

令和元年6月17日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19772

研究課題名(和文) 三叉神経節の神経-免疫系をターゲットとした顎顔面痛覚異常の病態解明と治療法の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the pathology of maxillofacial analgesia targeting the nerve-immune system of trigeminal ganglion and development of therapeutic method

研究代表者

後藤 哲哉 (Goto, Tetsuya)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：70253458

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)：三叉神経内の神経細胞と免疫系細胞の相互作用を調べるために、マウスの上顎神経を結紮して三叉神経節におけるマクロファージ様細胞の経時的な動態を調べた。神経細胞傷害後、常在性のIba-1標識マクロファージ様細胞の増加が認められ、細胞体は活性化状態を示した。この活性化したマクロファージ様細胞はその後神経細胞に近づき、神経細胞周囲の衛星細胞の間に割り込んで神経細胞に接触し、最終的には神経細胞を囲む様になった。三叉神経節内の神経細胞は以前より神経原性炎症への関与が知られているが、その働きが免疫系のマクロファージ様細胞によって調節を受けるという神経-免疫系のシステムが三叉神経節に存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三叉神経は主に頭頸部の痛覚の伝導に関与するが、一方では三叉神経節内の一次ニューロンはサブスタンスPなどの神経ペプチドを産生し、傷害を受けた部位に逆行性に放出することにより血管透過性等を調節し、炎症のモジュレーターとして働く。今回の研究では、その三叉神経節内の神経細胞の働きが三叉神経節内の免疫系のマクロファージ様細胞によって調節を受けていることを示すものである。これらの結果は体表の障害は末梢の神経節レベルの神経-免疫系システムで対応していることを示すものであり、今後、この防御機構が破綻したアトピー性皮膚炎などの治療法の開発に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate the interaction between neurons in the trigeminal nerve and cells in the immune system, the maxillary nerve of the mouse was ligated to examine the dynamics of macrophage-like cells in the trigeminal ganglia. After nerve cell injury, an increase in resident Iba-1 labeled macrophage-like cells were observed, and the cell body showed an activated state. The activated macrophage-like cells then migrated to the nerve cells, and squeezed between satellite cells surrounding the nerve cells to contact the nerve cells and eventually to surround the nerve cells. It has been known that neurons in the trigeminal nerve have been involved in neurogenic inflammation, but the neuro-immune system is supposed to exist in the trigeminal ganglion, its function is regulated by the interaction between trigeminal neuron and macrophage-like cells in the immune system.

研究分野：口腔組織学

キーワード：三叉神経節 神経細胞 マクロファージ 神経免疫系 神経原性炎症 神経ペプチド

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

顎顔面領域の痛覚異状には慢性疼痛、痛覚過敏、異所性疼痛などがあり、原因が明確でないため治療法も定まっていない。異所性疼痛に関しては、トリガーポイントは一般には発痛点を示すが、顎顔面領域においては咬筋や側頭筋を刺激すると上顎臼歯などで異所性疼痛を生じることを示す。咬筋筋膜は下顎神経支配であり上顎臼歯は上顎神経で、いずれも一次ニューロンの神経細胞体は三叉神経節に存在するが、直接的なコンタクトや介在ニューロンは存在しない(図1)。

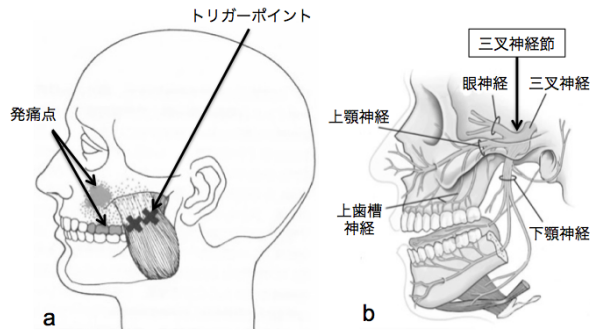


図1. 三叉神経のトリガーポイントと発痛点(a), および三叉神経節(b).

