

平成22年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18390512
 研究課題名（和文）
 三叉神経痛において生じている一次侵害受容神経過敏化のメカニズムの解明と治療法開発
 研究課題名（英文）
 Basic mechanisms of nociceptive sensitization of first order sensory neuron in trigeminal neuralgia and treatment development
 研究代表者
 松香 芳三（MATSUKA YOSHIZO）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：90243477

研究成果の概要（和文）：

ラット顔面部の三叉神経を絹糸でゆるく結紮する三叉神経刺激により、疼痛を誘発すること、結紮側の三叉神経節細胞からの神経伝達物質遊離が増加していることが理解できた。また、毒素成分を精製した改良A型ボツリヌス毒素を顔面部皮膚に注射することにより、疼痛が軽減し、増強された神経伝達物質遊離を抑制することを証明した。

以上から、本研究結果は神経痛の発症メカニズムの解明に大きく貢献するとともに、改良A型ボツリヌス毒素の末梢投与は、神経痛患者に対して有意義な治療法となる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We found that trigeminal nerve constriction induced facial pain and increased neurotransmitter release from trigeminal ganglion cell body. Also, facial injection of highly purified Botulinum toxin type A 150 kDa (BoNT/A/A) decreased the pain level and the neurotransmitter release.

These results made clear the mechanisms of trigeminal neuralgia and peripheral BoNT/A injection may be an important treatment in the near future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,800,000	0	5,800,000
2007年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2008年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
総計	14,300,000	2,550,000	16,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：三叉神経痛、神経節細胞、神経伝達物質、神経小胞、遊離、改良A型ボツリヌス毒素

1. 研究開始当初の背景

高齢者に多発する三叉神経痛は、その病態

が十分解明されておらず、使用薬物は中枢性副作用が強く、服用不可能である患者も少な

くない。我々のこれまでの研究では三叉神経節にはシナプスが存在しないにもかかわらず、神経伝達物質が神経節内において遊離され、一次侵害受容ニューロンの過敏化が生じることを解明している。この過敏化プロセスが、中枢神経にまで到達しない三叉神経節内で生じることから、中枢性副作用を生じない三叉神経節細胞を標的とした新しい治療法が開発できる可能性がある。考慮される治療法は三叉神経受容野である顔面部皮膚に薬物を注入し、三叉神経節細胞内で機能させ、神経伝達物質の遊離を減少させるものである。

2. 研究の目的

(1) 一次侵害受容ニューロンの過敏化プロセスの分子レベルでのさらなる理解

末梢三叉神経慢性刺激モデルを用いて、三叉神経節細胞での神経伝達物質の遊離・取り込みの変化およびメカニズムを解明する。

(2) 培養三叉神経節細胞への標的分子の導入が及ぼす影響の観察

培養三叉神経節細胞に蛍光色素でマーキングした薬物を投与し、細胞内に取り込まれることを確認し、神経伝達物質の遊離・取り込みが減少するかどうかを明らかにする。

(3) 一次ニューロン過敏化プロセスを選択的に抑制する分子標的治療の開発

実験動物を用いて三叉神経受容野に実験的に注入した薬物が神経過敏化プロセスを抑制することを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経刺激モデルの作製

腹腔内麻酔（ペントバルビタール50mg/kg）下で、ラットの片側眼前部の皮膚に切開を加え、眼下窩神経（IoN）を剖出し、絹糸（2本）をゆるく結紮した。コントロールラットは眼

下窩神経を剖出するSham手術を施行した。

(2) 三叉神経刺激モデルにおける知覚閾値・痛覚閾値計測

知覚閾値の測定は電氣的“von Frey hair”（Model 1601C、IITC Instruments、Woodland Hills、CA、USA）を用いて行った。IoN支配領域である頬髭部中央に圧を加え、ラットが頭部を逃避させプローブから離れる際の最大圧を計測した。プローブによる刺激は、IoN結紮側ならびに疑似手術側に1分間以上の回復時間において交互に加え、それぞれ5回計測し、平均値を求めた。

痛覚閾値に関してはラットの水飲み時に顔面部皮膚が温熱刺激（45℃）に接触するように設定し、1回の接触時間を計測した。この装置は海外共同研究者が開発した装置である（Neubert et al. 2005）。

