

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11057

研究課題名(和文) 神経損傷に伴う神経再生および神経障害性疼痛発症の分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of nerve regeneration and sensory disorder following axonal injury

研究代表者

近藤 真啓 (KONDO, Masahiro)

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：50312294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの下歯槽神経完全切断モデルを確立し、形態・機能的な再生過程について解析した。軸索切断2週間以内に少なくとも一部のC線維は適切な受容野に向けて軸索の伸展を開始していること、非ペプチド作動性ニューロンと比較してペプチド作動性ニューロンでより神経化学的な軸索再生が起こりやすいことを見出した。一方、侵害刺激に対する逃避反射閾値の回復は損傷後2週間では不完全であり、かつ侵害刺激により活性化される二次ニューロンまたは介在ニューロンの脳内分布に変調が起きていることを明らかにした。さらに、軸索損傷による逃避反射閾値の上昇と延髄内のE-cadherin発現量の変調との間に負の相関があることを見出した。

研究成果の概要(英文)：To study each process of anatomical, neurochemical and physiological regeneration after nerve injury, we developed a model of complete IAN transection (IANX) in mice. A subset of small TG neurons, i.e. C afferents, had re-innervated their appropriate receptive field within 2 weeks post-axotomy, and the peptidergic neurons regenerate more efficiently compared to non-peptidergic neurons after trigeminal nerve injury. On the other hand, head-withdrawal threshold (HWT) to noxious heat or pinch stimulation began to return toward basal level on day 14 after IANX, but did not recover completely. The distribution pattern of pinch stimuli-induced pERK-IR cells, i.e. second order neurons and/or interneurons, was altered in Vc at 2 weeks after IANX. We also found that the reduction in E-cadherin expression in Vc is correlated with increase of HWT to noxious stimuli after IANX.

研究分野：神経科学

キーワード：軸索損傷 神経回路 下歯槽神経 三叉神経脊髄路核 ERK

1. 研究開始当初の背景

感覚神経は大きく分けて3種類(A・A・C線維)に分類される。さらにC線維は、ペプチド作動性 [CGRP]・非ペプチド作動性 [IB4] 線維に細分類することができる。

外傷などによりこれらの末梢神経の軸索が損傷を受けると、痛覚鈍麻や神経障害性疼痛などの種々の感覚障害が生じる。また、障害後の軸索突起の再生は、障害を受けた神経線維の種類や部位、障害の程度によって異なることが知られている。しかし、「損傷した各種軸索の再生過程」「感覚機能の治癒過程」および「軸索再生(修復)後の感覚回路の状態」について同一のモデル動物内における統合的な解析は行われていなかった。さらに、再生過程や治癒過程に関わる責任分子についての情報も不十分であった。

坐骨神経の損傷モデル動物の脊髄後角において、細胞接着分子 E-cadherin の発現量が減少すること、また E-cadherin の発現量は、神経軸索の再生に関与するグリア由来の栄養因子により一部制御されていることが Huntley らのグループにより報告され、軸索再生における細胞接着分子の関与が浮上し始めていた。我々は予備実験において、三叉神経節(TG)ニューロンの細胞体周囲および延髄三叉神経脊髄路核(Vc)の表層(口腔領域の感覚情報が入力する脳領域)において E-cadherin および N-cadherin が特徴的な発現分布を示すことを見出していた。

一方我々は、ラットの臼歯に侵害性圧刺激を加えると、Vc 表層に存在し侵害情報の伝達に関与するニューロン群において Extracellular Signal-regulated Kinase (ERK) のリン酸化が起こり、これが痛覚に関連する FOS 蛋白の発現を制御していることを見出していた(Hasegawa et al, 2012)。この結果は、神経損傷後の侵害情報伝達に関わる神経回路の再生過程の可視化に ERK のリン酸化が利用可能であることを示唆していた。

