

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32667

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890262

研究課題名(和文)心疾患に起こる口腔顎顔面領域の関連痛の究明

研究課題名(英文) Referred pain in the oral and maxillofacial area occurs in heart disease

研究代表者

井出 良治 (IDE, Ryoji)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：10638084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：篩状神経節(nodose ganglion, NG)細胞の単離・培養については、確実に安定した細胞数を単離・培養することが可能になった。次に、電気生理学的解析手法を用いて、乳幼仔ラットNG細胞についてテトロドトキシン抵抗性(TTX-R)の小型細胞を対象に、カプサイシン急性投与に対する興奮発生の有無を調べた。その結果、72パーセントの細胞でカプサイシン投与により活動電位の発生を確認した。

研究成果の概要(英文)：Firstly, we developed a procedure and became able to obtain a steadily number of neurons from acutely isolated and cultured immature rat nodose ganglion (NG).

Next, using electrophysiological technique, we targeted small NG neurons possessed tetrodotoxin resistant (TTX-R) voltage-gated sodium channels and investigated whether excitement occurs at acutely applied capsaicin on the neurons. The results showed that action potential could be induced by the capsaicin treatment in 72% of the neurons. We examined.

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：関連痛 心疾患 TRPV1 ナトリウムチャネル 篩状神経節

1. 研究開始当初の背景

心血管障害を持つ患者に歯科治療を行う際には、虚血発作の誘発など心血管機能障害を悪化させないように配慮する必要がある。歯科治療と循環器機能の関連性については、口腔顎顔面領域の刺激により起こる徐脈と低血圧が「三叉神経 - 心臓反射 (trigemino-cardiac reflex)」として知られているが、近年、心疾患と肺癌の関連痛として口腔顎顔面領域の痛みが起こり、それが迷走神経を介して中枢へ伝えられる可能性が指摘された。

心臓の痛覚受容については、酸感受性イオンチャンネル (acid-sensing ion channel, ASIC3) に加えて、テトロドトキシン抵抗性 (TTX-R) の電位依存性ナトリウムチャンネルの1つである Nav 1.8 とカプサイシン受容体である transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) の2つが関与すると推測されている。

申請者は大学院時に、乳幼仔ラットの心臓から逆行性に FG 標識された細胞を節状神経節 (nodose ganglion NG) で検出することに成功した。NG には、心臓ほか複数の内臓由来の一次知覚神経細胞が多数含まれるが、新規技術により心臓由来の細胞を特化して検出することが可能となった。さらに免疫組織化学の手法を加えることにより、心臓由来の FG 標識細胞の 9 割近く (89%) が TRPV1 陽性であることを確認した。

TRPV1 は侵害刺激となる高温領域で活性化され生体内侵害刺激を感知すると考えられており、消化管や気道由来の NG 神経細胞では、各臓器の炎症時に TRPV1 の発現が増加することが観察されている。しかし、心臓由来の知覚神経細胞の TRPV1 受容体の発現についてはほとんど知られていない。加えて、成熟動物を対象とした過去の研究では、トレーサーを心臓に注入する際に人工換気を必要とし、さらにトレーサーの逆行性輸送のため少なくとも1週間の術後観察が必要だった。そこで、申請者は、乳幼仔ラットを対象とした新規技術を開発しその結果、人工換気を使わず短期間で心臓由来の FG 標識細胞を検出することが可能となった。

一方、TRPV1 と電位依存性ナトリウムチャンネルに関するパッチクランプ実験は、乳幼仔と成熟ラットの神経節細胞を用いて行われているが、体性疼痛の制御を目的として対象は脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion) と三叉神経節 (trigeminal ganglion) に限られており、両神経節と同様にカプサイシン感受性が知られている NG 神経細胞の実験はいまだ見当たらない。申請者の過去の実験から推測すると、少なくとも乳幼仔ラットの心臓由

来の一次知覚神経細胞は TRPV1 の陽性率が高く、TRPV1 が同細胞の電位依存性ナトリウムチャンネルに影響を与える可能性が考えられた。

2. 研究の目的

虚血性心疾患の臨床上重要な症状の一つとして口腔顎顔面領域の関連痛が存在することが知られている。しかしながら現在までその原因について詳細に究明されていなかった。そこで本研究は、心疾患の関連痛に関与すると考える迷走神経節の1つである NG から心臓由来の一次知覚神経細胞を検出する新規技術を基盤とし、同神経細胞を単離培養して電気生理学的解析方法を加えることにより、心疾患による口腔顎顔面領域の関連痛の発生機序を解明することを目的とする。

申請者の新規技術は、乳幼仔ラットの心臓壁に蛍光トレーサー-Fluoro-Gold (FG) を注入し、その2日後に NG を摘出して心臓から逆行性に FG 標識された細胞を検出するものである。本手法で FG 標識された細胞を単離培養し、パッチクランプ法を応用することによって機能的特徴を明らかにした上、異なる培養条件 (低酸素環境) や疾患モデル動物 (糖尿病・高血圧症ラット) に応用することによって心血管障害が感覚機能に及ぼす影響を明らかにする。本研究は、心臓由来の感覚機能を一次知覚細胞レベルで評価し、心疾患の一症状として起こる口腔顎顔面領域の疼痛発生の機序を解明する方法を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学手法：ホールセルパッチクランプ法

