

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15727

研究課題名(和文)「脳の透明化」による神経障害性疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The study on the pathogenic mechanisms of neuropathic pain using optical clearing method for brain

研究代表者

詫間 滋 (TAKUMA, SHIGERU)

北海道大学・歯学研究科・助教

研究者番号：60360921

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の発症機序は未だ明らかでないが、原因は侵害情報伝達の可塑的変化にあると考えられ、近年、その可塑的変化の成立にはグリア細胞が重要な役割を果たすことがわかってきた。本研究は、ラット延髄水平断スライス標本に組織透明化手法を適用し、蛍光抗体法を用いた免疫組織化学的手法による研究方法を確立すること、さらに神経障害性モデル動物において実際にグリア-ニューロン連関を明らかにすることを目標とした。厚さ数mmのラット透明化延髄水平断標本に蛍光抗体法を適用し、三次元的観察を試みた。その結果、一定の透明化は得られたもののSN比が不十分であり、今後様々な標本作成条件・染色条件の検討が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Although the pathogenic mechanisms of neuropathic pain remain to be elucidated so far, it has revealed recently that glial cells play a key role in the plastic change in the nociception. Therefore, the interaction between glial cells and neurons in the primary relay nuclei is important for the elucidation of the mechanisms of neuropathic pain. In this study, the optical clearing method "Scales" was applied to the horizontal slices of rat medulla oblongata and immunohistochemical observation of the spinal trigeminal nucleus using immunofluorescence method was undertaken. In consequence, SN ratio of fluorescence image was insufficient and further trials of various conditions of sample preparation and/or staining conditions were thought to be essential.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛 三叉神経脊髄路核 可塑性 グリア 透明化

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛に苦しむ患者は全国に約660万人と推定されており、口腔顔面領域では、手術に伴う神経損傷後の疼痛、三叉神経痛、舌咽神経痛、帯状疱疹後神経痛などが該当する。神経障害性疼痛の多くは難治性のため社会的関心も高く、Wallらが報告した完全神経損傷モデル(Pain: 7, 103-111, 1979)をはじめ、様々な神経障害性疼痛モデルが考案され、長年にわたり電気生理学的研究が行われてきた。しかしながら、その発症機序は未だ明らかではない。

現在の神経障害性疼痛に対する治療戦略は薬物療法が主体であり、プレガバリンや抗てんかん薬に代表される、神経の異常興奮を抑制する薬剤と、ノイロトロピンや抗うつ剤、麻薬性鎮痛薬などの下行性疼痛抑制系賦活を目的とする薬剤に大別される。しかしいずれの薬剤も、“既に発症した”難治性疼痛に対する作用であるため効果は限定的であり、全ての患者が苦痛から解放されているとは言い難い。

神経障害性疼痛の原因は『侵害情報伝達の可塑的变化』にあると考えられ、その主役として、古くからニューロンが研究対象となってきた。しかし近年、かつてはニューロンの支持細胞としかみなされなかったグリア細胞の機能が解明されるのに伴い、その可塑的变化の成立にはグリア細胞が重要な役割を果たすことが明らかになってきた(Nature 424, 778-783, 2003, Nature 438, 1017-1021, 2005)。したがって、神経障害性疼痛発症メカニズムを解き明かす鍵は、侵害情報伝達の一次中継核におけるグリア-ニューロン連関の究明にあると考えられる。

一方、組織透明化に関する研究は2010年頃から始まり、これまでに複数の研究グループから様々な透明化手法が報告されている。しかしながら、従来の方法は手順が煩雑で透明化までに時間がかかり、組織や蛍光色素が変性するなどの欠点があった。そのような中、2013年に発表された組織透明化試薬 SeeDB は、従来の欠点を克服する簡便迅速な方法として注目された。そのような背景において、数百 μm の深部観察能を有する2光子励起顕微鏡の登場で生体深部イメージングが注目を集め、透明化組織の実用化により、組織の『丸ごと』イメージングが可能になると期待されている。しかしながら、2光子励起顕微鏡は約五千万円と極めて高価な装置であり、一部の研究者のみ利用できるのが現状であった。

侵害情報伝達の一次中継核を研究対象として考える場合、四肢・体幹の一次中継核である脊髄後角と比較して、口腔顔面領域の一次中継核である三叉神経核は、延髄最深部に存在することから、一般的に動物実験における

