

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17209

研究課題名(和文) 三叉神経領域に出現する関連痛機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of referred pain; physiological interaction between oral & maxillofacial pain and visceral diseases

研究代表者

井出 良治 (Ide, Ryoji)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：10638084

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Dexmedetomidine (DEX)は 2アドレナリン作動薬で鎮静・鎮痛効果があり、鎮痛にはテトロドトキシン抵抗性電位依存性ナトリウム電流 (INaR) の減少が関与すると言われる。しかし、内臓感覚ニューロンにおける効果は不明である。そこで今回ホールセルパッチクランプ法を用い、新生仔ラットから単離した篩状神経節 (nodose ganglion, NG) ニューロンのINaRにDEX投与が与える影響を調べたところ、DEXがINaRを抑制する事を確認した (IC50 = 128 μ M)。よって、DEXがNGを介する内臓痛に抑制的な効果をもつことが新たに示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋梗塞などの心疾患や肺癌、腹部内臓疾患では三叉神経領域にしばしば関連痛が出現することが知られている。しかし、現在までその詳細な機序は未だ不明である。そこで 2アドレナリン作動薬で鎮静薬として知られているDexmedetomidine (DEX)を用いることにより内臓痛に抑制的な効果(鎮痛)をもつことが新たに示唆された。

研究成果の概要(英文)：Dexmedetomidine (DEX), an 2-adrenergic agonist, is a sedative and an analgesic, and on the analgesic effect the DEX-related inhibition of tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium currents (Resurgent sodium currents, INaR) has been suggested to be involved. However, this mechanism has not been examined on visceral pain. Therefore, in this study, we dissociated neonatal rat nodose ganglion neurons, which convey visceral sensation, and measured the INaR by using the whole-cell patch-clamp technique. We found that DEX suppressed the INaR in a dose-dependent manner (IC50 = 128 μ M). Therefore, present results suggest a possibility that the DEX has inhibitory effect on the visceral pain.

研究分野：生理学

キーワード：関連痛 篩状神経節 ナトリウムチャネル パッチクランプ法 Dexmedetomidine

1. 研究開始当初の背景

近年、心疾患や肺癌など、内臓疾患の痛みが迷走神経を介して中枢に伝わり顎顔面口腔領域に関連痛を起こす可能性が指摘されている。心臓の痛覚受容については酸感受性イオンチャネルに加えて、テトロドトキシン抵抗性 (TTX-R) 電位依存性ナトリウムチャネルである Nav1.8 およびカプサイシンで活性化される transient receptor potential vanilloid-1 (TRPV1) の関与が推測され、他の内臓では消化管と気道が炎症の際に、nodose ganglion に入る一次知覚神経 neuron において TRPV1 の発現割合の増加が観察された。

申請者は乳幼仔ラットの nodose ganglion neuron について、カプサイシンによる活動電位の発生 (図 1) および Nav1.8 と TRPV1 の高率な共発現を確認した。また、nodose ganglion で心室壁から逆行性に FG 標識した細胞の多くが TRPV1 陽性 (全体の 46 %) を示すことを確認し、その単離培養にも成功した。さらに、新生仔ラット腹部炎症モデルを作成し同 neuron の脱落 (減少) と Nav1.8, TRPV1 陽性細胞の和入相の変化を確認した。

これらの結果から、乳幼仔ラットの nodose ganglion に存在する内臓由来の一次知覚 neuron では Nav1.8 および TRPV1 チャネルが互いに影響し合い疼痛受容に寄与する可能性が示唆された。一方、それらの中枢枝と顎顔面口腔領域由来 (trigeminal ganglion を介する) 一次知覚 neuron の中枢枝はともに脳幹部に終わるため、中枢で互いが修飾し合い、その結果、顎顔面口腔領域の関連痛が発現する可能性がある。しかし、それについては未だ解明されていない。申請者は、ラット (新生仔期 ~ 成熟期) を対象とした実験系を経験し、それら実験の技術を身に付けている。以上から、乳幼仔ラットの内臓と顎顔面口腔領域からトレーサーを逆行性に軸索輸送させ、それぞれの一次知覚 neuron 中枢枝の終末が脳幹部で共存標識される部位を組織学的に検出する。更に FG 標識 nodose ganglion neuron を単離培養し、Nav1.8 および TRPV1 チャネルの分布と機能を解析、評価する。