2. 研究の目的

マウスを用いて下歯槽神経の完全切断モデル(IANX)を作製し、神経損傷後に生じる二種類の神経軸索(ペプチド作動性および非ペプチド作動性線維)の再生過程、侵害情報(侵害性機械感覚および熱感覚)の受容、およびその情報伝達に関わる神経回路の回復過程を同一モデル動物内で明らかにすると同時に、神経損傷に伴う E-cadherin (および N-cadherin) の発現量および発現分布の経日的変化を解析して、その変化が損傷を受けた感覚神経の形態的および機能的な再生治癒過程に及ぼす影響について解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 2%イソフルランの浅麻酔下において、マウスの左側下歯槽神経軸索の末梢側完全切断(IANX)を行い、神経損傷モデルを作製した。そして、オトガイ部に熱または侵害性機械刺激を与えた際に生じる逃避反射閾値(HWT)を経日的に計測した。

(2) IANX 動物のオトガイ部皮下に逆行性トレーサー(Fluoro-Gold[FG])を注入した後、経日的に TG を摘出し、FG で標識される細胞の数を計測した。

(3) IANX 動物から経日的に TG および延髄を摘出し、CGRP 免疫活性および IB4 結合性の変化を免疫組織化学的に定量的かつ定性的に解析した。また、E-cadherin および N-cadherin 免疫活性の経日的な発現変動について併せて解析した。

(4) IANX 動物のオトガイ部に熱または侵害性機械刺激を与えた際に Vc 領域内の細胞において生じる ERK のリン酸化を免疫組織化学的に解析した。

(5) IANX 直後に Vc 領域へ GDNF を単回投与し、その2週間後に E-cadherin の発現量を免疫組織化学的に解析すると同時に、侵害刺激により生じる逃避反射閾値の変化を併せて解析した。

4. 研究成果

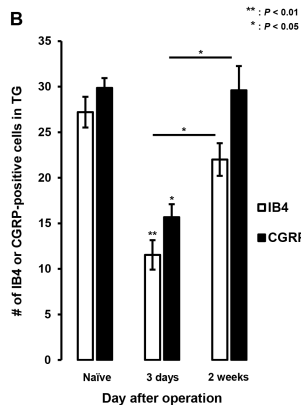
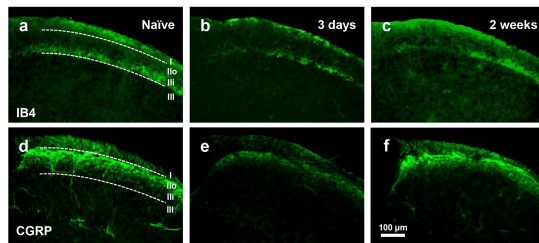
(1) IANX 3日後、侵害性機械または熱刺激に対する HWT の顕著な上昇(感覚消失)が認められ、その上昇は1週間後まで続いた。IANX 後2週が経過すると反射閾値が回復傾向(1.5~1.7倍の刺激で反射が出現)を示したが、正常な閾値には至らず、IANX 4週間後まで痛覚鈍麻が持続した。

(2) IANX 3日後、Naïve 群と比較して実験群における FG 標識 TG ニューロンがほぼ消失した。IANX 2週間後には、FG 標識 TG ニューロンが再度出現し、その分布は Naïve 群と同様、TG 三叉神経第三枝領域に局限した。

(3) IANX 3日後、TG における CGRP (ペプチド作動性ニューロン) および IB4 (非ペプチド作動性ニューロン) 陽性細胞数は Naïve 群と比較して有意に減少したが、IANX 2週間後には Naïve 群と同程度まで回復した。

一方、Vc 領域では、IANX 3日後、CGRP-IR、IB4 結合性の顕著な減少が観察され、IANX 2週間後、CGRP-IR は Naïve 群と同程度まで回復

した。これに対して、IB4 結合性は三叉神経第3枝の投射領域において有意に減少したままであった。



Naive 群において、E-cadherin は Vc 領域の II 層に局限して発現、IB4 と共存し、CGRP とは共存しなかった。これに対して、N-cadherin の免疫活性は Vc 領域の II/III 層で広範に認められた。IANX 1 週後、患側の Vc 内において E-cadherin および IB4 の免疫活性が有意に減少し、これは IANX 4 週後まで持続した。一方、N-cadherin の免疫活性には有意な変化が認められなかった。

