

平成 30 年 8 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463062

研究課題名(和文)パーキンソン病モデルラットにおける口腔領域の痛覚過敏のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Neural mechanism underlying hyperalgesia response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats

研究代表者

丹羽 均 (Niwa, Hitoshi)

大阪大学・歯学研究科・教授

研究者番号：30218250

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)：パーキンソン病(PD)の口腔顔面領域の痛覚への影響をPDラットモデルを用い検討した。PDモデルラットの上口唇に4%ホルマリンを0.05mL注射し、疼痛関連行動と痛みの上行性神経路に関する各神経核(三叉神経脊髄路核、視床下部室傍核、橋の結合腕傍核)と、下行性疼痛抑制系に関する各神経核(中脳水道周囲灰白質、青斑核、大縫線核)におけるc-Fos陽性細胞の数をカウントした。

その結果、視床下部室傍核における大細胞群では、対照群に比べてFos陽性細胞数が有意に少なかった。ドパミンの枯渇によって視床下部室傍核の活動が変化し、内側脊髄視床路やオキシトシンを介する鎮痛効果に影響が及んだ可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The effect of Parkinson's disease (PD) on pain sensation in the oral facial area was examined using PD model rats, which were produced by the unilateral injection of 6-OHDA into the medial forebrain bundle. PD model rats were injected with 0.05 mL of 4% formalin into the upper lip. The expression of c-Fos in trigeminal spinal nucleus caudalis (Vc), hypothalamic paraventricular nucleus (PVN), parabrachial nucleus (PBN), periaqueductal gray (PAG), nucleus locus ceruleus (LC), and nucleus raphe magnus (NRM) were explored.

As a result, the number of c-Fos positive cells was significantly smaller in the large cell group in PVN than in the control group. The PVN is an important source of brain oxytocin. The depletion of dopamine may cause the change of the activity of the PVN, which may have influenced the analgesic effects mediated by oxytocin.

研究分野：orofacial pain

キーワード：Parkinson's disease orofacial pain formalin test pain related behavior

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病(PD)は、黒質神経細胞の進行性の変性によりドパミンの産生が減少する疾患で、65歳以上の高齢者の1~2%に見られる。典型的な症例では振戦、固縮、無動、姿勢反射障害などの運動障害を呈する。一方、近年、PD患者における非運動障害が注目され、中でもPD患者の8割以上が経験する「痛み」は、QOLに直接関係するため関心が高まっている。

われわれは歯科臨床の経験からPD患者は口腔領域の痛みに対する反応性が低下しているとの印象を持っていた。しかし、PDモデルラットを用いたわれわれの研究(Maegawa H. et al. Neural mechanism underlying hyperalgesic response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats. *Neurosci Res.* 2015;96:59-68)では、口腔領域は痛覚過敏状態にあることが示された。臨床で観察された反応性の低下は、PDによる運動や認知機能障害のためであると考えられた。しかし痛覚過敏が発生するメカニズムについては、全く解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PDにおける口腔顔面領域の痛覚過敏のメカニズムを解明するため、黒質細胞を破壊して作製した片側PDモデルラットを用い、黒質線条体系のドパミンの枯渇が、痛みの上行性神経路と下行性抑制系に及ぼす影響を検討することである。そのため痛みの上行性神経路関係する各神経核である三叉神経脊髄路核(Vc)、視床後内側腹側核(VPM)、視床下部室傍核(PVN)、橋の結合腕傍核(PBN)、および痛みの下行性抑制系を構成する神経核である中脳水道中心灰白質(PAG)の腹外側・外側部、青班核(CN)、縫線核(大縫線核:MRN、背側縫線核)の痛覚の認知機構に対しPDがどのような影響を及ぼすかについて免疫組織学的手法(Fos mapping)を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) PDモデルラットの作製

7週齢の雄性Wistar系ラットをペントバルビタール麻酔下(50mg/kg, i.p.)に脳定位固定装置(Narishige)に固定し、頭蓋骨を露出させ、左側内側前脳束に6-ヒドロキシドパミン(6-OHDA, Sigma)を注入した(Deumens, R. et al. *Exp. Neurol.* 175, 303-317, 2002)。

6-OHDAを注入してから2週間後、ラットを直径30cmの円筒容器に入れ、メタンフェタミン(3mg/kg, i.p., 大日本住友製薬)の投与によって誘発される回転運動を観察した。回転運動はメタンフェタミン投与後60分間観察し、6-OHDA注入側への回転数が平均毎分7回以上のもをPDモデル群として実験に使用した。

同様に内側前脳束に生理食塩水を注入し

たラットを対照群とした。

(2) ホルマリンテスト

口腔顔面領域の痛覚への影響を調べるため、6-OHDAまたは生食を注入してから3週間後のラットの上口唇に4%ホルマリン0.05mlを皮下注射し、炎症性疼痛を誘発した(ホルマリンテスト)。注射後の顔面こすり運動などの疼痛関連行動(PRB)を60分間、観察し、PRBの回数をカウントした。

