

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 30 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592819

研究課題名(和文)炎症性痛覚過敏における三叉神経節ニューロンの興奮性に対するBDNFの役割

研究課題名(英文)Role of BDNF on the excitability of trigeminal ganglion neurons involved in inflammatory hyperalgesia

研究代表者

武田 守 (Takeda, Mamoru)

麻布大学・その他部局等・教授

研究者番号：20227036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：咬筋/顎関節などの炎症時に生じる痛覚過敏に三叉神経脊髄路中間亜核/尾側亜核” (SpVi/Vc) 境界領域に投射する三叉神経節ニューロンの興奮性が脳由来神経栄養因子(BDNF)によりどのように修飾を受けるかについてIn-vitro及びIn-vivo条件下で系統的に解析した。その結果、深部組織炎症時に生じる炎症性痛覚過敏に三叉神経節内小型三叉神経節ニューロンにおけるBDNF/trkBの産生増加が重要な役割を演ずる可能性が示唆された。したがって、三叉神経系支配領域の炎症性疼痛に”BDNF/trkBシグナル伝達系”が治療のための新たな分子標的として有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Present study investigated that the functional significance of hyperalgesia to the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) tyrosine kinase B (trkB) signaling system in trigeminal ganglion (TRG) neurons projecting to the trigeminal subnuclei interpolaris/ caudalis (Vi/Vc) transition region following masseter muscle inflammation under in vivo and in vitro conditions. We found that BDNF enhances the excitability of small diameter TRG neurons projecting onto the Vi/Vc following masseter muscle inflammation. Thus, these findings suggest that ganglionic BDNF-trkB signaling is therapeutic targets for the treatment for trigeminal inflammatory hyperalgesia

研究分野：医歯薬学

 キーワード：三叉神経節ニューロン BDNF パラクリン 炎症 パッチクランプ法 免疫組織化学 電気泳動的投与
細胞外記録

1. 研究開始当初の背景

一般に歯科臨床における歯髄、顎関節、咀嚼筋などの炎症時に生じる異常疼痛(痛覚過敏,アロディニア)や関連痛などの症状発現には三叉神経系の侵害情報伝達経路において生じる可塑的变化が重要な役割を担う。特に三叉神経脊髄路中間亜核/尾側亜核(trigeminal spinal nucleus interpolaris/caudalis: SpVi/Vc)は口腔顔面領域の深部組織からの情報処理とその中継核として重要であることが示唆されている。近年、神経細胞の生存、成長、シナプス形成など機能を持つ神経栄養因子の一つ脳由来神経栄養因子(BDNF: Brain derived neurotrophic factor)が神経系の可塑的变化に重要な役割を果たし、その機能維持に多彩な役割が注目されている。例えば、末梢から中枢へ侵害情報伝達に関わる一次感覚神経である脊髄後根神経節(DRG: dorsal root ganglion)ニューロンにおいてBDNFが産生され、脊髄後角でのシナプスにおいて神経伝達/修飾物質として放出され。その後、シナプス後膜のBDNF受容体(tyrosine kinase B: trkB)と結合により、N-methyl-D-aspartate(NMDA)受容体を介して二次ニューロンの興奮伝達を修飾する事実が報告されている。一方、末梢炎症/神経損傷によりDRGニューロンがBDNF産生を増強する事実及び脊髄後角におけるシナプス前終末からのグルタミン酸などの伝達物質の放出量がBDNFなどにより促進を受けることが示されている。実際trkBは炎症時において末梢性および中枢性にup-regulationされ、BDNFの応答を変調するとの報告もある。したがって、BDNFは侵害受容伝達経路中で、特に一次感覚神経の興奮性を修飾する物質として異常疼痛発現に重要な因子であることが示唆される。

