

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 20 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592764

研究課題名(和文) 口腔・顔面の痛覚異常とニューロン-グリア相互作用に関する研究

研究課題名(英文) A study of abnormal orofacial pain and neuron-glia interactions in the central nervous system

研究代表者

寺山 隆司 (TERAYAMA, RYUJI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60333689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では末梢神経損傷後の痛覚異常に中枢投射部位のニューロンやグリア細胞がどのように関与しているのか検討した。その結果、三叉神経損傷後に脳幹の各部位によってそれぞれ異なる様式のニューロンの興奮性の変化が起こっていることが明らかとなった。また口腔内の痛みに対する行動学的指標を確立するとともに、神経損傷後の痛覚異常に中枢投射部位での収斂投射が関与していることを明らかにした。さらに後肢を支配する神経の損傷による痛覚異常と脊髄における収斂投射との関連を明らかにするとともに、中枢神経系におけるミクログリアの活性化が脊髄での収斂投射および神経障害性疼痛の発症に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, involvement of neurons and glial cells in the central nervous system in abnormal orofacial pain sensations after peripheral nerve injury was investigated. Differential changes in neuronal excitability in the brainstem were observed after trigeminal nerve injury. Established an objective method for assessing intraoral pain, I found that injury to the peripheral nerve exaggerated the behavioral responses and that convergent primary nociceptive input through neighboring intact nerves may contribute to the pathogenesis of neuropathic pain following trigeminal nerve injury. Furthermore, I confirmed the relationship between abnormal pain sensations and the convergence in the spinal cord following injury to the nerve innervating the hindpaw and found that microglial activation following peripheral nerve injury plays an important role in the anomalous convergence of nociceptive signals to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

キーワード：痛覚異常 神経損傷 収斂投射 ミクログリア 三叉神経知覚核群 脊髄

1. 研究開始当初の背景

生理的な疼痛は生体の侵害防御反応として必要であるが、慢性疼痛や神経障害性疼痛などの病的な疼痛は取り除かれるべきである。これらの病的な疼痛は末梢組織の炎症や末梢神経の損傷によって起こることが知られている。中でも口腔・顔面の知覚を支配する三叉神経の末梢枝は顔面頭蓋の複雑な骨構造の間を走行しているため、顎骨および周囲組織の病変によって刺激を受けやすい。また歯科疾患の治療は観血的処置が含まれることが多いため、微少な神経損傷が不可避となる場合が多い。口腔顔面痛はその症状自体の苦痛に加えて、摂食や会話など口腔顔面の機能を障害する機会が多いため、その原因や発症機序を解明し、予防や治療法を確立することは歯学研究の重要な課題の一つである。

慢性疼痛や神経障害性疼痛の発症機序や治療法に関して様々な研究が行われてきた。その中で神経損傷や末梢組織の炎症による末梢神経の持続的な興奮によって、その1次ニューロン自身あるいはその神経が接続する2次ニューロン、さらにはより上位中枢の神経回路で形態的・機能的変化が起こることが証明された。これらは痛覚異常の発症がニューロンの可塑性と関連していることを示すものである。しかしながら慢性疼痛や神経障害性疼痛の発症機序について十分に解明されたとは言えない。特に末梢神経の支配領域を越えて起こる痛覚異常や、通常では痛覚を伴わない触覚刺激によって痛みを感じる異痛症 allodynia といった現象はニューロン間の相互作用のみでは説明できない。一方、最近の研究で中枢および末梢神経系の損傷時にニューロン以外の神経組織の構成要素であるアストログリアやミクログリアが脊髄において活性化することが示されてきた。グリア細胞はニューロンの位置や機能を単に支持するだけの細胞であると以前では考えられてきたが、グリア細胞の活性化がニューロンによる神経伝達を積極的に修飾していることが最近の研究で報告されてきている。

本申請者はこれまで、三叉神経系や脊髄神経系について、末梢神経損傷や末梢組織の炎症が中枢神経系の侵害情報処理機構に与える影響、ならびに脊髄損傷などの中枢神経系の損傷や末梢神経の損傷によって起こるグリア細胞の動態をテーマとして研究活動を行ってきた。最近の研究では脊髄神経損傷後に