我々は、抜歯モデルで、三叉神経節内において上顎神経と下顎神経のクロストークがあることを見出したが (Goto et al. J Physiol Sci, 2016) そのメカニズムは良くわかっていない。今回、我々は三叉神経節内の神経細胞が侵害刺激を受けると、マクロファージ様細胞が三叉神経節内で増加し活性化することを見出した (図2)。このマクロファージ様細胞は形態的にはミクログリア様形態をしており、非炎症性の免疫反応が侵害刺激を生じたニューロンによって引き起こされた、つまり、神経-免疫系の反応が三叉神経節内で生じたと考えられた。

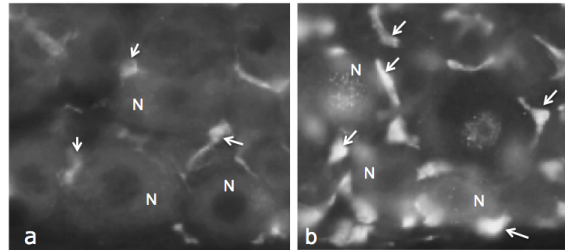


図2. マクロファージ様細胞(矢印)の侵害刺激前(a)、後(b)の変化. N:神経細胞の核.

以前の研究で、三叉神経節内の神経細胞のうちC線維を有する神経細胞は侵害刺激を受けるとサブスタンスP(SP)やCGRP

を産生し侵害刺激を受けた部位に逆行性に運ばれて放出されることが報告されている。SPは血管透過性を亢進し、炎症のメディエーターとして働く。これらのことより、末梢神経の1次ニューロンおよび末梢の神経節レベルで神経と免疫系が相互作用していることが考えられた。

2. 研究の目的

(1) 三叉神経節内での神経細胞による免疫系細胞の誘導、ならびに活性化メカニズムを解明し、(2) 活性化した免疫系細胞による神経細胞への影響を解明することである。これらが解明されれば、三叉神経節内でも神経-免疫系が働く意義が明らかになり、顎顔面の痛覚異状の治療の新たなターゲットとして大いに役立つことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経節内での神経細胞分布の三次元解析

①三叉神経節内での神経細胞分布を正確に調べるために、組織透明化を行い、標識した神経細胞の3次元分布を調べた。透明化としてAdvanced CUBIC、ScaleS、改変3DISCOの三種類を試み、逆行性トレーサーとしてFastblue (FB)を第1枝の末梢である上眼瞼、角膜、第2枝の末梢である眼窩下神経、口蓋、上顎臼歯歯髄(V2M)、第3枝の末梢である咬筋(MM)、下顎臼歯歯髄(V3M)、舌へ注入した。

Zeissの共焦点レーザー顕微鏡にて得られたスタック画像をニューロルシダで三次元再構築した。その後、各データを補正し、均一化したモデルTGへ投影し、各領域分布の重なりを

解析した。

(2) 三叉神経節内での非炎症性反応の生じるメカニズムの解明

①マウスの三叉神経のうち上顎神経を結紮し、三叉神経節内でのマクロファージ様細胞の増殖、分化等の動態の変化を継時的に調べた。マウスの上顎神経を結紮後、Iba1 陽性のマクロファージ様細胞の数の変化、大きさの変化を、3、5、7、14 日後に調べた。

②マクロファージ様細胞が血管由来か常在性のものかを調べるためにGFP遺伝子導入マウスの骨髄を移植して調べた。頭部以外の部分に放射線を照射し一旦骨髄幹細胞を死滅させたのち、GFP遺伝子導入マウスの骨髄を移植した。その後、上顎神経を結紮し三叉神経節でのIba1 陽性マクロファージ用細胞ならびにGFP陽性細胞の動態を調べた。

③マクロファージ様細胞の神経細胞への影響について、ニューロロシダを用いた三次元再構築で求めた。三叉神経節の神経細胞にコンタクトするマクロファージ様細胞について三次元再構築を行なった。

4. 研究成果

(1) 三叉神経節内での神経細胞分布の三次元分布

試行した透明化の方法では、改変3DISCOが最適であった(図3)。透明化後もFB蛍光は残存し、深度500µmまで観察可能であった。本手法ではサンプル収縮を認めたが、細胞体の位置関係は保たれた。

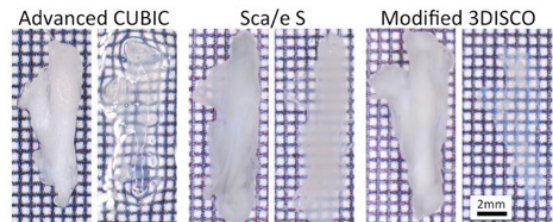


図3 三叉神経節の組織透明化

三叉神経節内での神経細胞分布の三次元

分布を調べた結果、舌に投射している神経細胞の細胞体は下顎神経領域のみならず一部は上顎神経領域にまで分布していた(図4)。舌では舌痛症というのがあり、不定愁訴として考えられることが多いが、舌に分布する神経細胞体が比較的広く分布していることも原因なの