我々は、これまでに三叉神経支配領域における顎関節など炎症時の異常疼痛の発現に神経節内で分泌される神経ペプチド(Substance P) サイトカイン(Interleukin-1)によるニューロン-ニューロン間またはニューロン-グリア細胞間のクロストークが重要な役割を演ずる可能性を明らかとしてきた。最近、歯髄炎や歯髄損傷により、侵害受容伝達に関わる小型/中型三叉神経節ニューロンにおいてBDNFとtrkBのup-regulationが誘導され、この効果がサイトカインにより増強されることも報告されている。さらに、SpVc領域に投射する小型三叉神経節ニューロンの多くはBDNF産生細胞であることが確認されている。また電気生理学的解析により、小型DRGニューロンの興奮性がBDNFの急性投与により電位依存性Na⁺やK⁺チャンネルの変調により増強することも判明し、糖尿病ラットにおける疼痛異常の原因であるDRGニューロンで生じるK⁺電流密度の減少がBDNF抗体処置により改善する事実も報告されている。これらの知見は深部組織炎症・損傷時において、三叉神経節内の細胞体

またはSpVi/Vcの境界領域の中枢性末端においてBDNFが分泌され、イオンチャンネルレベルで侵害受容性TRGニューロンの興奮性を修飾して、痛覚過敏発現に必須の役割を果たすことを強く示唆している。

2. 研究の目的

上述のことより、咬筋/顎関節などの深部組織からSpVi/Vc境界領域に投射するTRGニューロンの細胞体および中枢性終末において分泌されるBDNFが炎症によりup-regulationされ、慢性疼痛における痛覚過敏などの症状発現に強く関わる可能性が推察される。現在までにSpVi/Vc領域に投射する三叉神経節ニューロンの興奮性に対するBDNF修飾作用を*in-vitro*から*in-vivo*の条件下で系統的に解析した研究は見当たらない。そこで、三叉神経支配領域の深部組織(咬筋)からSpVi/Vcへ投射し炎症性痛覚過敏に関わる三叉神経節ニューロンの興奮性に対するBDNFの病態生理的役割を明らかにするために、*in-vitro*と*in-vivo*の条件下で行動学的、電気生理学的、免疫組織学的手法を用いて解析を行った。

3. 研究の方法

1) 咬筋炎症動物と逃避反射閾値測定

雄Wistarラット(BW:100-150g)を2群に分ける。ネブタール麻酔(45mg/Kg, i.p)した後、片側咬筋に、炎症群には起炎物質CFA(Complete Freund's Adjuvant)を0.05ml投与して、対照群には生理食塩水を同量投与した。起炎物質投与1-2日後、痛覚閾値は咬筋/顎関節付近の顔面皮膚に加えたvon Frey filamentsによる機械刺激による逃避反射閾値測定により痛覚過敏の有無を判定した。

2) 咬筋支配SpVi/Vc境界領域に投射するTRGニューロンの蛍光標識

ネブタール麻酔(45mg/Kg, i.p)した後、延髄背側部を外科的に露出後、微小ガラスピペットに充填した蛍光色素Microbead(MB)(0.05μL)を、マイクロマニピュレーターを用いてVi/Vc領域(Obox:+0.5mm, lateral:0.5mm, Depth:0.5mm)に注入した。一方、咬筋には蛍光色素0.5% Furuologold(FG)を10μLを注入した。

3) 免疫組織化学的解析(*in vitro*) BDNF及びtrkBの免疫組織化学

凍結切片作成と免疫染色: 炎症誘導および蛍光標識2-3日後のラットをホルマリン灌流固定後、片側TRGを取り出し、固定後、厚さ10μmの凍結切片を作成した。TRG切片をスライドガラス上に付着させBDNF抗体(1:200)とtrkB抗体(希釈倍率1:1000)に24時間インキュベーション後、二次抗体として励起波長の異なる2種の蛍光抗体(Alexa568/647/1:1000)を反応させた。