(4) Vc 領域における侵害性機械および熱刺激に依存的な pERK-IR 細胞の数は IANX 3 日後、有意に減少し、IANX 2 週後に回復傾向を示した。この際、機械刺激依存性 pERK 陽性細胞の分布のピークが obex -180 μm の高さにシフトしたが、IB4 陽性領域内に局限することを見出した。一方、IANX 2 週後の熱刺激依存性 pERK 陽性細胞は IB4 陰性領域内で検出され、その数は Naive 群と比較して有意差は認められなかった。以上の結果は、IANX により軸索損傷した感覚ニューロンは IANX 2 週後には侵害情報を中枢へと伝達する能力を回復していること、また、機械感覚受容神経の神経回路は、修復過程で一部修飾を受ける可能性があることを示唆している。

(5) Vc 領域への GDNF の単回投与は、神経損傷に伴う E-cadherin 発現の減少を救済できなかった。また、GDNF 投与量を段階的に変化させても E-cadherin 発現の有意な増加は認められなかった。また、HWT についても有意な変化が認められず、痛覚鈍麻の状態が継続した。

以上の結果から、マウスの下歯槽神経軸索完全損傷モデルにおいて、IANX 後 2 週で C 線維の少なくとも一部は適切な受容野に向けて軸索突起の再生を開始していること、非ペプチド作動性ニューロンと比較してペプチド作動性ニューロンにおいてより軸索再生が起こりやすいことが明らかになった。

これに対して、侵害刺激に対する逃避反射閾値の回復は、機械刺激・熱刺激ともに IANX 後 2 週では不完全であることを見出した。同時期 (IANX 2 週後) において、侵害刺激により ERK のリン酸化が誘導される二次ニューロン (または介在ニューロン) の脳内分布に変調が起きており、このことが、侵害反射閾値が完全には回復しない原因である可能性が示された。また、IANX 4 週後まで Vc 領域における E-cadherin の発現量は減少したままで、GDNF 投与により、発現量および逃避反射閾値のいずれも救済できなかった。神経損傷に伴う感覚機能障害への E-cadherin の関与については、今後さらなる検証をおこなっていきたい。

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2件)

Suzuki T, Kondo M, Shibuta I, Nagashima H, Sugano N, Sato S, Iwata K. Medullary neural circuit regeneration after trigeminal nerve transection. Journal of Oral Science, in press (査読有)

Honda K, Shinoda M, Kondo M, Shimizu K, Yonemoto H, Otsuki K, Akasaka R, Furukawa A, Iwata K. Sensitization of TRPV1 and TRPA1 via peripheral mGluR5 signaling contributes to thermal and mechanical hypersensitivity. Pain. 2017, 158(9): 1754-1764. (査読有)

DOI: 10.1097/j.pain.0000000000000973.

[学会発表](計5件)

Suzuki T, Kondo M, Nagashima H, Sugano N, Sato S, Iwata K. Regeneration of orofacial sensory circuits following inferior alveolar nerve transection, 第95回日本生理学会大会, 2018

Suzuki T, Kondo M, Katagiri A, Nagashima H, Sugano N, Sato S, Iwata K. Functional regeneration of afferent axons following inferior alveolar nerve transection,

SFN2017, 2017

Suzuki T, Kondo M, Sugano N, Sato S, Iwata K. E-cadherin expression advancing inferior alveolar nerve regeneration, 第 94 回日本生理学会大会, 2017

鈴木達郎、近藤真啓、菅野直之、岩田幸一、佐藤秀一、下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016

鈴木達郎、近藤真啓、菅野直之、佐藤秀一、岩田幸一、下歯槽神経の再生過程における細胞接着分子の発現変化、第 9 回三叉神経領域の感覚 運動統合機構研究会、2015

〔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

近藤 真啓 (KONDO, Masahiro)
日本大学・歯学部・講師
研究者番号：5 0 3 1 2 2 9 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者
なし