するために、in situ Hybridization を行った。RNAscope2.0 FFPE Assay ACD を用いて BDNF mRNA の分布と TrkB mRNA の分布を調べ、これらについて神経切断後に生理食塩水または 1  $\mu$ l の抗 BDNF 抗体を投与した群との間でそれらの発現を比較検討した。

神経切断による三叉神経節と切断部位における BDNF の発現を Real-time PCR で検討した。神経節のサンプルは切断側と、非切断側との両側で採取し、また切断部局所では神経とその周囲結合組織を含めて採取した。神経切断直後、6 時間後、24 時間後、2 週間後で測定し比較した。

#### (4) 再生神経の機能的回復の検討：

下歯槽神経の支配領域であるオトガイ部皮膚における触覚刺激による逃避反応閾値を術後 3 週間において経時的に測定した。測定あたり、各動物は 1 週間

の測定に対する練習を受けて慣れさせておいてから切断手術を行った。実験群としては切断直後に切断部への投与と薬剤により分けた。生理食塩水注射群と BDNF 投与群に加え、切断時に下歯槽神経を結紮してから切断しそのまま放置した群を設けて、以上の 3 群間で触覚閾値の変化を切断後 2 週間観察した。電気生理学的には切断後 3 週間目に開口反射を測定した。切断側または非切断側のオトガイ部に刺激電極を挿入し、顎二腹筋前腹に記録電極を挿入して筋収縮反応を観察した。amplitude と Latency を測定し、生理食塩水注射群と 1 μg BDNF 投与群間で比較した。

(5) 末梢神経回復過程における BDNF の役割：

切断部局所に投与する BDNF の投与量を 0 μg (生理食塩水)、1 μg と結紮後に切断した群の間で、触覚閾値の変化を比較することにより検討した。

(6) 神経切断以後の線維化の抑制による外傷性神経腫への影響

線維化の抑制効果がある「大建中湯エキス」600mg/kg/day を神経切断後 3 週間内服させて、アザン染色にて組織学的に比較した。

(7) 神経損傷による Semaphrine-3A の確認：ラットの下歯槽神経を切断した後、1 日目、7 日目、14 日目で免疫組織化学的に Semaphrine-3A の存在とその分布様式を検討した。シュワン細胞との関係を検討するためには S-100 抗体を用いで、染色された semaphrine-3A との分布を検討した。

さらに RT-PCR 法を用いて切断後の三叉神経節における Semaphrine-3A の発現を検討した。

4. 研究成果

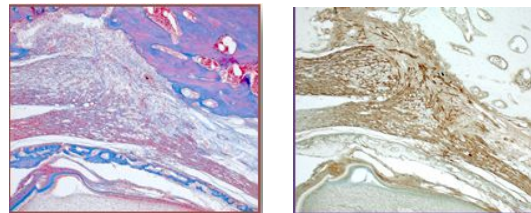
(1) 損傷した三叉神経再生モデル

神経切断後に 2 週間で軸索の走行が不整で神経幹が膨大化する形態学的変化に加え、カラーゲンが多く含まれている形態学的変化から神経腫が形成されたと考えられた。これはまた切断後 3 週間でも大きさの変化は認められなかったことから、以降の研究は切断後 2 週間から 3 週間で実施することとした。

(2) 神経腫形成に対する抗 BDNF 抗体の影響  
左列がアザン染色、右列が PGP9.5

生理食塩水投与では軸索の走行が乱れており、神経腫の形成が認められる

なお抗 BDNF 抗体投与では神経腫の形成が認められなくなっていた。

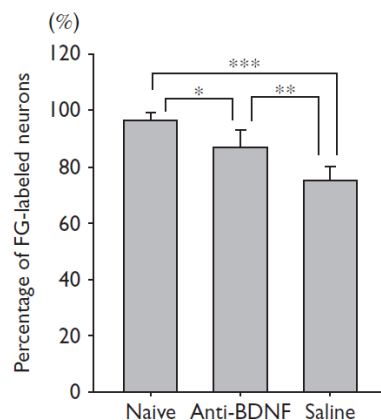


以上の点から、下歯槽神経は完全切断後に顎骨内で再生する過程において神経腫を形成するものと考えられる。また、この形成は実験動物では 2 週間ではほぼ完成する。一方、切断直後に 1 μg の抗 BDNF 抗体を投与しておく、この神経腫の形成は抑制され、認められなくなっていることが分かった。

(3) 再生神経の連続性についての検討  
形態学的な連続性の検討 (FG の軸索輸送による検討)