BDNF, trkB 免疫陽性細胞の解析: 共焦点レーザー顕微鏡を用いて FG/MB で標識された TRG ニューロンの細胞体の大きさ (<30 μm : A₋, C-ニューロンに相当; 31-40 μm : A₋, A₋ ニューロンに相当; >41 μm : A₋ ニューロンに相当) と BDNF 及び trkB の発現関係を解析した。

(4) TRG ニューロンのパッチクランプ法による解析 (*in vitro*)

ニューロンの急性分離: 蛍光標識 2-3 日後、Wistar ラット (BW, 100-150g) を断頭処置後、FG 注入側の TRGs を摘出した。組織は細切後、15-25 分、37 °C、Hank's balanced salt solution, pH 7.3) にてインキュベート、コラゲナーゼ type XI and type II (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, U S A) で酵素処理した。パスツールパイペットを用いて細胞を機械的に分離した。

ホールセルパッチクランプ法

蛍光励起装置を用いて FG と MB の両者に標識されたニューロンを同定した。アンホテリシン B (60mg/ml) を電極内液 (120 mM potassium ethanesulphonate, 20 mM KCl, 7.5 mM HEPES and 2 mM EGTA (ethylene glycol-bis-minoethyl ether N,N,N', N'-tetraacetic acid), pH 7.3) に入れ、ホールセルモードにて実験した (抵抗: <20M Ω)。

電流固定下での解析: 通常の細胞外液を用いて BDNF (1-100ng/ml) 投与より TRG ニューロンに膜電位変化が誘発されるか否かを検討した (過分極パルスにより膜抵抗の変化をモニター)。もし膜電位の変化が得られたなら、この変化が BDNF の濃度依存性 (1-100ng/ml) を示すか否かを調べ、次に tyrosine kinase 阻害薬 (K252a, 10ng/ml) の同時投与により trkB 特異的反応か否かを確認した。また、ステップパルス (10-500pA/300ms) により誘発されるスパイク発火頻度、持続時間、発火閾電位の変化の有無を解析し、最後に BDNF による変化が K252a によりブロックされるか否かを調べ、trkB 特異的な変化か否かを検討した。

電圧固定下での解析: 通常の細胞外液 (155 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, and 20 mM glucose, pH 7.35) より Na⁺ 置換した溶液 (150 mM choline chloride, 3 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, and 20 mM glucose, pH 7.35) を用いて、2 つのパルスプロトコルを用いて膜の興奮性の変調に関わる K⁺ (I_A, I_K) 電流を分離して BDNF (50ng/ml 投与により電流が変調されるか否かを調べた。最後に BDNF による変化が K252a によりブロックされるか否かを調べ、受容体特異的な変化か否かを検討した。

(5) TRG ニューロンの細胞外ユニット記録

法による解析 (*in vivo*)

TRG 単一ニューロン活動の記録: ネンプター麻酔 (45mg/Kg, i.p.) したラットを脳定位固定装置に固定後、吸引処置後、三叉神経組織を露出する。TRGs にマルチバレルのガラス微小電極を刺入してユニット放電を AC アンプ及びデータ解析装置を用いて記録した。咬筋に刺入したステンレススチール製の双極刺激電極を用いて電気刺激 (0.1-3ms, 0.1-5mA, 1Hz) して応答するニューロンの神経伝導速度をその反応潜時と刺激記録部位の距離より算定しニューロンタイプ (A₋ 線維 >2m/s; C-線維 2m/s) を同定した。

三叉神経節内 BDNF 電気泳動的投与の効果 咬筋支配 TRG ニューロンの自発放電の

変化: 伝導速度を算定したユニットに対して自発放電の有無を確かめた後、マルチバレルの他の電極より微細電気泳動装置を用いて電気泳動的に BDNF (50ng/ml, 20-40s) を記録電極近傍に投与し、自発放電が誘発されるか否かを確かめた。もし、投与電流依存性に放電頻度が変化が誘発されたら、この反応が trkB 特異的か否かを判定するた K252a (10ng/ml), の同時投与において効果の消失を検討した。