(3) 三叉神経刺激モデルにおける三叉神経節細胞での伝達物質の遊離変化

神経刺激モデルの三叉神経節細胞からの神経伝達物質の遊離を観察した。ペントバルビタール麻酔下（75mg/kg）で三叉神経節を摘出し、コラーゲナーゼとトリプシン処理で結合組織を分解した後、パスツールピペットで機械的に細胞を分離した。分離後の細胞はpoly-L-lysine処理を行ったカバーガラス（直径12mm）に接着させ、5%CO₂環境下でのMinimum Essential Medium溶液内で培養した。細胞分離時の障害から回復する2時間経過以降に神経伝達物質の遊離を観察した。神経小胞性の遊離を観察することが可能であるFM4-64を投与し、神経伝達物質の遊離を顕微鏡下で観察した。

(4) 三叉神経刺激モデルにおける改良A型ボツリヌス毒素（BoNT/A）の疼痛抑制効果

三叉神経刺激により疼痛閾値が減少しているラットにBoNT/Aを眼窩下神経支配領域皮内に注射し、疼痛反応の変化を観察した。

(5) 三叉神経刺激モデルにおける末梢皮膚へのBoNT/A投与後の三叉神経節細胞での神経伝達物質遊離の変化

三叉神経刺激モデル作製2週間後、BoNT/Aを眼窩下神経支配の顔面皮内に注射し、三叉神経節細胞からの神経伝達物質の遊離の変化を観察した。前項の(3)三叉神経刺激モデルにおける三叉神経節細胞での伝達物質の遊離の変化と同様の方法で顕微鏡下でのFM4-64の動態を観察した。

(6) 三叉神経刺激モデルへのBoNT/A投与による三叉神経節での遺伝子変化

三叉神経刺激モデルを作製し、末梢皮内にBoNT/Aを投与した。1週間後、三叉神経節を摘出し、疼痛現弱の原因を探るため、伝達物質遊離に関する遺伝子をDNAアレイにより観察した。

(7) BoNT/Aの知覚神経内の取り込み

三叉神経節細胞を蛍光色素でラベルしたBoNT/A重鎖で30分間培養し、BoNT/Aの細胞内動態を観察した。

4. 研究成果

(1) 三叉神経刺激モデルの作製ならびに閾値計測

三叉神経刺激モデルでは知覚閾値あるいは痛覚閾値が低下していた。これは、三叉神経痛患者の臨床症状と類似しており、神経刺激モデルが作製できたことを示している

(Kitamura et al. 2009)。

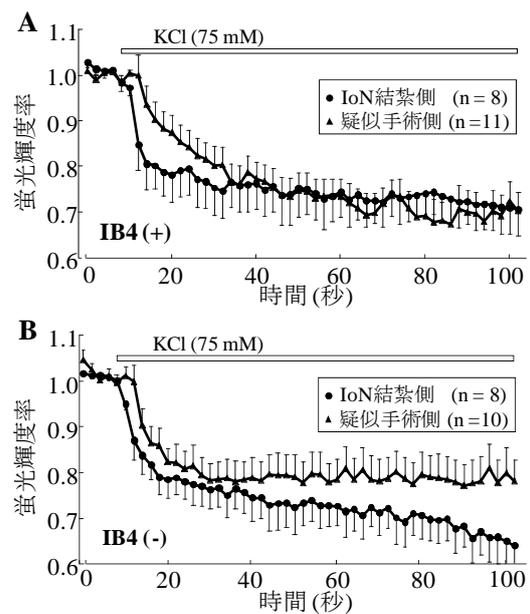
熱刺激による痛覚閾値の計測に使用したシステムは現段階では市販されておらず、海外

共同研究者 (Neubert et al. 2005) から送付されたものである。この装置では、これまで困難であった自由行動下での顔面疼痛反応が観察でき、本研究結果は世界に先駆けた結果である。

