

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861936

研究課題名(和文) 口腔顔面領域の神経障害性疼痛における神経栄養因子の神経再生と疼痛制御機構の解明

研究課題名(英文) The effects of neurotrophic factor in the orofacial neuropathic pain

研究代表者

大山口 藍子 (Oyamaguchi, Aiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：70464237

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)：口腔顔面痛における非ペプチド性C線維の機能的役割については未だ十分に知られていない。今回の研究は三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるIB4結合能陽性ニューロンを選択的に削除し、上口唇へのホルマリンテストによる顔面ひっかき行動の影響、またc-Fos発現を観察したのものである。その結果、三叉神経のIB4結合能陽性ニューロンはホルマリン誘導顔面痛において抗侵害受容制御機能の役割を果たし、また三叉神経上位中枢におけるGABA受容体の役割により抗侵害機能の調節機構をさらに複雑にしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The functional significance of non-peptidergic C-fibers in orofacial pain processing is largely unknown. The present study examined the effects of the selective elimination of isolectin B4 (IB4)-binding (IB4+) neurons on formalin-induced face rubbing behavior (FRB) in the upper lip of rats and c-Fos-immunoreactive (c-Fos-IR) cells in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc). These results indicate that IB4+ neurons in the trigeminal nerve play antinociceptive regulatory roles in formalin-induced orofacial pain processing and that GABA_A receptor functions at segmental and supratrigeminal sites have complex modulatory influences on antinociceptive roles.

研究分野：口腔顔面痛

キーワード：C線維 IB4 c-Fos

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は現在のところ発症メカニズムが解明されておらず、決定的治療薬の報告はない。申請者自身も日々の診療で、口腔顔面領域でみられる神経障害性疼痛は難治性で治療に長期間を有するため、メカニズムの解明と治療法の開発の必要性を実感している。

神経成長因子(NGF)やグリア由来神経活性因子(GDNF)を含む神経栄養因子は神経系の発達と成長に必須である。最近、神経栄養因子のGDNF familyの1つであるアルテミンの全身投与が坐骨神経結紮モデルラットのアロディニアや熱痛覚過敏を量依存的に正常化するという報告(Luis R Gardell, Nature, 2003)がある。また、神経栄養因子は神経損傷や病変に対して、神経の可塑性を制御し(M.H.Ossipov, Curr Pain Headache Rep, 2011)、脊髄内での軸索再生を促進するといわれている(Wang R, Nat Neurosci, 2008)。

脊髄後根神経節の小型細胞は神経栄養因子としてNGFに依存するものと、GDNFに依存するものの2種類に分けられる。前者は脊髄第層および第層の外側に入力し、TrkAを発現し、calcitonin gene-related peptide(CGRP)、サブスタンスP(SP)などのペプチドを産生するペプチド性線維である。後者は、脊髄後角第層の内側に入力し、RETを発現し、アデノシン3リン酸の受容体であるpurinergic receptor P2X3(P2X₃)をもつ非ペプチド性線維である。これはIB4に特異的に標識される。このように、これらペプチド性、非ペプチド性の2つの線維は個々の神経栄養因子に感受性を持ち、異なる機能を有している(Jason W, Brain Res, 2004)ことが認識されているが、侵害受容シグナルの機能的意義については明らかではない。

申請者はこれまで、「三叉神経節小型細胞のペプチド性線維と非ペプチド性線維の侵害受容における役割」を研究してきた。アルテミンを神経栄養因子とするP2X₃感受性神経の非ペプチド性線維を選択的削除したラットを用い、顔面領域でのホルマリン誘導侵害受容行動や、延髄後角尾側亜核(Vc)での侵害刺激誘導c-Fos発現(c-Fosは神経細胞活性化のマーカーとして広く使われており、痛み刺激によりc-Fos陽性細胞数から神経細胞の活動性を定量的に解析できる)の解析を行ってきた(H23~24 若手研究B)。その結果、侵害受容関連行動の増加とVcでのc-Fos発現が増加するという研究結果を得ている。

そこで今回、口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルを作製し、神経栄養因子のfamilyの1つであるアルテミンを投与し、侵害受容行動、Vcでのc-Fos発現、三叉神経節におけるアルテミン受容体GFR 3、CGRP、P2X₃発現を調べ、疼痛関連行動の回復、脊髄シナプス伝達、神経再生を明らかにすることを目的として本研究課題を申請するに至った。

2. 研究の目的

侵害受容C線維には、NGFに依存性のペプチド性C線維と、GDNFに依存性の非ペプチド性C線維がある。IB4結合能陽性ニューロンの侵害受容機能に関する研究は少なく、見解の一致には至っていない。本研究は、Vc領域におけるIB4結合能陽性ニューロンの機能的役割を調べるため、IB4-Saporinを大槽へ注入し、三叉神経のIB4陽性ニューロンを選択的に削除し、そして上口唇へのホルマリン誘導疼痛関連行動を観察し、Vcのc-Fos発現を観察した。加えて、ピククリン、ムシモルの全身投与からさらに検討した。