咬筋領域の機械刺激に対する TRG ニューロンのユニット放電: 咬筋および皮膚領域の機械刺激に対して応答性に対して、電気泳動的 BDNF 投与により、興奮性増大が誘発されるか否かを調べた。さらに侵害機械刺激 (ピンセット, 4 N) に対する応答性についても検討した。BDNF 投与により、変化が得られたなら、K252a の同時投与において効果の消失を確かめる。

炎症群ラットの TRG ニューロンの興奮性に対する K252a の効果: ラットの咬筋に起炎物質 (CFA; Complete Freund's Adjuvant) を注入した炎症群ラットにおける、増強した自発放電、咬筋への機械刺激に対する放電頻度に対する K252a (10ng/ml) を検討した。

4. 研究成果

1) 行動学的解析

起炎物質投与 1-2 日後 von Frey filaments による咬筋を覆う皮膚への機械刺激による逃避反射閾値は対照群に比較して有意に低下し痛覚過敏を示した (図 1)。

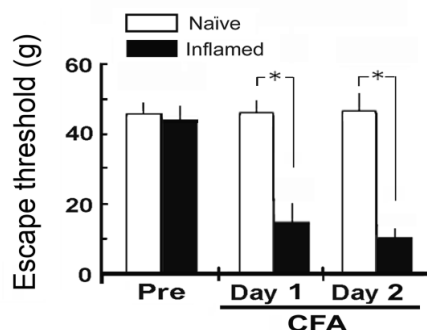


図 1: 炎症誘導後の逃避反射の閾値の変化

2) 免疫組織化学的解析

同側の咬筋に Fluorogold 注入し、この部位を支配する TRG ニューロンを FG により蛍光標識し、さらに蛍光色素 Microbead を左側 SpVi/Vc 領域腹側部に注入し、この部位に投射する TRG ニューロンを MB により蛍光標識した。正常対照群および炎症群ラットの FG で標識された TRG ニューロンのおよそ半数は MB 陽性を示した(対象群 44%; 炎症群:48%)。一方、これらの細胞のうち BDNF 及び trkB 陽性ニューロンは主に中型(<math><40 \mu\text{m}</math>)から小型(<math><30 \mu\text{m}</math>)の TRG ニューロンに集中していた。炎症誘発により BDNF 陽性細胞数は中型 小型の TRG ニューロンにおいて有意に増加していた(図 2)。一方、炎症群の trkB 陽性細胞は小型 TRG ニューロンにおいて有意に増加していた(図 2)。

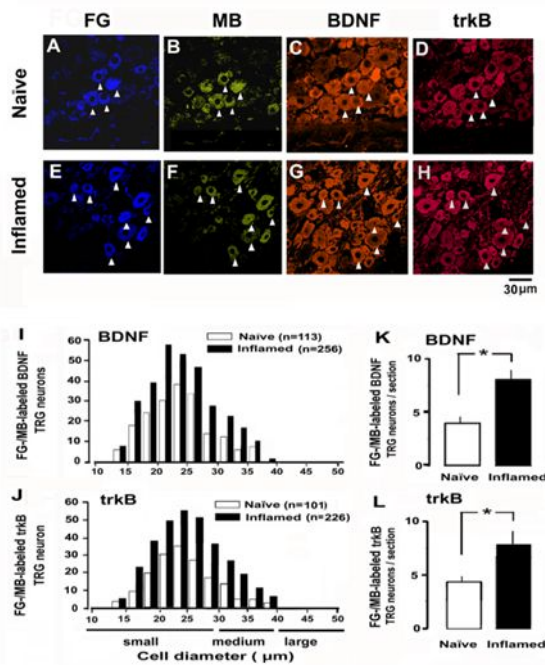


図 2: 正常群と炎症群における BDNF および trkB 免疫活性陽性 FG/MB 標識 TRG ニューロン

(3) パッチクランプ法による解析

免疫組織学的解析により得られた結果をもとに、深部組織炎症時、SpVi/Vc 領域に投射し、炎症性痛覚過敏に関わる TRG ニューロンの興奮性に対するの病態生理的役割を明らかにするために、FG/MB で逆向性標識された小型、中型三叉神経 TRG ニューロンの興奮性が BDNF 投与により、どのように変調するかについて穿孔ホールセルパッチクランプ法を用いてイオンチャネルレベルで電気生理学的に炎症動物と比較検討した

