

令和元年6月26日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20520

研究課題名(和文) 口腔顔面領域の神経因性疼痛に対する三叉神経節グリア細胞の関与の解明

研究課題名(英文) The role of glial cells in trigeminal ganglion for orofacial neuropathic pain.

研究代表者

河野 彰代 (KAWANO, AKIYO)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10570294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：オトガイ神経を結紮した慢性絞扼損傷モデルラットと、切断した神経切断モデルラットを作成し、三叉神経節におけるIba1陽性細胞の動態について免疫組織学的方法を用いて観察した。両モデルにおいて神経損傷後にIba1陽性細胞の増加が認められた。また、サテライト細胞のマーカーであるSK3抗体と単球系細胞のマーカーであるED1を用いてIba1抗体との2重染色を行ったところ、Iba1陽性細胞はSK3細胞と共発現せず、一方、Iba1陽性細胞はED1と共発現し、両モデルにおいて神経損傷後には発現が増加し、特に切断後2週間で顕著に増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯科領域においては、抜歯や顎骨内腫瘍、顎変形症に対する骨切り術などの外科処置の偶発症として三叉神経の損傷が発生することはまれではない。しかし、神経損傷後の神経因性疼痛の発症メカニズムは完全には解明されていない。本研究では口腔顔面領域の神経因性疼痛発症時の三叉神経節におけるIba1(脳内ミクログリアのマーカー)陽性細胞の働きを一部解明した。このことによって、将来的に口腔顔面領域における神経因性疼痛発症の機序が明らかとなり、治療薬開発の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used the neuropathic pain model rat which mental nerve was loosely ligated and the hypoalgesia model rat which mental nerve was transected. The behavior of Iba1 immunoreactive cells and satellite cells and ED1 immunoreactive cells in the trigeminal ganglion was observed. In both models, the number of Iba1 immunoreactive cells was increased. In addition, double staining with Iba1 antibody using SK3 antibody which is a marker of satellite cells and ED1 which is a marker of monocyte lineage cells shows that Iba1 positive cells do not co-express with SK3 cells. On the other hand, Iba1 positive cells co-expressed with ED1, and expression increased after nerve injury in both models, and in particular significantly increased 2 weeks after injured.

研究分野：口腔顔面痛、神経因性疼痛

キーワード：口腔顔面痛 神経因性疼痛 Iba1 三叉神経節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科領域においては、抜歯や顎骨内腫瘍、顎変形症に対する骨切り術などの外科処置の偶発症として三叉神経の損傷が発生することはまれではない。神経損傷後に痛覚過敏やアロディニア（異痛症）などの病的疼痛を発生した場合、患者は長期につらい痛みで悩まされることになる。しかし、神経因性疼痛の病態生理学的な機序は未だ明らかになっておらず、有効な治療法もなく、モルヒネなどの鎮痛薬も効かないため、臨床において苦慮するところである。

神経損傷後の神経因性疼痛の発症メカニズムは完全には解明されていないが、主に末梢性の原因と中枢性の原因の二つに分類される。そのどちらにおいても、近年疼痛との関連が明らかになり注目されているのが中枢神経系におけるミクログリアやアストロサイト、また1次感覚神経節内のサテライトグリア細胞などのグリア細胞である。

ミクログリアやアストロサイトは中枢神経系における免疫担当細胞とも呼ばれ、変性に陥った神経細胞由来の分子によって活性化することが知られている。活性化したグリア細胞は変性した細胞の修復や貪食に関与するほか、サイトカインを放出することでニューロンの興奮性を増大させ痛覚過敏の発現に関与することが最近、明らかになってきている。

一方サテライトグリア細胞は一次感覚神経節内でニューロンの周囲を取り囲んで、その環境を維持している。このサテライトグリア細胞も中枢におけるアストロサイトと同様の性質を持ち、損傷を受けた神経細胞由来のシグナルによってサテライトグリア細胞が活性化し、サイトカインの合成を活発に行い病的疼痛発現に関与するとの報告があるが、未だ不明な点が多い。一方、ミクログリアに相当する末梢神経系の細胞については明らかにされていないものの、ミクログリアのマーカーである Iba1 が、三叉神経節などの末梢感覚神経節内の細胞に発現することは報告されているが、その機能や属性に関しては不明な点が多い。

このような学術的背景より、これまでに申請者は、三叉神経領域の神経因性疼痛の末梢性原因を探るべく、三叉神経節におけるグリア細胞の役割と動態についての研究を行ってきた。神経因性疼痛モデルラットの三叉神経第3枝領域を電子顕微鏡下で観察したところ、サテライト細胞とニューロンとの間に間隙を認め、さらにサテライト細胞の外側に Iba1 陽性細胞が突起を伸ばしていることが観察された。末梢感覚神経節内の Iba1 陽性細胞の機能や属性を明らかにし、神経因性疼痛発症への関与を検討するため、本研究を着想するに至った。

2. 研究の目的

三叉神経損傷後の神経因性疼痛発症のメカニズムを明らかにするため、一次感覚神経節である三叉神経節における Iba1 陽性細胞の動態に注目して研究を行う。これまでに申請者は、オトガイ神経を結紮した神経因性モデルラットを用いて、三叉神経第3枝領域を電子顕微鏡下で観察したところ、サテライト細胞の外側に Iba1 陽性細胞が突起を伸ばして活性化している可能性があることを明らかにした。本研究では、この Iba1 陽性細胞の働きを明らかにするため、疼痛の異なる発症機序によって、中枢神経系および末梢神経系におけるグリア細胞の動態が異なるのかどうかを検討するため、オトガイ神経領域の慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルを用いて比較を行う。