三叉神経節における FG 陽性細胞の全神経細胞に対する割合

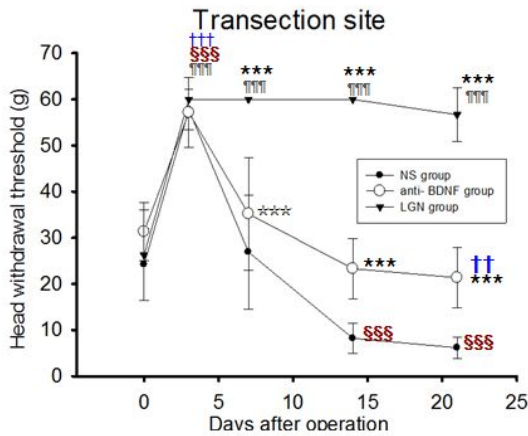
抗 BDNF 抗体により、損傷した軸索の再生が促進されることが認められた。



\* P=0.01, \*\* P=0.003, \*\*\* P<0.001  
The Holm-Sidak Method による有意差検定したがって、抗 BDNF 抗体の投与は切断神経の軸索再生を促進することが認められた。

再生神経の機能的回復についての検討

・切断後の触覚閾値に変化について  
切断側の触覚による逃避閾値の変化  
NS：切断部へ生理食塩水を投与した群  
Anti-BDNF：1 μg の抗 BDNF 抗体を投与した群  
LGN：結紮してから切断を行った群



\*\*\* 同一測定日における生理食塩水投与群 NS と有意差  $P < 0.001$   
 ††† 切断直前との比較による有意差  $P < 0.05$   
 †††† 同、有意差  $P < 0.001$   
 §§§ 切断直前との有意差  $P < 0.001$   
 ¶¶¶ 切断直前との有意差  $P < 0.001$   
 Two way-ANOVA による解析

神経切断側の変化として、結紮してから切断した群では触覚閾値の回復はなかった。生理食塩水を切断直後に切断部へ投与した群では、一過性の触覚閾値の上昇を認めたがその急激に低下し、最終的には切断前よりも低いレベルになった。一方、 $1 \mu\text{g}$  の BDNF 投与により、触覚閾値は一過性の上昇の後低下し、切断前と同じ程度に落ち着いていた。一方、切断を行わなかった反対側の下歯槽神経では切断後3週間の触覚閾値には有意な変化は認めなかった。

・開口反射による反応  
 誘発可能閾値と反応潜時の比較

	刺激閾値 ( $\mu\text{A}$ )	反応潜時 (msec)
NS 群	$371.7 \pm 154.8$	$6.26 \pm 0.773$
抗 BDNF 抗体群	$375.0 \pm 330.2$	$6.66 \pm 0.993$