検討が技術的に困難である。そこで今回、組織透明化手法をラット延髄標本に適用し、従来よりも厚みのあるスライス標本において三叉神経脊髄路核を免疫組織化学的・三次元的に観察することを考えた。

2. 研究の目的

現在の神経障害性疼痛に対する治療戦略は前述の通り“既に発症した”症状に対する薬物療法が主体となっている。すなわち以下の発症概念においては、)以降に介入できるのみである。

)神経障害)グリア-ニューロン連関
)一次中継核の可塑性発現)難治性疼痛発症

しかし臨床的視点に立てば、『発症を防ぎ』、発症不可避ならば『予後を推定し』、『より軽度な症状に留める』ことこそ最重要であり、さらに発症後の治療は、『原因に対する治療』が最も効果的であることは明らかである。本研究の目的は、)の解明である。つまり、神経障害性疼痛の原因である、三叉神経脊髄路核における侵害情報伝達の可塑的变化が、『いつ』、『何を契機に』、『どのように』成立するかをグリア-ニューロン連関に焦点を当てて究明し、神経障害性疼痛の病態概念に対して、臨床的観点から、『予防』ならびに『予後推定』を含む新しい治療戦略の提供を目指すものである。

3. 研究の方法

本研究は、以下の二段階で計画した。

- (1) 透明化試薬を適用した『延髄浮遊切片』に対する、蛍光多重免疫染色法の確立
- (2) 上記手法による侵害受容システム可塑的变化の検討(以下のモデル動物に対して)
 -)三叉神経絞扼性神経損傷(神経障害性疼痛)モデルラット
 -)選択的C線維脱落(無痛症)モデルラット

(1)ラットの灌流固定には、免疫組織化学における抗原性の維持を重視しパラフォルムアルデヒド(PFA)を用いる。ペントバルビタールナトリウム腹腔内投与による全身麻酔下に、PFAを用いて心臓からの灌流固定を行い、実体顕微鏡視下に抜脳し遊離延髄標本を得る。さらにPFAへの浸漬による後固定を行った後、リニアスライサー®を用いて厚さ数mmの水平断スライス標本を作成する。

2013年発表の組織透明化試薬『SeeDB』を用いて、延髄水平断スライス標本の透明化を試みる。方法はNature Neuroscienc online; doi:10.1038/nn.3447に公開されており、それに加えて具体的プロトコールや関連文献、

透明化組織の蛍光染色画像の例などが、専用のインターネット上サイト：『SeeDB esource』で参照可能である。

透明化浮遊切片に対して、蛍光抗体法による多重染色を行う。一次抗体として、グリア細胞に特異的な抗原、すなわち、ミクログリアに対しては Iba1, アストロサイトには GFAP, オリゴデンドロサイトには O4 を用いる。また疼痛関連機能分子は、一次中継核（三叉神経脊髄路核）における情報伝達の可塑的変化の発現に重要な役割をもつと考えられる BDNF, GDNF, ATP の各受容体を対象に検討する。二次抗体は、長時間の露光に耐えうる褪色の少ない蛍光色素 (AlexaFluoro® または DyLight®) で標識された抗体を選択する。具体的な染色プロトコールは、申請者が実際に参加して方法を習得した技術講習会のテキストブック（日本組織細胞化学会編：組織細胞化学 2013 (P27-29) に従う。観察・記録系には、落射蛍光装置 (BX2-FL・オリンパス社), 顕微鏡 (BX51・オリンパス社), ならびに顕微鏡デジタルカメラ (DP71・オリンパス社) を用いる。

(2) モデル動物による検討

）絞扼性神経損傷 (Chronic constriction injury: CCI) モデル

神経を外科的に緩く絞扼することにより、神経障害性疼痛を惹起する動物モデルである。Bennet らによって考案された坐骨神経の CCI モデル (Pain: 33, 87-107, 1988) が起源であるが、本研究では、今村らが報告した三叉神経第 3 枝に対する CCI モデル (Exp. Brain Res.: 116, 97-103, 1997) を採用する。このモデルは、ラットの口腔内からアプローチして眼窩下神経を結紮する方法であり、顔面皮膚や洞毛は全く損傷・刺激を受けないため、神経損傷そのものによる影響を解析することが可能であるとされている。なお、三叉神経第 3 枝は運動神経線維を含まないため、感覚神経損傷の解析に適している。