3. 研究の方法

本実験ではオトガイ神経の慢性絞扼損傷（神経結紮）モデルと、神経切断モデルを作成した。ラットの片側のオトガイ神経を剖出し、慢性絞扼損傷モデルではオトガイ神経のオトガイ孔から約1mmの位置で神経に接する程度に緩く1か所絹糸にて結紮した。神経切断モデルでは、軸索の再生を防ぐためにオトガイ神経のオトガイ孔から約1mmの位置と3mmの位置の2か所に強く絹糸で結紮後、その間の軸索を切断除去した。両モデルとも反対側は sham ope として皮膚切開のみ行い縫合した。

それぞれのモデルに対し以下の実験を行う。(1) von Frey filament を用いた機械刺激に対する疼痛閾値の測定 (2) 三叉神経節において Iba1 と、SK3 (サテライト細胞の特異的マーカー)、ED1 (単球系細胞のマーカー) を用いて蛍光二重染色を行いグリア細胞の動態を免疫組織化学的に観察する。

4. 研究成果

(1) 慢性絞扼損傷モデルの von Frey filament を用いた機械刺激に対する疼痛閾値の測定。

慢性絞扼損傷モデルの術側の逃避閾値は三叉神経第3枝領域においては、術側、反対側 (sham ope 実施) とともに結紮後1~2週にかけて低下し、術側では術後4週まで疼痛過敏状態が持続したが、反対側では術後3週以降に回復を認めた。また術側の三叉神経第2枝領域における逃避閾値についても、同様の変化を示したが反対側では有意な変化は認められなかった。図1に術後の逃避閾値の経過を示す

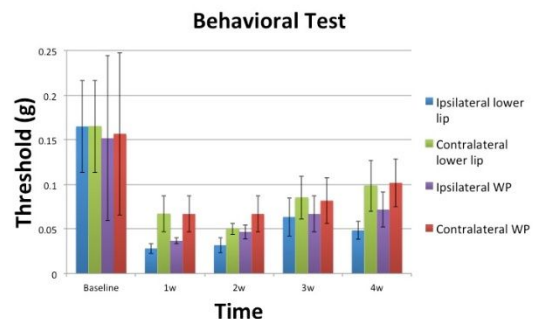


図1、慢性絞扼損傷モデルの疼痛閾値

(2) 三叉神経節において Iba1 (脳内ミクログリアの特異的マーカー) と、SK3 (サテライト細胞の特異的マーカー)、ED1 (単球系細胞のマーカー) を用いて蛍光二重染色を行いグリア細胞の動態を観察。

正常動物の三叉神経節における、Iba1、SK3 と Iba1、ED1 の蛍光二重染色

全ての Iba1 陽性細胞は ED1 を共発現していたが、細胞によって発現量が多い場合と少ない場合があった。Iba1 は細胞膜や突起に発現しているため、その細胞の輪郭を型取るのに対し、ED1 は細胞膜や細胞質内に点状に発現していた。一方、SK3 はニューロンの周囲を取り囲むような細いリング状に発現しており ED1 と SK3 は共局在していなかった。SK3 はニューロンを取り囲むように発現していた。

慢性絞扼損傷モデルと神経切断モデルで、Iba1 陽性細胞の神経損傷後の ED1 発現の変化を観察し、正常動物と比較。

神経結紮後 1 週の損傷側の三叉神経節には ED1 発現の増加した Iba1 陽性細胞が認められたが、反対側 (contra 側) では正常動物と比較して明らかな変化を認めなかった。神経結紮後 2 週においても同様であった。

また、神経切断モデルでも神経切断後 1 週の創傷側の三叉神経節には ED1 発現の増加した Iba1 陽性細胞が認められたが、反対側では正常動物と比較して明らかな変化を認めなかった。神経切断後 2 週においては損傷側での Iba1 陽性細胞の ED1 発現の増加が顕著に認められた。反対側では切断後 1 週と同様に正常動物と比較して明らかな変化は認められなかった。

以上の結果より、Iba1 陽性細胞は ED1 を共発現しており、神経損傷後初期においては慢性絞扼損傷モデルでも神経切断モデルにおいても Iba1 陽性細胞の増加が認められたが、特に神経切断モデルで Iba1 陽性細胞の貪食作用が強く認められたと言える。これは、神経損傷を受けて初期の段階では両モデルとも神経損傷の刺激により分泌された様々な物質により Iba1 陽性細胞が周囲に遊走してくるが、慢性絞扼損傷モデルでは神経は損傷を受け変性するも、細胞死には至らないため Iba1 陽性細胞が貪食する対象とならず Iba1 陽性細胞のさらなる増加を認めないが、神経切断モデルでは神経細胞の細胞死が多く認められ貪食が必要となるため Iba1 陽性細胞が増加し続けたと考えられる。

これらのことから、Iba1 陽性細胞は細胞死したニューロンの貪食に関与する単球系細胞であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Wakisaka S, Kadono K, Kawano A, Honma S: Behavior of non-neuronal cells in the trigeminal ganglion following peripheral nerve injury, The International Symposium on Neuroscience In Orofacial sensory-motor functions 2015, May 10-11th, 2015, Osaka, Japan.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 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 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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：角野 公紀

ローマ字氏名：Kohki Kadono

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。

歯科領域においては、抜歯や顎骨内腫瘍、顎変形症に対する骨切り術などの外科処置の偶発症として三叉神経の損傷が発生することはまれではない。しかし、神経損傷後の神経因性疼痛の発症メカニズムは完全には解明されていない。本研究では口腔顔面領域の神経因性疼痛発症時の三叉神経節における Iba1（脳内ミクログリアのマーカー）陽性細胞の働きを一部解明した。このことによって、将来的に口腔顔面領域における神経因性疼痛発症の機序が明らかとなり、治療薬開発の一助になると考える。