脊髄および延髄後索核における MAP kinase がミクログリアで活性化し、この活性化を抑制することにより病的疼痛の発症が抑えられることを明らかにした (Terayama R et al, Neuroscience 153, 1245-1255, 2008)。また、舌神経損傷後に三叉神経知覚核群の各部位で MAP kinase である p38 と extracellular signal regulated kinase (ERK) ならびにミクログリアが神経損傷の初期に、またアストログリアが慢性期に活性化することを明らかにした (Terayama R et al, Neurosci Res 69(2), 100-110, 2011)。今回、神経損傷後のニューロンの興奮性の変化とグリア細胞の活性化ならびにニューロンとグリア細胞間の相互作用に着目し、これらが神経障害性疼痛の発症においてどのように関与しているのかを明らかにし、これまでの研究をさらに発展させる研究を創案したので、本申請を行うに至った。

2. 研究の目的

既に述べたように、末梢神経の損傷後に起こる慢性疼痛や神経障害性疼痛には中枢内ニューロンの可塑性やグリア細胞の活性化が関与していることが明らかにされつつある。しかしながら口腔・顔面の痛覚異常に中枢内ニューロンの可塑性がどのような機序で起こっているのか、またグリア細胞とニューロンとの相互作用について不明な点が多い。そこで本研究では、口腔・顔面の痛覚異常に中枢神経系の各細胞の変化および各細胞間の相互作用がどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とする。具体的には、

- (1) 口腔・顔面の知覚を支配する神経を損傷し、その神経の中核投射領域である三叉神経知覚核群でのニューロンの興奮性の変化を分析する。
- (2) 口腔内の痛みに対する行動学的指標を確立し、それをもとに神経損傷後に口腔内で神経障害性疼痛様の痛覚異常が起こるのか検討する。また神経損傷後の痛覚異常に損傷を受けた神経の中核投射部位における収斂投射が関与しているかを検討する。
- (3) 神経損傷後に起こるグリア細胞の活性化と収斂投射およびニューロンの興奮性の変化、さらには痛覚異常の発症との関連性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) 損傷を受けた神経あるいは損傷を受けた神経に隣接する神経への電気刺激によって誘発される c-Fos タンパクの発現変化について

ラットに全身麻酔を施し、舌神経または下歯槽神経を結紮・切断する。神経損傷後 14 日で再び全身麻酔を施し、損傷した舌神経あるいは損傷を受けていない舌神経を露出し、双極電極を用いて電気刺激（5 Hz、0.5 ms で 10 分間）を行った。電気刺激の強度は 0、0.1、10 mA の 3 種類を設定した。電気刺激後 2 時間でパラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定し、三叉神経知覚核群を含む脳幹部を摘出した。脳幹の試料からマイクロームを用いて凍結切片を作製し、浮遊切片として PAP 法を用いた c-Fos タンパクの免疫組織化学的染色を行った。得られた切片から、三叉神経知覚核群に含まれる c-Fos 陽性ニューロンの数を計測し、各実験条件による c-Fos 誘発状況を比較した。

(2) 口腔内の痛みに対する行動学的指標の確立と、神経損傷後の痛覚異常と中枢投射部位での収斂投射について

半麻酔状態のラットの舌表面に数種類の濃度のカプサイシンを塗布し、痛覚関連行動および三叉神経脊髄路核尾側亜核における c-Fos 陽性ニューロンを分析した。全身麻酔下でラットの下歯槽神経を結紮・切断し、神経損傷後 14 日において上記の行動学的・組織化学的検討を行った。また、神経損傷後の収斂投射の検討では、全身麻酔下のラットの下歯槽神経を結紮・切断し、損傷後 3 日、7 日、14 日で舌へのカプサイシン塗布および切断した下歯槽神経への高閾値電気刺激を行い、カプサイシン塗布後 2 時間、電気刺激後 5 分で灌流固定、尾側亜核を含む脳幹部を摘出し、尾側亜核における c-Fos タンパクの発現（カプサイシンにより誘発）および ERK のリン酸化（電気刺激により誘発）を蛍光 2 重染色により同一切片上で検出することで収斂投射の検討を行った。

(3) 神経損傷後の中枢投射部位におけるグリア細胞の活性化と収斂投射および痛覚異常との関連について

ラットに全身麻酔を施し、脛骨神経を結紮・切断し、損傷後 3 日、7 日、14 日で後肢への侵害熱刺激および切断した脛骨神経への高閾値電気刺激を行い、熱刺激後 2 時間、電気刺激後 5 分で灌流固定、脊髄を摘出し、第 4、5 腰髄における c-Fos タンパクの発現（後肢への熱刺激により誘発）および ERK のリン酸化（電気刺激により誘発）を蛍光 2 重染色により同一切片上で検出することで収