(3) 免疫組織科学的分析

ホルマリンテストの2時間後、ラットの脳をペントバルビタール深麻酔下に灌流固定し、凍結連続横断脳切片を作製した。その後、すべてのラットの線条体と黒質についてチロシンヒドロキシラーゼ(tyrosine hydroxylase; TH)による免疫組織化学的染色を行い、PDモデル群では左側の黒質線条体系が破壊されていることを確認した。

また、痛みの上行性神経路に関する各神経核(Vc, PVN, PBN)、および下行性疼痛抑制系を構成する各神経核(PAG, LC, NRM)に対してc-Fosの免疫組織化学的染色を行い、c-Fos陽性細胞の数をカウントし、対照群と比較した(Tassorelli, C. et al. Behavioral responses and Fos activation following painful stimuli in a rodent model of Parkinson's disease. *Brain Res.* 1176, 53-61, 2007; Reyes, S. et al. Patterns of FOS expression in the spinal cord and periaqueductal grey matter of 6OHDA-lesioned rats. *Int. J. Neurosci.* 118, 1053-1079, 2008)。

4. 研究成果

(1) 6-OHDA注入のTH免疫反応性に対する効果

PDモデル群では、6-OHDA投与側の黒質と線条体において、TH免疫反応性の著明な低下が認められた。一方、PDモデル群の6-OHDA非投与側ではTH免疫反応性の低下は認められず、同様に、対照群においては両側共にTH免疫反応性の低下は認められなかった(Fig.1)。

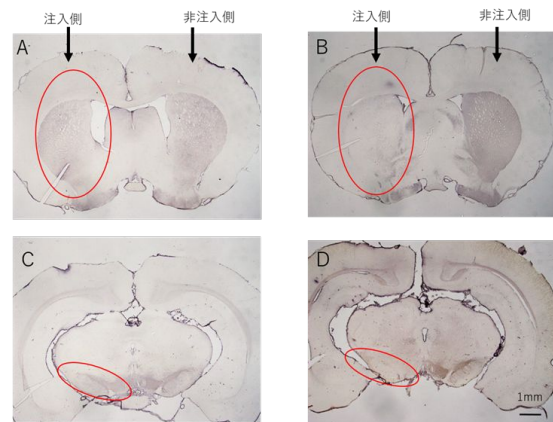


Fig.1 生理食塩水を注入した対照群の線条体(A)と黒質(c)、6-OHDAを注入したPDモデル群の線条体(B)と黒質(D)を示

す。

(2) ホルマリンテストによる顔面こすり運動と Vc における c-Fos 免疫組織化学的検討

対照群と比較して PD モデル群では、ホルマリンテスト後 60 分間の顔面こすり行動が有意に増加した。また、Vc 表層に発現した c-Fos 免疫陽性細胞数は、PD モデル群で有意に多く発現していた。これらの結果から、前回の報告と同様に PD モデル群の口腔顔面領域は痛覚過敏の状態になっていることが確認できた。

(3) 痛みの上行性神経路および下行性疼痛抑制系に関する各神経核における c-Fos 免疫組織化学的染色

痛みの上行性神経路に関する領域として PVN、PBN を、下行性疼痛抑制系に関する領域として PAG、LC、NRM を対象とし、c-Fos の免疫組織化学的染色を行った。

PVN においては、その領域を大細胞領域と小細胞領域の 2 領域に分けて検討した。大細胞領域においては、生理食塩水群に比べて PD モデル群の方が c-Fos 陽性細胞数が有意に減少していた (Fig. 2, 3)。

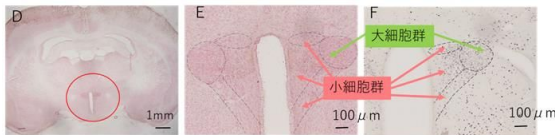


Fig.2 PVN の顕微鏡写真、D、E は Neutral red 染色 (D: 弱拡大、E: 強拡大)、F は c-Fos 免疫染色

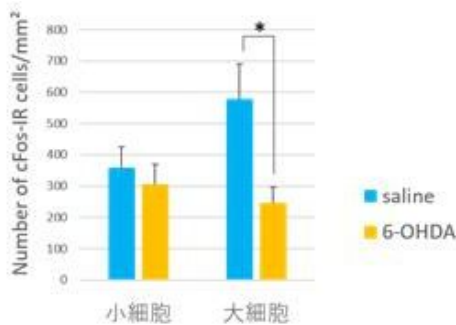


Fig.3 PVN に発現した c-Fos 細胞数密度 (平均 ± 標準誤差/切片)

PBN においては、その領域を外側 (LPB) と内側 (MPB) の 2 領域に分けて検討したが、PD モデル群と対照群で差は認められなかった (Fig. 4)。

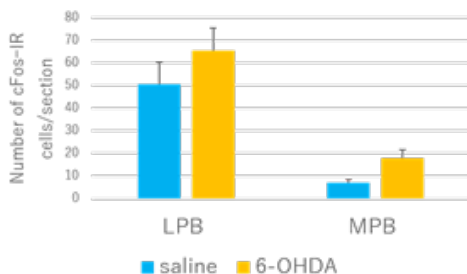


Fig.4 PBN に発現した c-Fos 発現細胞数 (平均 ± 標準誤差/切片)