かもしれない。三叉神経節内で神経細胞体が近接すれば異所性疼痛を感じることもどうかはまだ明らかでないが、少なくとも神経系の多くの部位で認められる体部位局在を考えると近接部位で何らかの協調的な相互作用があると考えられた。

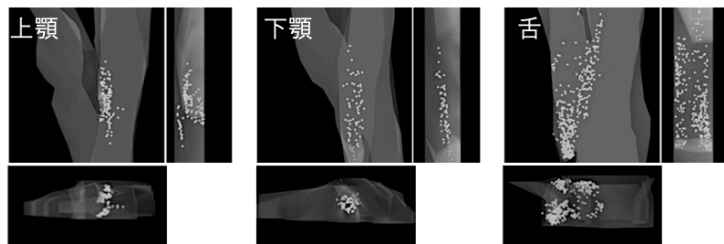


図4 三叉神経節内の上顎歯、下顎歯、舌に投射する神経細胞体の位置。正面、側面、底面からみた分布。

(2) 三叉神経節内での免疫系マクロファージ様細胞の動態

上顎神経結紮後マクロファージ様細胞の数は結紮後3日ごろから増加をし始め5、7日目でピークに達した。マクロファージ様細胞はその後ATF3陽性神経細胞(傷害を受けた神経細胞)の方に遊走して行き神経細胞の周囲で神経細胞を取り囲んでいる衛星細胞と衛星細胞の間に

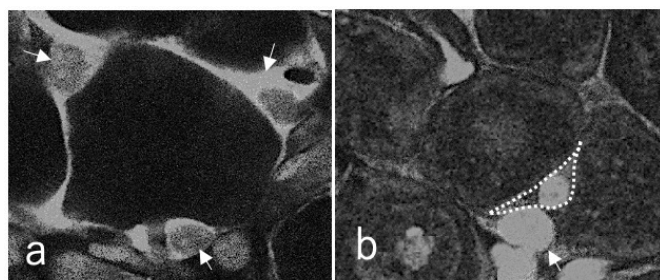


図5 三叉神経節神経細胞、衛星細胞(矢印)の正常像(a)と侵害刺激後(b)。侵害刺激後には神経細胞にマクロファージ様細胞が接する(破線)。

入り込み神経細胞へ直接コンタクトする像が観察された（図5）。

このマクロファージ様細胞が傷害後血管から遊走してきたものか、在来性のマクロファージ様細胞が細胞分裂したのかを調べるためにGFP遺伝子導入マウスの骨髄を移植して調べた結果、ほとんどの細胞はGFP陰性であった。また、BrdUでマクロファージ細胞の増殖を調べた結果でも、結紮後2、3日でBrdU陽性のマクロファージ様細胞の増加が認められた。これらの結果より、三叉神経節の神経細胞は侵害刺激を受けると直接もしくは衛星細胞を介して間接的にマクロファージ様細胞に対して何らかのケモカインを放出して細胞増殖ならびに神経細胞への遊走を促進することが示された。

このマクロファージ様細胞の動態をさらに調べるためにニューロルシダを使い三次元再構築を行なった。その結果、マクロファージ様細胞は神経細胞が侵害刺激を受ける前は細胞体が小さく細長い突起を持つ構造をしていたが、侵害刺激を受けた後は細胞体は次第に大きくなった。その後衛星細胞の間から割って入り神経細胞と衛星細胞の間に入りこんだ。最終的には1個の侵害刺激を受けた神経細胞に対して複数個のマクロファージ様細胞がコンタクトしている像が確認された。

さらにこれら活性化したマクロファージ様細胞が細胞傷害型か細胞保護型かを調べるためにそれぞれのマーカーである抗CD68抗体、抗CD206抗体を使って調べたところ、活性化したマクロファージ様細胞はほとんど細胞保護型のCD206陽性細胞であった。