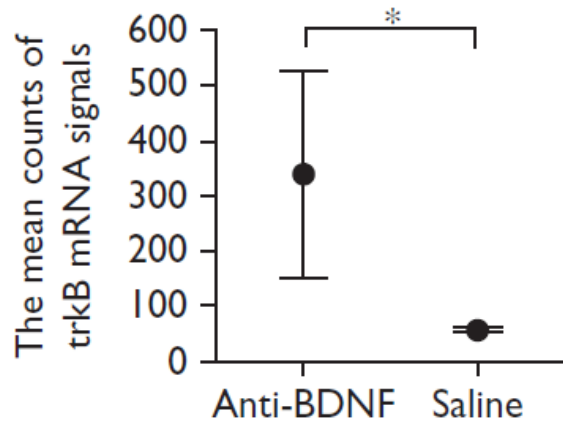
両群とも刺激閾値または反応潜時において有意差は認められなかった。

以上の結果より、BDNF には神経再生を促進する効果があり、特に有髄線維は機能的にも回復すると考えられる。

(4) 神経切断局所における BDNF と trkB の存在の検討

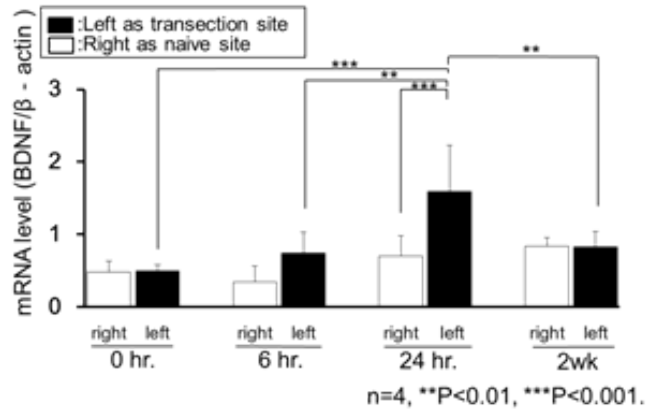
In situ hybridization (ISH) による検討

IAN 切断後の trkB の mRNA の発現に対する抗 BDNF 抗体投与による影響について比較した。



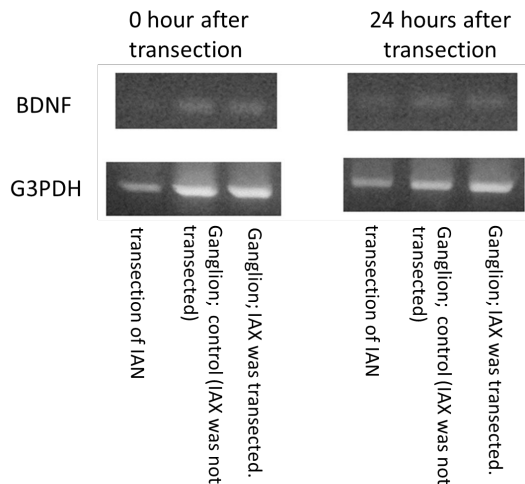
抗 BDNF 抗体投与により、trkB の mRNA 発現は有意に増加した (student's t-test,  $P < 0.05$ )。

神経切断側の三叉神経節における BDNF の mRNA 発現の経時的変化



Real-time PCR にて切断より6時間後、24時間後、2週間後で測定した。左側が切断部切断側で有意に BDNF の mRNA 発現が増加していた ( $P < 0.01$ , two-way ANOVA followed by Tukey test)。

神経切断局所における BDNF の発現



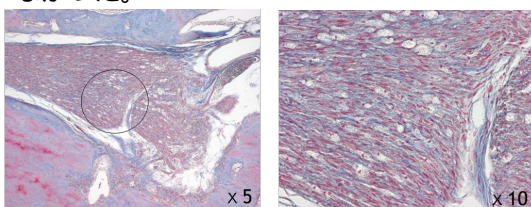
Reverse Transcription-PCRによる比較により神経切断局所において BDNF が増加したことが明らかになった。またその反応は切断後早期に生じることが認められた。

以上の結果より、神経切断は切断部局所の線維芽細胞を活性化し BDNF を産生させ、それに対して、外部から投与した抗 BDNF 抗体が作用したと考えられた。

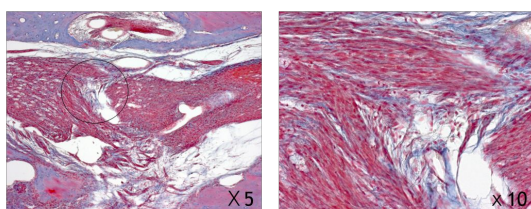
#### (5) 線維化抑制による神経腫形成への影響

大建中湯投与群は対照群（生理食塩水投与群）に比べて、神経再生が認められる膨大部において、含まれるコラーゲン線維（アザン染色により青に染まる部分）が少ないことが観察された。また切断端からの sprouting には、両群間において明らかな違いは観察されなかった。

Saline  
(対照)



大建中湯



#### (6) セマフォリン 3A について

主に損傷した中枢神経で認められている神経軸索の忌避因子であるセマフォリン 3A が、神経損傷部位にあるか否かについて検討した。ラットの下歯槽神経切断後 1 日目では神経切断部に強い発現が認められた。その後発現は少なくなり、7 日目では神経の再生は進んでいたがセマフォリンの発現は認められなくなった。1 日目においてシュワン細胞との関連性を検討するために S-100 抗体と蛍光二重染色を行ったところ重なりは認められず、セマフォリンとシュワン細胞との関連性は少ないと考えられた。

以上により末梢神経は損傷を受けることによって、その損傷部周囲の線維芽細胞を刺激し、損傷部局所に BDNF を再生する。その量が多いと再生した神経は BDNF の神経伸長の促進効果により sprouting が増加して、結果的に神経腫を形成する。また感覚においても触覚閾値の低下を誘発し、結果的にこれが allodynia などの発生に関連するものと考えられる。一方、誘導される BDNF 量が抑制されると、sprouting も抑制されることにより神経腫の形成も抑制され、感覚閾値も正常化

することが出来る。したがって、末梢神経損傷において、神経腫が形成されるか否か、または感覚閾値が正常に復するか過敏状態になるか、さらには感覚鈍化として後遺するかはこの生体内に誘導された BDNF 量に関連して生ずる可能性があることを示唆している。末梢神経損傷の予後に強く影響するのは線維化によるのではなく、炎症などの発生により線維芽細胞が活性化して BDNF を再生に関与するか否かによると考えられる。また中枢神経で発生するセマフォリン 3A などの物質の産生なども末梢神経再生に影響を及ぼしているものと考えられた。