具体的な目的として、

(1) ペプチド性C線維と非ペプチド性C線維の2つのC線維の侵害受容様式を解明すること。

(2) 神経活動の指標としてc-Fos陽性細胞数を定量し脳内活動部位の同定と活性化の程度を解析すること。

(3) GABA受容体アンタゴニスト、アゴニストを投与することにより疼痛が制御されるのかを解明すること。

3. 研究の方法

(1) ペプチド性C線維および非ペプチド性C線維の選択的削除法の検討

実験動物はSD系ラット雄性、体重180~250gのものを使用する(体重250g以上であれば、ほぼ100%で手術は成功し、手術後の回復も良好である)。ペントバルビタール麻酔下、ラットを両耳道で固定し、実態顕微鏡下にて小脳延髄槽(大槽)へマイクロシリンジでIB4-Saporinを注入する。Saporinがリボソームを不活性化し、標的細胞を死滅させるメカニズムを利用する。in vitroでは72時間で細胞死に至ることが知られている。標的細胞体の周囲(Vcに近い大槽)にSaporinを投与し、延髄後角尾側亜核におけるIB4結合性ニューロンの削除を顕微鏡下で確認する。さらに、VcでのIB4陽性ニューロン、三叉神経節でのIB4陽性細胞体数を定量し、確実に死滅させていることを確認する。

(2) 急性痛みモデルとしてホルマリンテストによる疼痛関連行動の定量

ラットの顔面領域へのホルマリンテストを行っており、発痛物質(1~2%ホルマリン水溶液)を眼窩下神経領域(ラット上唇)に50μl注射し顔面こすり運動を測定し侵害受容反応を調べる。ホルマリン皮下注後に生じる疼痛行動は脊髄系と同様の2相性を示すことをこれまで報告した。皮下注直後から5分後の第1相、続く鎮静期、ホルマリン注射10分後から再度疼痛が再開し60分持続する第2相である。IB4-Saporin投与により非ペプチド性C線維を選択的削除させ、化学刺激性侵害受容(ホルマリン誘導疼痛関連行動)を調べる。

(3) 免疫組織化学法によるc-Fos陽性細胞

発現数の同定

ホルマリンテストの後、4%パラホルムアルデヒドによりラットを還流固定し、ミクロトームを使用し下位脳幹の連続横断切片を作成する。免疫組織化学法にて c-Fos 発現量を定量する。顕微鏡下で、中枢神経内のどの領域に c-Fos 陽性細胞が発現するかを調べることで、活性化される神経回路が特定できる。また c-Fos 陽性細胞数をカウントすることで特定領域の神経細胞の活動性を定量的に理解することができる。つまり、Vc での c-Fos 発現は 1 次中継核での 2 次ニューロンが活性化し、痛み応答が上位脳へ伝達している証拠となる。

(4) GABA 作動性薬物

ピククリン (GABA_A アンタゴニスト)、ムシモル (GABA_A アゴニスト) をホルマリンテストの 10 分前に腹腔内投与する。

4. 研究成果

(1) IB4 陽性反応は神経終末網のように灰色から黒色の神経網として観察された。ペプチド性 C 線維と非ペプチド性 C 線維の 2 つの C 線維の侵害受容様式を解明するため、ラットの小脳延髄槽に IB4-Saporin を投与し、非ペプチド性 C 線維を延髄後角尾側亜核 (Vc) 領域で選択的に削除できた (図 1)。

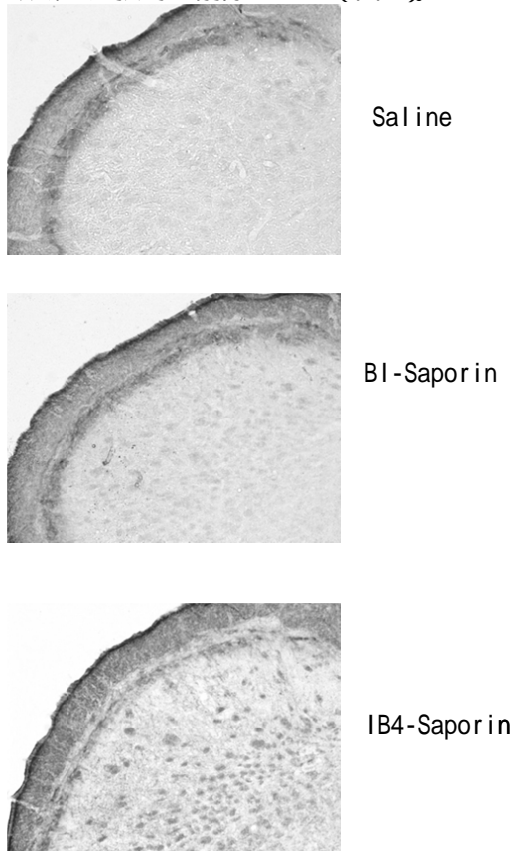


図 1: Vc における IB4 染色

(2) ラット上唇へのホルマリン注射による疼痛関連行動 (PRB) を調べた。また IB4-Saporin 処置ラットにおける PRB は有意に増加した (図 2)