(2) 三叉神経刺激モデルにおける三叉神経節細胞での伝達物質の遊離の変化

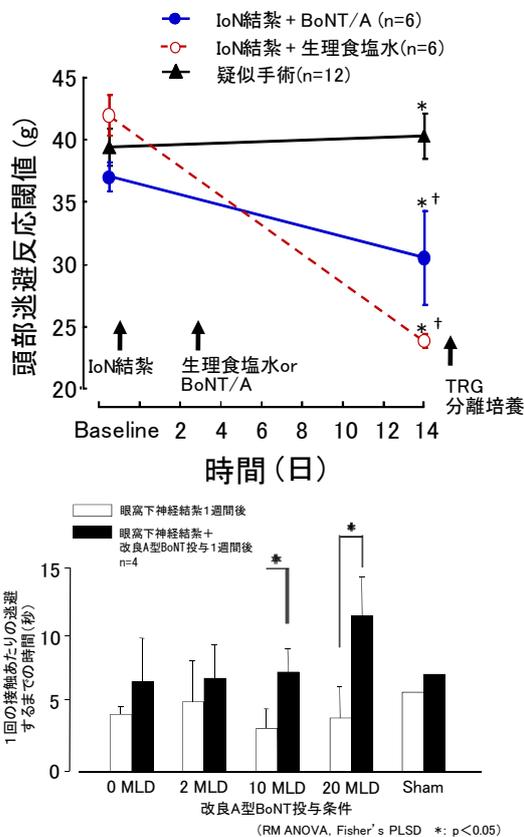
三叉神経節細胞を神経刺激モデルとコントロールモデルに分類して、FM4-64を投与し、神経伝達物質の遊離を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、三叉神経刺激モデルでは伝達物質の遊離が速く、遊離量が多いことが理解できた (Matsuka et al. 2008, Kitamura et al. 2009)。このことから、三叉神経末梢刺激により、三叉神経節細胞が興奮し、伝達物質の遊離が活発化していることが理解できた。

この結果は、これまで国際的に発表されていた神経刺激モデルにおける神経節細胞の興奮 (Zhang et al. 2004, Thakor et al. 2009) を裏付けるものであり、さらに知覚神経節細胞からの神経伝達物質の遊離を報告する貴重なものである。



(3) 三叉神経刺激モデルにおけるBoNT/Aの疼痛抑制効果

三叉神経刺激モデルを作製し、疼痛閾値が減少しているラットに対し、BoNT/Aを神経支配領域皮内に注射したところ、知覚閾値・痛覚閾値が回復した(松香他, 2008, 2009)。また、この効果は数週間持続した。BoNT/Aの末梢皮膚投与による神経障害性疼痛の減弱に関する報告は世界的にこれまで認められず、神経障害性疼痛の治療法開発の可能性が広がった。今後は臨床応用に向けて、準備を進めていく予定である。

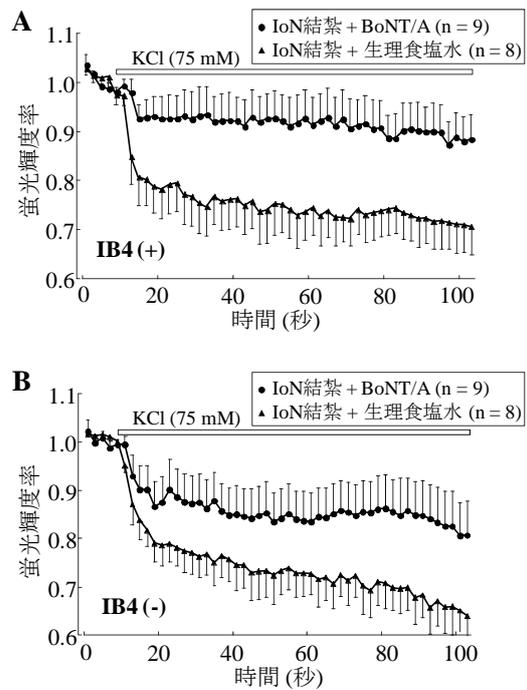


(4) 三叉神経刺激モデルにおける末梢皮膚へのBoNT/A投与後の三叉神経節細胞での神経伝達物質遊離の変化

BoNT/Aを末梢皮膚へ投与することにより、神経ペプチドの有無にかかわらず、三叉神経節細胞からのFM4-64の遊離が抑制された。このことから、BoNT/Aの末梢への投与は知覚神経節細胞からの神経伝達物質の遊離を抑える