急性分離した TRG ニュー正常対象群の TRG ニューロンは自発放電を持つ細胞は少数であったが、炎症群のニューロンは多くの細胞で自発放電発火を示し、その発火頻度も有意に高い値を示した(図 3)。一方、BDNF (1-100ng/ml) 投与より正常対照群および炎

症群ラットの TRG ニューロンは、入力抵抗増加を伴う脱分極性応答を示した。正常対照群に比べて炎症群ラットでは脱分極性応答を示すニューロンの数が有意に多く、さらに脱分極の振幅、それに伴うスパイク発火頻度は有意に高い値を示した。スパイク誘発の閾値も正常対照群に比べて炎症群ラットで低い値を示した(図 3)。炎症群は、正常に比べて脱分極性ステップパルス(10-700pA/200ms)により誘発されるスパイク閾膜電位は低く、発火頻度が有意に高い値を示し、これらの変化は tyrosine kinase B 阻害薬 K252a により抑制された(図 4)。

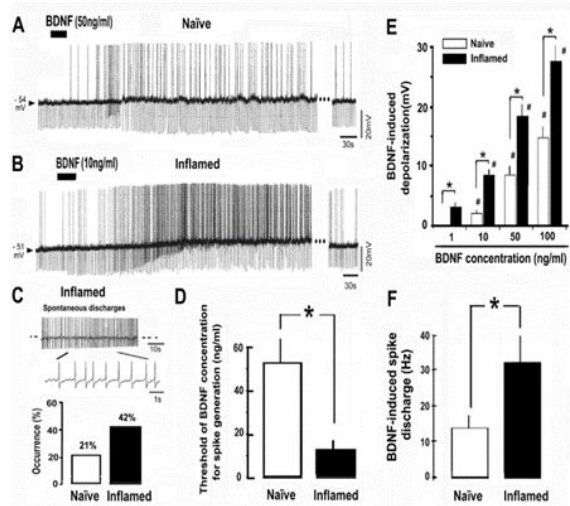


図 3: 小型 FG/MB 標識 TRG ニューロンの興奮性に対する BDNF の効果: 正常群に比較して炎症群において BDNF に対する感受性増大

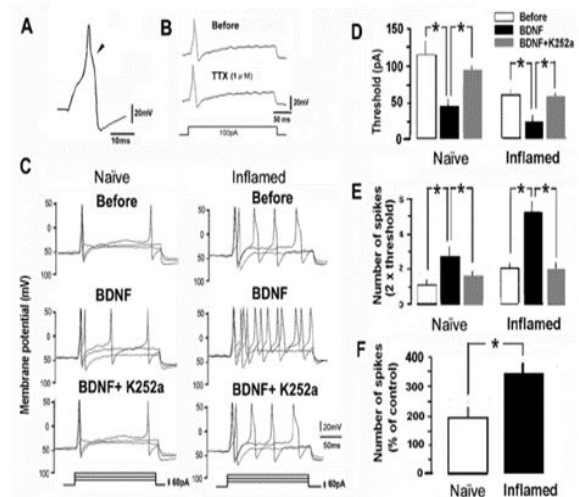


図 4: 正常群と炎症群の小型 FG/MB 標識 TRG ニューロンの放電頻度と閾値に対する BDNF の効果の比較

(4) 細胞外記録による TRG ニューロン活動に対する BDNF 電気泳動的投与による解析

正常および炎症群のネブタール麻酔したラットの三叉神経節にマルチバレルのガラス微小電極を刺入して、ユニット放電を、

咬筋および SpVi/Vc の電気刺激に応答する A-TRG ニューロンより細胞外スパイクを同定した。正常対照群に比較して炎症群では自発放電を持つユニットが有意に増加していた。炎症群においては微小電気泳動的に投与した BDNF (10ng/ml) により自発放電頻度の増加が誘発され、電流依存性に放電頻度は有意に増加した。また咬筋・周辺皮膚への侵害刺激 (von Frey hair) で誘発される放電頻度は電気泳動的に投与した BDNF (10ng/ml) により有意に増加し、機械刺激に対する閾値も有意に低下していた。これらの効果は K252a (10ng/ml) の同時投与により有意に抑制された。

(5) 本研究のまとめ

深部組織炎症 (咬筋など) により生じる痛覚過敏発現には三叉神経脊髄路中間亜核/尾側亜核 (SpVi/Vc) 領域に投射する三叉神経節内小型 中型 TRG ニューロンの BDNF-TrkB 産生増加が起き、BDNF の傍分泌による活性化される trkB が電位依存性 K チャネルを介するシグナル伝達系を変調させ小型三叉神経節ニューロンの興奮性を修飾する可能性が強く示唆された。