）新生仔 capsaicin 処理 (Neonatal capsaicin treatment: NCT) による、選択的 C 線維脱落モデル

新生仔期のラットに唐辛子の辛み成分として知られる capsaicin を皮下投与することにより、C 線維選択的な脱落 (消失) を惹起することが知られている (Nature: 270, 741-743, 1977)。具体的な方法は、過去の報告 (Brain Res: 906, 1-12, 2001) に従う。

動物モデルを用いた実験プロトコールは、以下の予定とした。すなわち、対照群でデータを得た後、まずは CCI 群での検討を行う。三叉神経第 3 枝の絞扼性神経損傷により、三叉神経脊髄路核における可塑的変化が惹起されると考えられるが、それをラットの疼痛関連行動で確認した後、透明化標本を作成し、

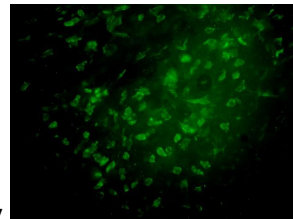
蛍光免疫染色により観察する。さらに、NCT による選択的 C 線維脱落モデルを用いて CCI の影響を明らかにする。侵害 (痛覚) 情報伝達の一次中継核 (脊髄では後角、三叉神経領域では三叉神経脊髄路核) における可塑的変化の発現には、C 線維 (細径無髄線維) を介した入力が必要な役割を果たすことが知られており、C 線維脱落モデルでは、CCI による可塑的変化の発現が非 NCT 群よりも減少することが予想される。

4. 研究成果

組織透明化手法としては当初、SeeDB 法を採用する予定であったが、その後 2015 年、新たな方法として Scales 法が発表された (Nature Neuroscience: 18(10), 1518-1529, 2015)。この方法は、ソルビトール、尿素および低濃度の界面活性剤を用いた新しい透明化手法であり、SeeDB 法を含む従来法と比較して組織の膨張が抑えられ、高い透明度が得られると報告された。それに加え、蛍光抗体法を用いた免疫組織化学的観察に適したプロトコール "AbScale" を同時に提供するものであった。そこで本研究に用いる透明化手法は AbScale を採用することとし、本法のプロトコールに則りラット延髄標本の透明化を試みた。その結果、右図の通り遊離延髄標本に一定の透明度が得られたため、次にリニアスライサー® を用いてこれを 1mm から 4mm の厚さでスライスし、水平断標本を作成した後



で AbScale プロトコールに従い、一次抗体、二次抗体でそれぞれ反応させ、透明化標本の染色を完了した。今回、一次抗体としては抗 Iba1 ヤギ抗体 (ab5076, Abcam 社) を、二次抗体としては Alexa Fluor®488 で標識した抗ヤギ IgG ロバ抗体 (ab150129, Abcam 社) を用いた。顕微鏡観察前の標本の状態は、肉眼的には半透明であり、透明化の効果は認められるものの十分とは言えなかった。実際に蛍光観察したところ、染色されたミクログリアが確認できるものの、バックグラウンドの染色が強く十分な SN 比をもって観察することはできず、ミクログリアの突起の状態は不明瞭であった。



原因としては、標本の厚さの問題や透明化処理の時間、抗体の反応時間、など複数の要素が考えられ、本標本に最適な条件を同定するには、今後様々な条件の下で検討を重ねる必要があると考えられた。

今回、透明化手法を当初の予定から変更したこともあり、時間の制約上の問題でモデル動物による検討は今後の検討課題となったが、

三叉神経脊髄路核を研究対象とする延髄標本においても、透明化手法を応用した免疫組織化学的検討が可能であることが示唆された。この方法が研究手法として確立できれば、脳深部に存在する神経細胞集団（神経核）を、一般的な蛍光顕微鏡を用いて三次元的に観察することが可能となり、機能的神経組織化学の有力なツールになると考えられる。

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 0 件)

〔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

詫間 滋 (TAKUMA, Shigeru)
北海道大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：6 0 3 6 0 9 2 1