ことが理解できた (Kitamura et al. 2009)。

これまで、BoNTは知覚神経内を軸索移動しないというのが通説であったが、我々の結果により、BoNT/Aが神経内を移動する可能性が考えられる。この結果は他の研究グループ (Antonucci et al. 2008) との結果とも合致するものであり、今後の発展が期待できる。



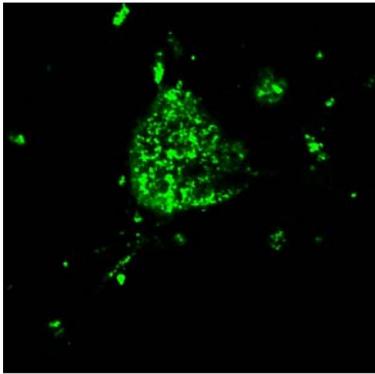
(5) 三叉神経刺激モデルへのBoNT/A投与による三叉神経節での遺伝子変化

三叉神経刺激モデル作成により増加し、BoNT/A投与により減少する遺伝子あるいは三叉神経刺激モデル作成により減少し、BoNT/A投与により増加する遺伝子が観察された。この結果より、BoNT/Aの末梢投与により、知覚神経節細胞での遺伝情報の変化が理解でき (Thakor et al. 2009)、今後の検討により、さらに詳細が理解できると考える。

(6) BoNT/Aの知覚神経内への取り込み

BoNT/Aは重鎖と軽鎖から構成されており、重鎖によりシナプス小胞内に取り込まれるため、蛍光色素標識された重鎖の取り込みを観察したところ、三叉神経節細胞内に取り込ま

れることが観察できた。これは世界的にもこれまで報告がなかった知覚神経節細胞へのBoNT/Aの取り込みを証明するものであり、重要な結果である。また、BoNT/Aの作用部位の解明に向けて大きく前進したと言える。



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10件)

- ① Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K, Botulinum toxin type A (150 kDa) decreases exaggerated neurotransmitter release from trigeminal ganglion neurons and relieves neuropathy behaviors induced by infraorbital nerve constriction, *Neuroscience*, 査読有, Vol.159, 2009, 1422-1429
- ② Thakor DK, Lin A, Matsuka Y, Meyer EM, Ruangsri S, Nishimura I, Spigelman I, Increased peripheral nerve excitability and local NaV1.8 mRNA up-regulation in painful neuropathy, *Molecular Pain*, 査読有, Vol. 5, 2009, 14-25
- ③ 松香芳三, 北村洋一, 山本由弥子, 園山 亘, Spigelman Y, 小熊恵二, 窪木拓男, 三叉神経痛治療のための薬物治療法の開発, *日本歯科医学会誌*, 査読有, 28巻, 2009, 49-53
- ④ Matsuka Y, Ono T, Iwase H, Mitirattanakul S, Omoto KS, Cho T, Lam YYN, Snyder B, Spigelman I, Altered ATP release and metabolism in dorsal root ganglia of neuropathic rats, *Molecular Pain*, 査読有, Vol. 4, 2008, 66-78
- ⑤ 松香芳三, 三叉神経痛において生じている神経節細胞過敏化のメカニズムの解明と治療法開発, *生物学における試験論叢*, 査読無, 23巻, 2008, 31-39
- ⑥ Kitamura Y, Matsuka Y, Ishihara Y, Spigelman I, Yamamoto Y, Sonoyama W, Oguma

K, Kuboki T, Botulinum toxin blocks neurotransmitter release from somata of rat neuropathic trigeminal ganglion neurons, *Toxicon*, 査読無, Vol. 51, 2008, 6

- ⑦ Matsuka Y, Kitamura Y, Spigelman I, Akther R, Yamamoto Y, Sonoyama W, Oguma K, Kuboki T, The effect of peripheral administration of botulinum toxin type A in neuropathic pain rats, *Toxicon*, 査読無, Vol. 51, 2008, 7

〔学会発表〕(計34件)