斂投射の検討を行った。また、ミクログリア活性化を抑制することで知られるミノサイクリンを（30 mg/kg）を腹腔内に 8 日間連続投与し、脛骨神経損傷による痛覚異常に対する効果を行動的に評価するとともに、神経損傷後 14 日における収斂投射に対する効果を検討した。

4. 研究成果

(1) 損傷を受けた神経あるいは損傷を受けた神経に隣接する神経への電気刺激によって誘発される c-Fos タンパクの発現変化について

舌神経あるいは下歯槽神経損傷後に舌神経を低閾値あるいは高閾値で電気刺激して三叉神経知覚核群におけるニューロンの興奮性の変化を検討したところ、吻側亜核および尾側亜核でそれぞれ異なる様式の興奮性の変化が起こっていることが明らかとなった。すなわち損傷した神経では低閾値電気刺激に対する過剰な興奮が吻側亜核で認められ、損傷した神経に近接する神経では高閾値電気刺激に対する過剰な興奮が尾側亜核で認められた（図 1）。

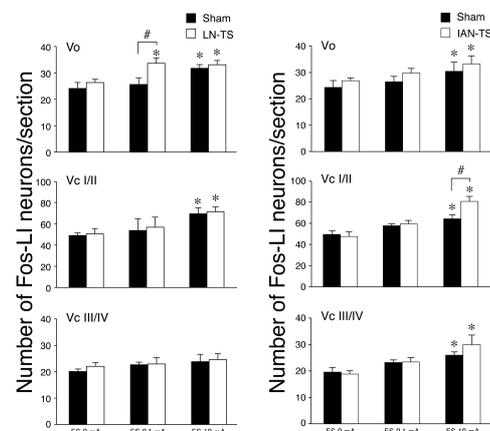


図 1. 舌神経への電気刺激による c-Fos 発現に対する神経損傷の影響

電気刺激を含め、末梢への刺激に対する c-Fos の発現変化に関して、三叉神経系では主に尾側亜核で行われ、三叉神経知覚核群の他の部位については国内外を通じて報告がなく、神経損傷後の変化に関しては本研究が最初の報告となった。本研究では吻側亜核および尾側亜核でそれぞれ異なる様式の興奮性の変化が起こることを示したが、それぞれが神経損傷後の様々な症状に関係していることが示唆された。

(2) 口腔内の痛みに対する行動学的指標の確立と、神経損傷後の痛覚異常と中枢投射部位での収斂投射について

ペントバルビタール 20 mg/kg の腹腔内投与による半麻酔状態のラットの舌に各濃度のカプサイシンを少量塗布し、口腔内外を舐めまわす行動の潜時およびその行動の持続時間を計測することにより痛みの程度を客観的に評価したところ、この痛み関連行動はカプサイシンの濃度が増加するに従って増強し、尾側亜核での c-Fos タンパクの発現変化と相関性があることから、カプサイシン塗布による行動学的評価が口腔内の痛みの程度を評価する有用な指標であることが明らかとなった(図 2)。また下歯槽神経を損傷したラットでは、このカプサイシン塗布による痛み関連行動が増強するとともに、尾側亜核における c-Fos タンパクの発現増加が認められ、下歯槽神経損傷によって舌の痛覚異常が起こっていることが示された(図 3)。

次に、下歯槽神経損傷後の尾側亜核における収斂投射の検討を行った。神経損傷後 7 日および 14 日で舌へのカプサイシン塗布による c-Fos 陽性ニューロンの数が増加するとともに c-Fos およびリン酸化型 ERK の 2 重陽性細胞が増加することが明らかとなった(図 4)。これは、下歯槽神経損傷によって、本来下歯槽神経が接続する 2 次ニューロンに舌神経からの入力が増加すること、すなわち収斂投射が増加することを示している。これらの結果は、末梢神経損傷後におこる痛覚異常に、中枢投射部位における収斂投射が関与していることを示すものである。

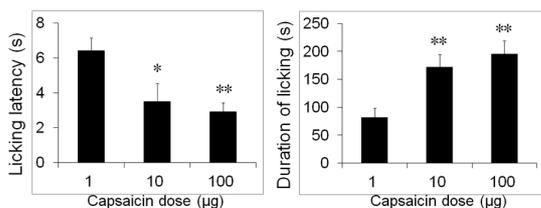


図 2. 舌に塗布するカプサイシン濃度と痛覚関連行動の変化(潜時(左)と持続時間(右))