PAG においてはその領域を背側 (DMPAG)、背外側 (DLPAG)、外側 (LPAG)、腹外側 (VLPAG) の 4 領域に分けて検討した。PD モデル群と対照群の間で有意差は認められなかった (Fig. 5, 6)。

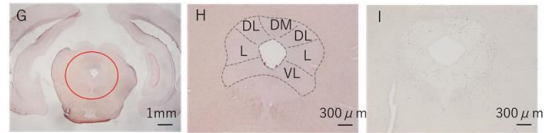


Fig.5 PAG の顕微鏡写真 G、H は Neutral red 染色 (G: 弱拡大、H: 強拡大)、I は c-Fos 免疫染色

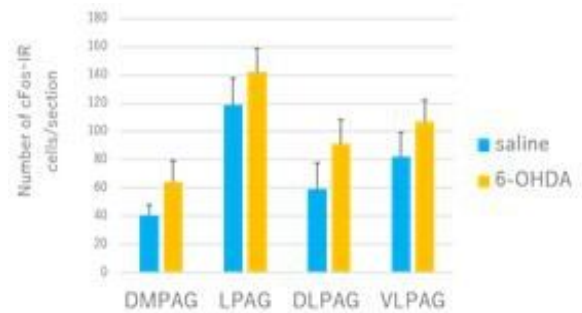


Fig.6 PAG に発現した c-Fos 細胞数密度 (平均 ± 標準誤差/切片)

LC および NRM でも PD モデル群と対照群で有意差は認められなかった (Fig 7, 8)。

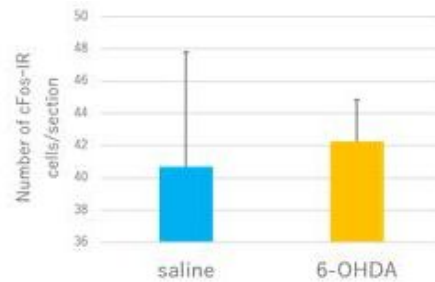


Fig.7 LC に発現した c-Fos 細胞数密度 (平均 ± 標準誤差/切片)

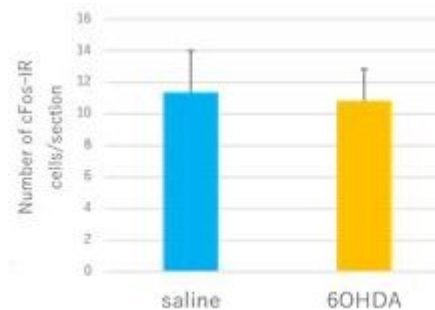


Fig.8 NRM に発現した c-Fos 細胞数密度 (平均 ± 標準誤差/切片)

6-OHDA の内側前脳束への注入により作製された PD モデルラットでは、上口唇へのホルマリンテストにより、対照群と比較して、PRB の増加と Vc における c-Fos 陽性細胞数の増加が観察された。これらの所見は PD モデルラットの口腔顔面領域が痛覚過敏状態となっていることを示している。そこで、PD モデルラットにおいて、痛みの上行性経路と下行性抑制系に関係する各神経核がどのような影響を受けているかを検討するため、ホルマリンテストに対する c-Fos 陽性細胞数を検討した。

その結果、PD モデル群と対照群の間で有意差がついたのは、PVN の大細胞領域のみであった。一方、下行性抑制系の神経核に、影響は認められなかった。PVN は痛みの上行性経路のうち、情動的側面に関係する内側脊髄視床路を構成する核の一つである。また、PVN における大細胞群は鎮痛作用を持つオキシトシンの合成・分泌細胞群であり、侵害刺激が生じると、A1 細胞群が興奮し、PVN では同部位からの投射を受け、PVN からオキシトシンの分泌が促進されるという報告がある (Onaka T. et al. Medullary A1 noradrenergic neurons may mediate oxytocin release after noxious stimuli. Neuroreport. 2001; 12(11): 2499-502)。PD モデルラットの口腔顔面領域において痛覚過敏状態になっていることと、ホルマリンテスト後で PD モデルラットの方が対照群より PVN (大細胞) での c-Fos 陽性細胞数が有意に減少したという今回の結果に対する考察として、ドパミンの枯渇によって PVN の活動が変化し、内側脊髄視床路やオキシトシンを介する鎮痛効果に影響が及ぼされた可能性が考えられる。

今後、PD モデルラットの PVN におけるオキシトシンの動態について検討していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

パーキンソン病モデルラットにおける痛覚過敏のメカニズムの検討、足立奈由香、前川博治、河野彰代、成清綾、林正祐、岸本沙樹、丹羽均、第 45 回日本歯科麻酔学会、2017 年、松本市。

6. 研究組織

(1)研究代表者

丹羽 均 (NIWA Hitoshi)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：30218250

(2)研究分担者

前川 博治 (MAEGAWA Hiroharu)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：10711012

杉村 光隆 (SUGIMURA Mitsutaka)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90244954

浜田 尚香 (HAMADA Naoka)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70762558