したがって、本研究により三叉神経系支配領域の深部組織の炎症性疼痛に BDNF-trkB シグナル伝達系や K チャネルが新たな分子標的となり trkB 拮抗薬や K チャネル開口薬が治療に有効である可能性が示唆された (図 5)。

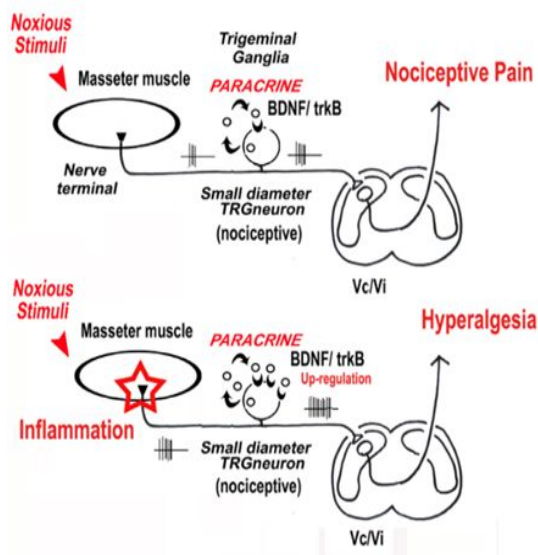


図 5： 仮説：咬筋などの深部組織の炎症時、三叉神経脊髄路中間亜核/尾側亜核境界領域に投射する三叉神経節内の小型侵害受容性三叉神経節 (TRG) ニューロンにおける BDNF/trkB シグナル伝達系の活性化が痛覚過敏を誘導する。

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 2 件)

Takeda M, Takahashi M, Kitagawa J, Kanazawa T, Nasu M, Matsumoto S (2013) Brain-derived neurotrophic factor enhances trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone following masseter muscle inflammation. Mol Pain 9:49

Takeda M, Takahashi M, Matsumoto S (2014) inflammation enhanced brain-derived neurotrophic factor-induced suppression of the voltage-gated potassium currents in small-diameter trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone. Neuroscience 261:223-231.

[学会発表] (計 1 件)

Takeda M, Takahashi M, Kitagawa J, Kanazawa T, Nasu M, Matsumoto S (2013) Brain-derived neurotrophic factor enhances trigeminal ganglion neurons projecting to the trigeminal nucleus interpolaris/caudalis transition zone following masseter muscle inflammation. Neurosci Res (Suppl) 2014

[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:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 守 (TAKEDA MAMORU)

麻布大学 生命・環境科学部 教授

研究者番号: 20227036

(2) 研究分担者

(0)

研究者番号:

(3) 連携研究者

(0)

研究者番号: