

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463151

研究課題名(和文) 抑制性神経回路をターゲットとした神経障害性疼痛発症機構の解明

研究課題名(英文) Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection.

研究代表者

岡田 明子 (OKADA-OGAWA, Akiko)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：10434078

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ラット下歯槽神経を切断し、神経障害性疼痛を生じさせた IANXラットモデルを作製し、三叉神経脊髄路核(Vc)におけるGABA介在神経細胞の関与を調べた。その結果、下歯槽神経切断早期では、Vc表層神経細胞におけるGABAトランスポーターであるVGATの発現が抑制されてGABAの放出が減少し、後期では、Vc表層神経細胞のK⁺-Cl⁻外輸送KCC2が抑制されることにより、GABA様神経細胞の機能が興奮性に变化する可能性が示唆された。以上の結果より、GABA様神経細胞の変化が下歯槽神経切断後の神経障害性疼痛に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Involvement of the functional changes in the GABAergic system in the trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) in the mechanisms underlying extraterritorial neuropathic pain in the orofacial region following inferior alveolar nerve transection (IANX) is investigated. It was revealed that GABAergic Vc neurons might be reduced in their number at the early period after IANX and the functional changes might occur in GABAergic neurons from inhibitory to excitatory at the late period after IANX, suggesting that the neuroplastic changes occur in the GABAergic neuronal network in the Vc due to morphological and functional changes at different time periods following IANX and resulting in the extraterritorial neuropathic pain in the orofacial region following trigeminal nerve injury.

研究分野：麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛 GABA KCC2 三叉神経障害 脊髄路核

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、下顎神経(下歯槽神経; IAN)を切断し、上顎や頬領域に関連痛を引き起こした神経障害性疼痛モデルラットを作製し、口腔顔面領域における疼痛異常発症の中枢神経機構を解明してきた。しかし、いかなるメカニズムで疼痛異常発症が生じるかについてはまだまだ不明な点が残されている。

近年、ラットの坐骨神経切断により、脊髄の神経細胞膜上に存在する Cl⁻くみ出しポンプである KCC2 が抑制され、GABA 作動性介在神経細胞の抑制性の作用が興奮性に变化するという報告がなされている(Coull JA et al., 2003, Nature)。KCC2 合成阻害には、神経障害により脊髄で活性化したミクログリアから放出される脳由来神経栄養因子(BDNF)が関与していることがわかってきた(Biggs JE, et al., 2010, Mol Pain)。その後、脊髄の KCC2 合成が阻害されることにより、足における神経障害性疼痛が引き起こされるという多くの報告がなされるようになった。そこで我々は、GABA 作動性介在神経細胞の変化が、口腔顔面領域における疼痛異常発症の中枢神経機構に関与している可能性を考えた。(Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, Gravel C, Salter MW, De Koninck Y. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. Nature. 2005;438:1017-1021.)

2. 研究の目的

神経障害性疼痛の発症機構は不明であり、有効な治療法もないため、世界で 2,200 万人以上の患者が苦しんでいると報告されている。特に口腔顔面領域における神経障害性疼痛は、食事や会話に困難が生じるため、日常生活に大きな支障をきたす。申請者らはこれまでに顔面皮膚に疼痛異常を発症させた神経障害性疼痛モデルラットを作製し、中枢神経系における発症メカニズムを明らかにしてきた。その中で、抑制性神経細胞が慢性口腔顔面痛に深く関与している可能性を発見した。そこで申請者らは、中枢神経系における慢性口腔顔面痛に対する抑制性神経の関与を詳細に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

Venus(蛍光タンパク)と GABA トランスポーター(VGAT)を共発現させた遺伝子変換ラット(VGAT-Venus ラット)を用いて、以下のように行動学的観察、電気生理学的研究、免疫組織化学的染色法、Western blot 法にて GABA 介在神経細胞の変化を詳細に調べた。