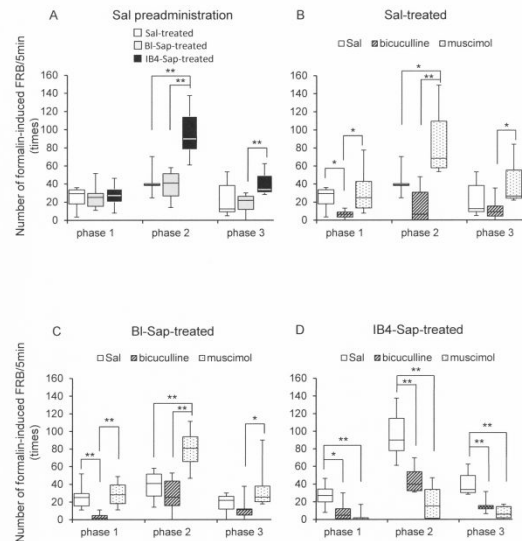


図 2: ホルマリン誘導 PRB

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$

Saline 全身前投与が A、Saline 前処置が B、BI-Saporin 前処置が C、IB4-Saporin 前処置が D に示す。

(3) 神経活動の指標として c-Fos を定量し脳内活動部位の同定と活性化の程度を解析した。結果、Vc の c-Fos 免疫陽性細胞は楕円から円形の核で標識され、標識細胞の多くは Vc の尾側 (門より 1.5-2.4mm 尾側) に分布し、Vc / 層の腹外側に分布した (図 3)。

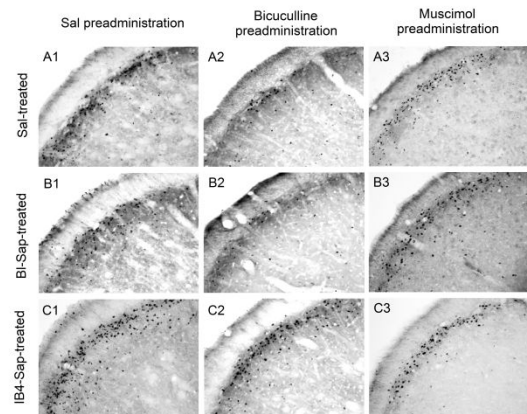


図 3: Vc における c-Fos 陽性細胞。Saline 全身前投与が A1、B1、C1 を示し、ピククリン全身前投与が A2、B2、C2 を示し、ムシモル全身前投与が A3、B3、C3 を示す。またそれぞれ、Saline 前処置が A1、A2、A3 を示し、BI-Saporin 前処置が B1、B2、B3 を示し、IB4-Saporin 前処置が C1、C2、C3 を示す。

IB4-Saporin 処置ラットの c-Fos 発現数はコントロールに比べて有意に増加した (図 4)。IB4-Saporin 処置ラットではピククリン前投与、ムシモル前投与で c-Fos 発現数は有意に減少した。

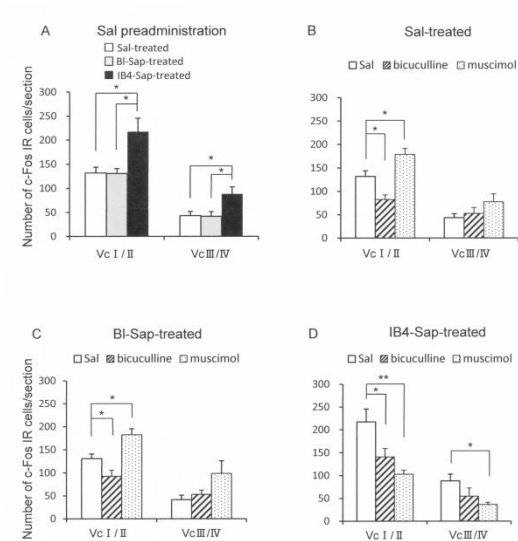


図 4：ホルマリンテスト後の Vc における c-Fos 陽性細胞数。

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)

Oyamaguchi A, Abe T, Sugiyo S, Niwa H, Takemura M. Selective elimination of isolectin B4-binding trigeminal neurons enhanced formalin-induced nocifensive behavior in the upper lip of rats and c-Fos expression in the trigeminal subnucleus caudalis. *Neurosci Res.* 103 (2016) 40-47.

6. 研究組織

(1)研究代表者

大山口藍子 (OYAMAGUCHI, AIKO)
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：70464237