これらの結果をまとめると、三叉神経節の神経-免疫系システムは、①無髄のC線維神経終末が侵害刺激を受けると三叉神経節内の神経細胞体に伝わり、②SPやCGRP産生を増加させ、③神経細胞体から直接的、もしくは衛星細胞を介して間接的にサイトカインを放出し、④マクロファージ様細胞を増殖さらには活性化させる。⑤活性化したマクロファージ様細胞は傷害を受けた神経細胞に接近し、衛星細胞の間に割り込む様にコンタクトする。⑥複数の活性化したマクロファージ様細胞が神経を取り囲み神経保護的に働く⑦C線維を有する神経細胞はSP、CGRPを産生し、これらは逆行性に傷害部位へ運ばれ放出される、⑧放出されたSP、CGRPは血管透過性の亢進と血管の拡張を行い炎症症状を強める（図6）。神経-免疫系システムはまさに生体防御の最前線で行われる防御システムであり、三叉神経節では上顎神経、下顎神経の様に離れた部位でもマクロファージ様細胞やそれらから放出されるサイトカインによって、防御システムが広くバランスを取る様に三叉神経内で行われているものと思われる。

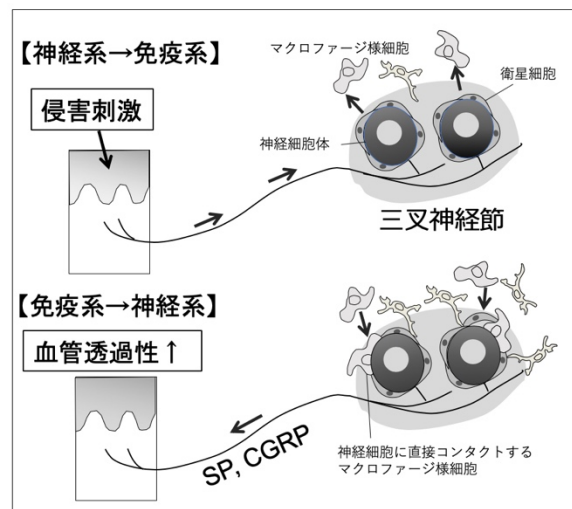


図6 三叉神経が末梢で侵害刺激を受けると三叉神経節内のマクロファージ様細胞の増殖・遊走が生じる（上段）。その後マクロファージ様細胞は神経細胞に直接コンタクトし、神経細胞のSP、CGRPの産生が増加する（下段）。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 2件）

1. 後藤哲哉、岩井治樹、倉本恵梨子、山中淳之. 三叉神経節における神経-免疫系システム. 別冊BioClinica 8, 2019: 137-142. (査読なし)
2. Goto T, Iwai H, Kuramoto E, Yamanaka A. Neuropeptides and ATP signaling in the

trigeminal ganglion. Jpn Dent Sci Rev. 53, 2017: 117-124. 10.1016/j.jdsr.2017.01.003.

(査読あり)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 岩井治樹、アシスダール、倉本恵梨子、後藤哲哉。三叉神経の組織常在性マクロファージ様細胞は神経損傷によって一次神経細胞に接触する。第12回三叉神経領域の感覚-運動統合機能研究会, 2018年、勝浦市。
2. 岩井 治樹, 倉本恵梨子, ダール アシス, 山中 淳之, 後藤 哲哉。マウス三叉神経節の M2 型組織常在性マクロファージ様細胞は末梢神経傷害によって増殖・活性化する。第60回歯科基礎医学会学術大会, 2018年、福岡市。
3. 千堂 良造, 杉村 光隆, 糀谷 淳, 眞鍋 庸三, 山形 和彰, 山下 薫, 後藤 哲哉。ラット三叉神経節における組織透明化の応用と細胞体局在の検討。第23回日本口腔顔面痛学会学術大会, 2018年、北九州市。
4. 岩井治樹、倉本恵梨子、山中淳之、Ashis Dhar、後藤哲哉。マウス三叉神経節のマクロファージ様細胞は神経傷害によって増殖・活性化する。第59回歯科基礎医学会, 2017年、松本市。

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：原 博満

ローマ字氏名：(HARA, Hiromitsu)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：教授

研究者番号 (8桁)：20392079

研究協力者氏名：八坂 敏一

ローマ字氏名：(YASAKA, Toshiharu)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：医歯学域医学系

職名：准教授

研究者番号 (8桁)：20568365

(2) 研究協力者

研究協力者なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。