(1) 三叉神経第 3 枝 (IAN) 切断モデル作製

適麻酔下、VGAT-Venus ラットの IAN を切断 (IANX ラット)。また、神経の切断は行わず、下顎骨の切削のみ (Sham ラット) を行った。

(2) 行動学的観察 - IANX ラットと Sham ラットの顔面三叉神経第 2 枝 (V2) 領域、髭頬中央部に、フォンフライヘアによる機械刺激を加え、逃避反応行動閾値を測定した。さらに、KCC2 ブロッカーである R-DIOA をラットのくも膜下腔 Vc 領域に投与し、逃避反応行動閾値の変化を調べた。

(3) 電気生理学的研究 - IANX ラットと Sham ラットを適麻酔下において、頭蓋固定装置に固定後 Vc を露出した。臭化パンクロニウムにて非動化し単一神経細胞活動を記録し、記録中は、1-2% イソフルラン吸入麻酔にて麻酔状態を維持した。V2 領域の顔面受容野に、機械刺激、熱刺激、冷刺激を与え、これらの刺激にตอบสนองする神経細胞を同定した。さらに、GABA_A アゴニストのムシモルを Vc に局所投与し、その神経細胞応答の変化を調べた。

(4) 2重蛍光免疫組織化学的染色法 - IANX ラットまたは Sham ラットを十分深い麻酔にて灌流固定し、延髄の組織を取り出し、ミクロトームを用いて 30 μ m の凍結切片を作製した。浮遊切片を 10% ヤギ血清にてブロッキングを行った後、抗 pERK (anti-Phospho-P44/42-Map Kinase) または KCC2 抗体にインキュベートした。引き続き、抗 GFP 抗体にインキュベートさせ VGAT 発現を増幅し、Alexa488 と Alexa568 を用いて蛍光発色させた。そして、共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて 2重免疫染色発現様式を詳細に解析した。

(5) Western blot 法 適麻酔下に IANX ラットと Sham ラットの Vc 領域のタンパク質を抽出し、電気泳動法 (SDS-PAGE) によりメンブレンに転写した。抗 KCC2 抗体を用いて、タンパク質を検出し定量した。

4. 研究成果

VGAT-Venus ラットの下歯槽神経切断 1 週間から 3 週間目まで、顔面三叉神経第 2 枝領域の機械刺激に対する逃避反応行動閾値は低下したが、Sham ラットでは変化しなかった。さらに、R-DIOA を Sham ラットのくも膜下腔に持続投与したところ、IANX ラットと同じように機械刺激に対する逃避反応行動閾値の低下が認められた。また、下歯槽神経切断 1 週間後から、Vc 表層における VGAT-Venus 陽性細胞の発現が減少した。切断 3 週間目においては、KCC2 陽性発現の減少がみられ(図 1)、侵害刺激による VGAT-Venus 陽性細胞の活性化が認められた。さらに、ムシモルを IANX ラットの Vc に局所投与することにより、Vc 神経細胞活性の抑制が見られなくなった。よって、切断 3 週間目では、Vc の KCC2 発現が減少することにより、Vc における GABA 様神経細胞の興奮が抑制性から興奮性の作用を引き起こしたことが示唆された。これらの結果より、下歯槽神経切断早期では、Vc 表層神経細胞における VGAT の発現が抑制されて GABA の放出が減少し、後期では、Vc 表層神経細胞の KCC2 が抑制されることにより、GABA 様神経細胞の機能が興奮性に变化する可能性が示唆された(図 2)。以上の結果より、GABA 様神経細胞の変化が下歯槽神経切断後の神経障害性疼痛に関与している可能性が示唆された。