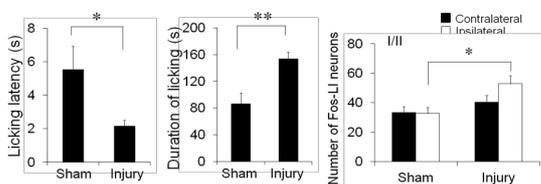


図 3. 舌へのカプサイシン塗布による痛み関連行動および尾側亜核における c-Fos 発現に対する下歯槽神経損傷の影響

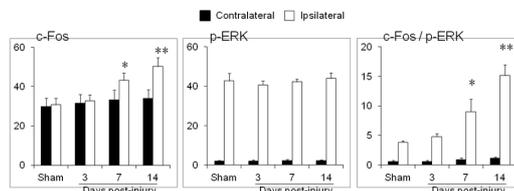


図 4. 下歯槽神経損傷後の各時間経過における舌へのカプサイシン塗布および下歯槽神経への電気刺激による c-Fos 陽性細胞数、リン酸化型 ERK 陽性細胞数および 2 重陽性細胞数の変化

(3) 神経損傷後の中枢投射部位におけるグリア細胞の活性化と収斂投射および痛覚異常との関連について

末梢神経損傷後の痛覚異常に対する中枢投射部位での収斂投射の関与について、脊髄神経系のモデルでも明らかにした。脛骨神経損傷後 14 日で後肢への侵害熱刺激による c-Fos 陽性ニューロンの数が増加するとともに c-Fos およびリン酸化型 ERK の 2 重陽性細胞が増加することが明らかとなり、脛骨神経損傷によって収斂投射が増加することが示された(図 5)。

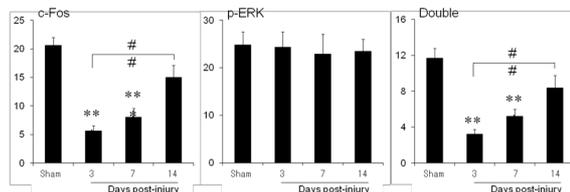


図 5. 脛骨神経損傷後の各時間経過における後肢への侵害熱刺激および脛骨神経への電気刺激による c-Fos 陽性細胞数、リン酸化型 ERK 陽性細胞数および 2 重陽性細胞数の変化

さらに、この脛骨神経損傷モデルにおける痛覚異常について行動学的指標を用いて検討するとともに、ミクログリア活性化の抑制効果のあるミノサイクリンを投与し、痛覚異常の発症および収斂投射に対する効果を検討した。ミノサイクリンを神経損傷後早期に投与することによって、神経障害性疼痛の発症を回避できること、また神経損傷後の脊髄における収斂投射を抑制できることが明らかとなった(図 6, 7)。このことは、末梢神経損傷によって、損傷を受けた神経の中枢投射部位においてミクログリアの活性化が起こり、それが中枢 2 次ニューロンでの収斂投射を引き起こしていることを示している。さらにこのような現象がニューロンの興奮性の変化および痛覚過敏等の痛覚異常の発症に関与していることを示唆している。

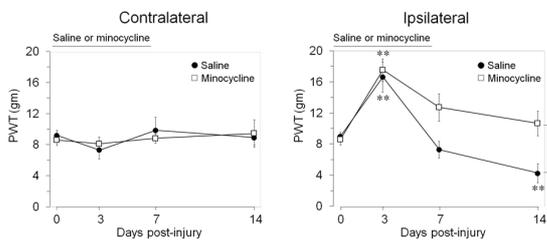


図6. 脛骨神経損傷後の各時間経過における後肢への触刺激に対する逃避行動を示す閾値の変化およびミノサイクリン投与の効果

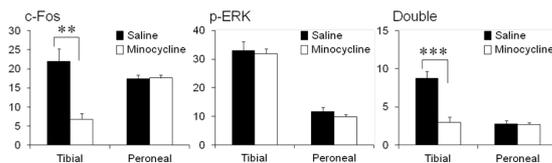


図7. 脛骨神経損傷後14日における後肢への侵害熱刺激および脛骨神経への電気刺激によるc-Fos陽性細胞数、リン酸化型ERK陽性細胞数および2重陽性細胞数の変化とミノサイクリン投与の効果