対象：新生児 Wistar 系ラット (9 - 13 日齢) NG ニューロン (n = 15)。

細胞単離・培養：

摘出した NG を 37°C、5~10 分間 5%CO₂ で短期培養し、コラゲナーゼ (type2: 1~2 mg、type11: 4~5 mg) を含むハンクス培養液に置換する。

NG を含む培養液をパスツールピペットでペッティングすることによって、単離した細胞を含む懸濁液が得られる。Poly-L-lysine で前処理したカバーガラス上に懸濁液を滴下する。培地として、Leibovitz's L-15 に 10% 新生ウシ血清、26 mM NaHCO₃ および 30 mM グルコースを添加する。

次いで、細胞は 37°C、5%CO₂ で維持し、懸濁液滴下後 2~10 時間の間に記録を行なった。

- 記録溶液：

細胞外液 (単位：mM) 130 NaCl、5 KCl、

2 CaCl₂、1 MgCl₂、10 HEPES および NaOH で pH7.4 に調整し 4 で保存、使用直前に 10 mM をグルコース加えて使用する。

細胞内液 (単位 : mM) : 135 KCl, 1 MgCl₂, 10 EGTA, 5 Mg-ATP 10 HEPES および KOH で pH7.2 に調整し -20 で保存し、使用直前に解凍、使用する。

(2)電気生理学的記録 :

記録はパッチクランプ実験用アンブ (Axopatch 200B Axon Instruments, Union City, CA), によって増幅し、専用ソフト (pClamp10, Axon Instruments)によって解析を行なった。

電流固定モードで、静止膜電位を測定し、tetrodotoxin (TTX) (1 μM) 5分間灌流する、但し灌流前後に脱分極性電流刺激 (5ms, 200/500 PA) に応じて活動電位の発生した細胞のみを測定に使用する。

測定プロトコル

(1)カブサイシン局所灌流前の測定 (TTX5分)

(2)カブサイシン局所灌流の計測 (20秒)

(3)カブサイシン局所灌流終了後の測定 (wash out)

(3)免疫組織化学

- 対象 : 新生児 Wistar 系ラット (9 - 13日齢まで) NG (n = 3)

- 薄切 : MG 凍結標本から 10 μm の厚さでクライオスタット (Leica CM3050 S, Leica Microsystems Nussloch GmbH, Heidelberg, Germany) を使用し連続切片を作製した。

- 染色 :

ブロッキング (5% スキムミルク in PBS) : overnight at 4 .

一次抗体 (1:400, mouse monoclonal anti-Nav1.8, N134/12, UC Davis/NIH NeuroMab Facility, Davis, CA, USA; 1:500 rabbit polyclonal anti-rat TRPV1, KM018, Trans Genic Inc., Kumamoto, Japan) : overnight at 4 .

二次抗体 (1:1000, Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody and Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-mouse IgG antibody, Life Technologies Co., Carlsbad, CA, USA) 2h at room temperature.

- 鏡検 : 共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 700, Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Germany).

4 . 研究成果

1.パッチクランプ実験では TTX (1 μM) 灌流下でのカブサイシン (1 μM) 局所灌流により、NG 神経細胞の 72% に活動電位が誘発された。

2. 免疫組織化学では、半数以上のニューロ

ンで Nav1.8 チャネル及び TRPV1 チャネルが (それぞれ、54% および 53%) 検出された。さらに、Nav1.8 チャネル陽性ニューロンの 85% が、TRPV1 チャネルを共発現し、TRPV1 チャネル陽性ニューロンの 87% が Nav1.8 チャネルを共発現した。

以上の結果より、少なくとも未成熟な動物で、TTX-R ナトリウムチャネルと TRPV1 チャネルは、高率に共存する事を電気生理学的及び免疫組織学的手法により確認した。TTX-R ナトリウムチャネルと TRPV1 チャネルは、迷走神経を介した内臓感覚に重要な役割を担う事が示唆された。さらに、両チャネルは内臓感覚と顎顔面口腔領域の感覚との関連を究明する上で特に注目すべき要素である事が示された。

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 1件)

Makino M, Saiki C, Ide R, Matsumoto S. Role of rostral medulla in serotonin-induced changes of respiratory rhythm in newborn rat brainstem-spinal cord preparations. Neurosci Lett 2014; 559:127-131.

[学会発表] (計 2件)

Saiki C, Ide R, Tamiya J, Matsumoto S: Immunohistochemical analysis of Nav1.9 sodium channel and transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) in newborn rat large intestine enteric nervous system, 第91回日本生理学会大会 (鹿児島 平成25年3月17日)

Ide R, Tamiya J, Kanazawa T, Takahashi M, Saiki C, Matsumoto S. Capsaicin sensitivities of neonatal rat nodose ganglion neurons under TTX application. 第90回日本生理学会大会 (東京 平成26年3月29日)

[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

井出 良治 (IDE Ryoji)

日本歯科大学 生命歯学部 助教

研究者番号：10638084

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：