一方、神経節で誘導される BDNF が損傷後どのような作用を有するかについてはこれまでの研究では言及できないが、一次求心性繊維の三叉神経脊髄路核内などの中枢端側における TERMINAL において、CENTRAL SENSITIZATION に関わる可能性が考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1) Valverde Guevara YM, Yoshikawa H, Saito I, Maeda T, Seo K; Effect of local application of an antibody against brain-derived neurotrophic factor on neuroma formation after transection of the inferior alveolar nerve in the rat. *NeuroReport*. 2014;25(13):1069-74. (査読有)
- 2) 瀬尾憲司; 三叉神経損傷の臨床、新潟歯学会雑誌、44(2) : 69-81, 2014 (査読なし)

〔学会発表〕(計 8 件)

- 1) H. YOSHIKAWA, Y. M. VALVERDE, T. MAEDA, M. KUROSE, K. YAMAMURA, K. SEO; Functional analysis of the regenerated inferior alveolar nerve after local administration of anti-BDNF antibody to the transected site. Nov.15-19, 2014, Washington DC, USA
- 2) Kenji Seo; CONTRIBUTION OF BDNF TO NERVE REGENERATION AND NEUROMA FORMATION AFTER NERVE INJURY, The 8th Congress of the European Federation of IASP® Chapters (EFIC®). Oct9-12, 2013 Florence, Italy
- 3) 吉川博之、Yessenia Maria Valverde、瀬尾憲司：末梢神経損傷後の神経腫形成に及ぼす大建中湯の効果、日本東洋医学会関東甲信越支部新潟県部会総会、平成 25 年 9 月 29 日、新潟市ユニゾンプラザ、新潟市
- 4) 吉川博之、YMV Guevara、前田健康、黒瀬

雅之、山村健介、瀬尾憲司; 末梢神経切断後の局所抗 BDNF 抗体投与の軸索再生への影響, 第 35 回日本疼痛学会. 7 月 12-13 日. 2013 年. ソニックシティ大宮、さいたま市

- 5) H Yoshikawa, YV Guevara, J Kitagawa, K Yamamura, I Maeda, K Seo; POSSIBLE INVOLVEMENT OF BDNF IN NEUROMA FORMATION AFTER TRIGEMINAL NERVE INJURY, Fourth International Congress on Neuropathic Pain, May23-26, 2013, Toronto, Canada
- 6) Yessenia Valverde Guevara, Hiroyuki Yoshikawa, Isao Saito, Takeyasu Maeda, Kenji Seo; Possible role of BDNF during nerve regeneration after inferior alveolar nerve injury. 新潟歯学会総会 4 月 20 日, 2013 年、新潟大学歯学部、新潟市
- 7) 吉川博之, Y.M. Valverde, 前田健康, 黒瀬雅之, 山村健介, 瀬尾憲司; 下歯槽神経切断部位への BDNF 抗体投与が知覚の再生に及ぼす影響. 平成 25 年度新潟歯学会第 2 回例会, 2013. 11 月 9 日、新潟大学歯学部、新潟市
- 8) Yessenia Valverde Guevara, Hiroyuki Yoshikawa, Isao Saito, Takeyasu Maeda, Kenji Seo; Effects of antibody to BDNF on nerve regeneration following transection of inferior alveolar nerve. Annual meeting for neuroscience. Oct. 17, 2012, New Orleans, USA

〔図書〕(計 0 件)

該当事項無し

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当事項無し

取得状況(計 0 件)

該当事項無し

〔その他〕

ホームページ

<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anesth/anesth.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬尾 憲司 (SEO, Kenji)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 4 0 2 4 2 4 4 0

### (2) 研究分担者

前田 健康 (MAEDA, Takeyasu)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 4 0 1 8 3 9 4 1

藤原 直士 (FUJIWARA, Naoshi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号: 7 0 1 8 1 4 1 9

照光 真 (TERUMITSU, Makoto)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号: 6 0 4 0 1 7 6 7

弦巻 立 (TSURUMAKI, Tatsuru)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 1 0 3 4 5 5 2 2

田中 裕 (TANAKA, Yutaka)

新潟大学・医歯学総合病院・講師

研究者番号: 5 0 3 2 3 9 7 8

吉川 博之 (YOSHIKAWA, Hiroyuki)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号: 2 0 5 4 7 5 7 5

倉田 行伸 (KURATA, Shigenobu)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 2 0 4 6 4 0 1 8