今回の結果をもとに神経損傷後の痛覚異常のメカニズムの詳細が解明されることが期待される。また、本研究で得られた結果の一部は、日本神経科学大会、日本解剖学会、歯科基礎医学会で発表し、神経科学の専門誌として世界的にも有名な学術雑誌にも数編掲載された。さらに今回の結果を元にした総説の執筆ならびに招待講演（歯科基礎医学会）を行う機会にも恵まれた。

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8件)

1. Yamamoto Y, Terayama R, Kishimoto N, Maruhama K, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T, Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain, *Neurochem Res*, 2015 in press. 査読有
2. Terayama R, Yamamoto Y, Kishimoto N, Maruhama K, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T, Peripheral nerve injury activates convergent nociceptive input to dorsal horn neurons from neighboring intact nerve, *Exp Brain Res*, 233(4), 1201-1212, 2015. 査読有
3. Terayama R, Kishimoto N, Yamamoto Y, Maruhama K, Tsuchiya H, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T, Convergent nociceptive input to spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury, *Neurochem Res*, 40(3), 438-445, 2015. 査読有

4. Terayama R, Tsuchiya H, Omura S, Maruhama K, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T, Possible involvement of convergent nociceptive input to medullary dorsal horn neurons in intraoral hyperalgesia following peripheral nerve injury, *Cell Mol Neurobiol*, 35(3), 417-423, 2015. 査読有
5. Matsuka Y, Iwata K, Terayama R, Imamura Y, Maruhama K, Shinoda M, Tsuboi Y, Kondo M, Honda K, Katagiri A, Sugimoto T, Basic research and clinical investigations of the neural basis of orofacial pain. *J Oral Biosci*, 57(1), 27-36, 2015. 査読有
6. Terayama R, Maruhama K, Tsuchiya H, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T, Assessment of intraoral mucosal pain induced by the application of capsaicin, *Arch Oral Biol*, 59(12), 1334-1341, 2014. 査読有
7. Yamaguchi D, Terayama R, Omura S, Tsuchiya H, Sato T, Ichikawa H, Sugimoto T, Effect of adenosine A1 receptor agonist on the enhanced excitability of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury, *Int J Neurosci*, 124(3), 213-222, 2014. 査読有
8. Fujisawa N, Terayama R, Yamaguchi D, Omura S, Yamashiro T, Sugimoto T, Fos protein-like immunoreactive neurons induced by electrical stimulation in the trigeminal sensory nuclear complex of rats with chronically injured peripheral nerve, *Exp Brain Res*, 219(2), 191-201, 2012. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

1. 寺山隆司、丸濱功太郎、土屋泰規、大村晋司、杉本朋貞、下歯槽神経損傷後の延髄後角における収斂投射、第56回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014年9月25日(木) - 9月27日(土)、福岡市・福岡国際会議場
2. 寺山隆司、山本祐也、岸本宣子、丸濱功太郎、水谷雅英、飯田征二、杉本朋貞、末梢神経損傷は脊髄後角での近接神経からの収斂投射を促進する、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日(木) - 9月13日(土)、横浜市・パシフィコ横浜
3. 丸濱功太郎、松香芳三、山本由弥子、寺山隆司、杉本朋貞、精製A型ボツリヌス毒素の軸索輸送と疼痛抑制効果、第37回日本神経科学大会、2014年9月11日(木) - 9月13日(土)、横浜市・パシフィコ横浜
4. 寺山隆司、杉本朋貞、口腔顔面の侵害受容機構と痛覚異常、第55回歯科基礎医学

会学術大会・総会、2013年9月20日(金)
- 9月22日(日)、岡山市・岡山コンベン
ションセンター

5. 丸瀨功太郎、松香芳三、寺山隆司、窪木
拓男、杉本朋貞、一次求心ニューロンに
よる精製A型ボツリヌス毒素の取り込み
と軸索輸送、第55回歯科基礎医学会学術
大会・総会、2013年9月20日(金) - 9月
22日(日)、岡山市・岡山コンベンション
センター
6. 寺山隆司、高橋基文、森慧太郎、山下智
弘、大村晋司、土屋泰規、杉本朋貞、末
梢神経損傷後の口腔痛覚過敏における延
髄後角での収斂投射の関与、第35回日本
神経科学大会、2012年9月18日(火) - 9月
21日(金)、名古屋市・名古屋国際会議場

〔図書〕(計0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0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~dentanat
omy2/](http://www.cc.okayama-u.ac.jp/~dentanatomy2/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺山 隆司 (TERAYAMA RYUJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准
教授
研究者番号：60333689

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教
授

研究者番号：50135729