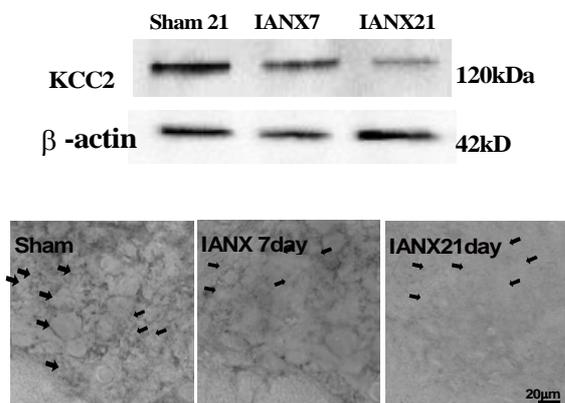


図 1

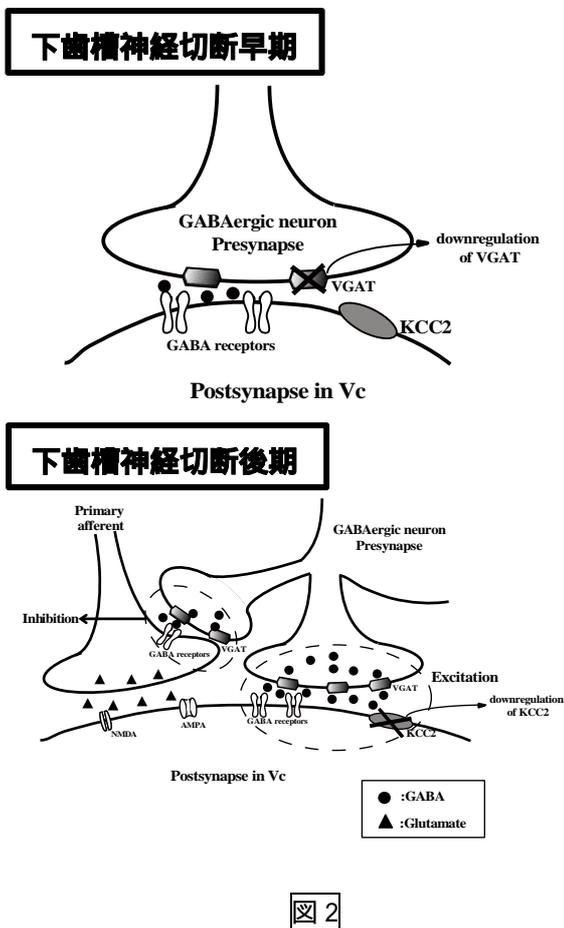


図 2

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 17 件)

1. Okada-Ogawa A, Imamura Y, Iwata K. (他 5 名,1,3,8 番目) Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. *Exp Neurol* 267:42-52, 2015, doi: 10.1016/j.expneurol.2015.02.030. 査読有
2. Shinoda M, Iwata K. (他 7 名,1,9 番目) Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain* 156:2528-2537, 2015; doi: 10.1097/j.pain.0000000000000322. 査読有
3. Kiyomoto M, Iwata K. (他 7 名,9 番目) p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain in rats. *Mol Pain* 11:48, 2015, doi: 10.1186/s12990-015-0053-y. 査読有