- ① Kumada A, Matsuka Y, Kitamura Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Hikasa T, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K, Peripheral administration of botulinum toxin type A decreases exaggerated neurotransmitter release and reverses neuropathy-induced gene expression changes in trigeminal ganglia, Society for Neuroscience, 2009年10月18日, Chicago
- ② 北村洋一, 松香芳三, 園山 亘, 暁 貴行, 熊田 愛, 小熊恵二, 窪木拓男, 三叉神経領域における実験的神経因性疼痛に対する改良A型ボツリヌス毒素(150 kDa)の鎮痛効果, 日本補綴歯科学会, 2009年6月6日, 京都
- ③ Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Ishihara Y, Akther R, Yamamoto Y, Sonoyama W, Oguma K, Kuboki T, Peripheral administration of Botulinum toxin type A blocks neurotransmitter release from somata of trigeminal ganglion neurons and alleviates neuropathy symptoms, Society for Neuroscience, 2008年11月18日, Washington DC
- ④ 北村洋一, 松香芳三, 石原嘉人, 園山 亘, 山本由弥子, 小熊恵二, 窪木拓男, 三叉神経因性疼痛モデルラットにおける改良A型ボツリヌス毒素の効果, 口腔顔面痛学会, 2008年, 7月19日, 福岡
- ⑤ Kitamura Y, Matsuka Y, Ishihara Y, Spigelman I, Yamamoto Y, Sonoyama W, Oguma K, Kuboki T, Botulinum toxin blocks neurotransmitter release from somata of rat neuropathic trigeminal ganglion neurons, *Botulinum and Tetanus Toxins 2008*, 2008年6月12日, Baveno
- ⑥ Matsuka Y, Kitamura Y, Spigelman I, Akther R, Yamamoto Y, Sonoyama W, Oguma K, Kuboki T, The effect of peripheral administration of botulinum toxin type A in neuropathic pain rats, *Botulinum and Tetanus Toxins 2008*, 2008年6月12日, Baveno
- ⑦ Kitamura Y, Matsuka Y, Spigelman I, Schweizer FE, Oguma K, Kuboki T, Botulinum toxin blocks neurotransmitter release

from somata of trigeminal ganglion neurons, Society for Neuroscience, 2007年11月7日、San Diego

⑧北村洋一、松香芳三、福田朋樹、小熊恵二、窪木拓男、三叉神経節細胞の神経伝達物質遊離・取り込みに及ぼす改良A型ボツリヌス毒素の影響、日本補綴歯科学会、2007年5月20日、神戸

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称：ボツリヌス毒素由来のポリペプチドを有効成分として含む鎮痛作用を有する医薬組成物

発明者：窪木拓男、松香芳三、小熊恵二、北村洋一

権利者：岡山大学

種類：特許

番号：特願2008-182218

取得年月日：平成20年7月14日

国内外の別：国内

〔その他〕

①松香芳三、研究シーズ、岡山大学産学官融合センター 研究シーズ集4(医歯薬学系)、2008、45-46

②窪木拓男、松香芳三、小熊恵二、北村洋一、ボツリヌス毒素由来のポリペプチドを有効成分として含む鎮痛作用を有する医薬品、岡山TLO技術シーズ集 岡山県産業振興財団、2008、10

ホームページ等

①Matsuka Y, Kumada A, Kitamura Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Hikasa T, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K, Peripheral administration of Botulinum toxin type A decreases exaggerated neurotransmitter release and reverses neuropathy-induced gene expression changes in trigeminal ganglia、<http://www.youtube.com/user/Facultyof1000#p/u/0/26015LXDtD8>、2009

6. 研究組織

(1)研究代表者

松香 芳三 (MATSUKA YOSHIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：90243477

(2)研究分担者

前川 賢治 (MAEKAWA KENJI)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：20304313

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195

完山 学 (KANYAMA MANABU)

岡山大学・岡山大学病院・講師

研究者番号：90294420

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50135729

竹居 孝二 (TAKEI KOJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：40322226

小野 剛 (ONO TSUYOSHI)

岡山大学・岡山大学病院・医員

研究者番号：80457225

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

小熊 恵二 (OGUMA KEIJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00002262

山本 由弥子 (YAMAMOTO YUMIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403496

北村洋一 (KITAMURA YOICHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

熊田 愛 (KUMADA AI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

Igor Spigelman (SPIGELMAN IGOR)

UCLA・歯学部・教授

John K. Neubert (NEUBERT JOHN K.)

フロリダ大学・歯学部・助教授