4. Urata K, Iwata K. (他6名,8番目) Involvement of TRPV1 and TRPA1 in incisional intraoral and extraoral pain. *J Dent Res.* 94:446-54, 2015, doi: 10.1177/0022034514565645. Epub 2015 Jan 9. 査読有
 5. Tsuboi Y, Iwata K. (他 8 名,10 番目) Morphological and functional changes in regenerated primary afferent fibres following mental and inferior alveolar nerve transection. *Eur J Pain.* 19:1258-66, 2015, doi: 10.1002/ejp.650. Epub 2014 Dec 19. 査読有
 6. Koike K, Shinozaki T, Hara K, Noma N, Okada-Ogawa A., Asano M, Shinoda M., Eliav E, Gracely RH, Iwata K., Imamura Y. Immune and endocrine function in patients with burning mouth syndrome. *Clin J Pain.* 30: 168-73, 2014, doi: 10.1097/AJP.0b013e31828c4bf1. 査読有
 7. Imamura Y. (他 12 名,10 番目). Can the neurovascular compression volume of the trigeminal nerve on magnetic resonance cisternography predict the success of local anesthetic block after initial treatment by the carbamazepine? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 117:e15-21,2014, doi: 10.1016/j.oooo.2012.03.029. Epub 2012 Aug 24. 査読有
 8. 岡田明子 (他 6 名,1 番目)ラット下歯槽神経切断による神経障害性疼痛に対する GABA 介在神経細胞の関与. *Pain Research* 28: 33-41, 2013, <http://ci.nii.ac.jp/naid/10031165774>. 査読有
 9. Shinoda M., Okada-Ogawa A., Imamura Y., Iwata K. (他 5 名,2,3,8,9 番目) Fractalkine signaling in microglia contributes to ectopic orofacial pain following trapezius muscle inflammation. *J Neurosci* 33: 7667-80, 2013, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4968-12.2013. 査読有
 10. Okada-Ogawa A., Imamura Y. (他 10 名,5,12 番目) Quantitative evaluation of oral function in acute and recovery phase of idiopathic facial palsy; a preliminary controlled study. *Clin Otolaryngol* 38: 231-6, 2013, doi: 10.1111/coa.12118. 査読有
 11. Ohara K, Iwata K. (他 7 名,9 番目) Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation. *J Neuroinflammation* 10:139, 2013, doi: 10.1186/1742-2094-10-139. 査読有
 12. Sugiyama T, Iwata K. (他10名,12番目) Nitric oxide signaling contributes to ectopic orofacial neuropathic pain. *J Dent Res* 92:1113-7.,2013, doi: 10.1177/0022034513509280. Epub 2013 Oct 15. 査読有
 13. Iwata K. (他 11 名,12 番目) Involvement of ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons in thermal hypersensitivity in rats with infraorbital nerve injury. *PLoS One* 8:e57278,2013, doi: 10.1371/journal.pone.0057278. Epub 2013 Feb 22. 査読有
 14. Matsuura S, Iwata K. (他8名,10番目) Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. *PLoS One* 8:e52840, 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0052840. Epub 2013 Jan 16. 査読有
 15. Noma N, Imamura Y., Iwata K. (他6名,8,9番目) Interaction of IL-1 β and P2X(3) receptor in pathologic masseter muscle pain. *J Dent Res* 92:456-60, 2013, doi: 10.1177/0022034513483770. Epub 2013 Mar 21. 査読有
 16. Tanaka T, Imamura Y. (他 12 名,10 番目) Significance and utility of MR cisternography for diagnosis and treatment of trigeminal neuralgia. *J. Bio Science and Engineering* 6, 365-371, 2013, <http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=29538>, 査読有
 17. Teramoto K, Iwata K. (他 11 名,13 番目) Changes in expression of growth-associated protein-43 in trigeminal ganglion neurons and of the jaw opening reflex following inferior alveolar nerve transection in rats. *Eur J Oral Sci.* 121:86-91. 2013, doi: 10.1111/eos.12021. Epub 2013 Mar 4. 査読有
- [学会発表] (計 4 件)
1. Okada-Ogawa A. Studying the neural mechanisms of burning mouth syndrome. 15th scientific meeting of AACMD. Kyungpook National University (Daegu, Korea) 2015/10/25.
 2. 中谷有香, 岡田明子, 坪井美行, 篠田雅路, 岩田幸一, 今村佳樹. 口腔乾燥による舌痛に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核のリン酸化 ERK. 第 36 回日本疼痛学会. KKR ホテル大阪 (大阪府, 大阪市) 2014/6/21.
 3. 岡田明子. 舌痛症に対する私の治療戦略. 第 26 回レーザー治療学会. ス

- テーションコンファレンス万世橋
(東京都, 千代田区)2014/6/28.
4. 岡田明子. 下垂体腫瘍により口腔顔
面痛を引き起こした症例. 第 19 回
口腔顔面神経機能学会学術大会.
日本大学歯学部(東京都, 千代田
区)2015/3/7.

〔図書〕(計 4 件)

1. 岡田明子, 今村佳樹. 痛みの診療
ベストプラクティス. 舌咽神経痛.
メディカルレビュー(2014) 28-29.
2. 岡田明子, 今村佳樹. 痛み診療キー
ポイント. 舌痛症. 文光堂(2014)
127.
3. 岡田明子. 口腔顔面痛の診断と治療
ガイドブック. 局所麻酔薬. 医歯
薬出版株式会社. (2013) 75-84.
4. 岡田明子, 今村佳樹. 新編顎関節症.
疼痛の基本 疼痛の発生メカニズ
ム. 永末書店. (2013) 23-25.

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

岡田 明子 (OKADA-OGAWA, Akiko)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号: 10434078

(2) 研究分担者

岩田 幸一 (IWATA, Kouichi)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 60160115

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号: 20362238

今村 佳樹 (IMAMURA, Yoshiki)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号: 90176503