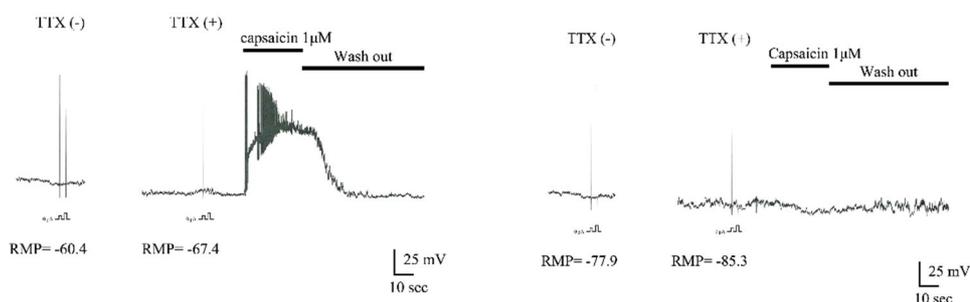


図 1 : パッチクランプ法による神経応答記録 (図左) カプサイシン陽性細胞と (図右) カプサイシン陰性細胞

2. 研究の目的

- (1) 心筋梗塞などの心疾患や肺癌、腹部内臓疾患では三叉神経領域にしばしば関連痛が出現することが知られている。しかし、現在までその詳細な機序は未だ不明である。本研究は、蛍光トレーサーを用いて乳幼仔ラットの nodose ganglion (迷走神経節の1つ) から心臓由来の一次知覚 neuron を検出する新規技術を基盤とし、Fluoro-Gold (FG) を内臓 (心臓・肺・腸管) に、DiC18(DiI) を三叉神経領域に injection する。内臓知覚 neuron (一部) と顎顔面口腔知覚 neuron の中枢枝はそれぞれ nodose ganglion と trigeminal ganglion (三叉神経節) を介して脳幹部に投射する、末梢枝から神経節を経て軸索輸送される FG と DiI を脳幹部レベルで組織学的に検出し、同細胞、組織に対して電気生理学手法 (パッチクランプ法・細胞外記録法) を用いてその特性を明らかにする。本研究により、内臓痛が三叉神経領域に関連痛として現れる機序の解明を目的とする。
- (2) Dexmedetomidine (DEX) は 2 アドレナリン作動薬で鎮静・鎮痛効果があり、鎮痛にはテトロドトキシン抵抗性電位依存性ナトリウム電流 (Resurgent sodium currents, INaR) の減少が関与すると言われる。しかし、内臓感覚ニューロンにおける効果は不明である。そこでホールセルパッチクランプ法を用い、新生仔ラットから単離した篩状神経節 (nodose ganglion, NG) ニューロンの INaR に DEX 投与が与える影響を調べその特性を明らかにする。

3. 研究の方法

電気生理学手法: ホールセルパッチクランプ法

対象: 新生児 Wistar 系ラット (10 - 12 日齢, 21-29 g, n = 15)。

細胞単離・培養:

抽出した NG を 37°C、5~10 分間 5%CO₂ で短期培養し、コラゲナーゼ (type2:1~2 mg、type11: 4~5 mg) を含むハナクス培養液に置換する。NG を含む培養液をパスツールピペットでペッティングすることによって、単離した細胞を含む懸濁液が得られる。Poly-L-lysine で前処理したカバーガラス上に懸濁液を滴下する。培地として、Leibovitz 's L-15 に 10% 新生ウシ血清、26 mM NaHCO₃ および 30mM グルコースを添加する。次いで、細胞は 37°C、5%CO₂ で維持し、懸濁液滴下後 2~10 時間の間に記録を行なった。

記録溶液：

細胞外液 (単位 : mM) 30 NaCl, 80 choline-Cl, 40 tetraethylammonium chloride (TEA-Cl), 3 MgCl₂, 10 HEPES (pH 7.4, adjusted with TEA-OH) に調整し 4 で保存、使用直前に 10mM のグルコースを加えて使用する。細胞内液 (単位 : mM) : 10 NaCl, 100 CsF, 40 CsCl, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 2 Mg-ATP, 11 EGTA, 10 HEPES, 14 (NaO)₂ creatine-phosphate (pH 7.2, adjusted with CsOH) に調整し -20 で保存し、使用直前に解凍、使用する。

パルスプロトコールと解析方法：

記録はパッチクランプ実験用アンプ (Axopatch 200B Axon Instruments, Union City, CA), によって増幅し、専用ソフト (pclamp10, Axon Instruments) によって解析を行なった。

- (1) I - V relationship (電圧 電位曲線, I - V curve): Step pulse (5mV for 50 msec) を - 80 mV から + 40mV まで繰り返し (5sec 毎) 各電位で膜電流を記録した。休止期 (- 60 mV) の後、各 step の前には一定の保持電位 (- 80 mV for 50 msec) を与え (図 2) 各膜電位での最大電流から、I - V curve を求めた。
- (2) Activation curve : I - V curve から逆転電位 (E_{rev}) を求め、更に、膜電流 (I_m)、膜電位 (E_m) そして E_{rev} から膜 conductance (g_m = I_m / (E_m - E_{rev}) - すなわち、その膜電位での ion channel 透過性を求めた。

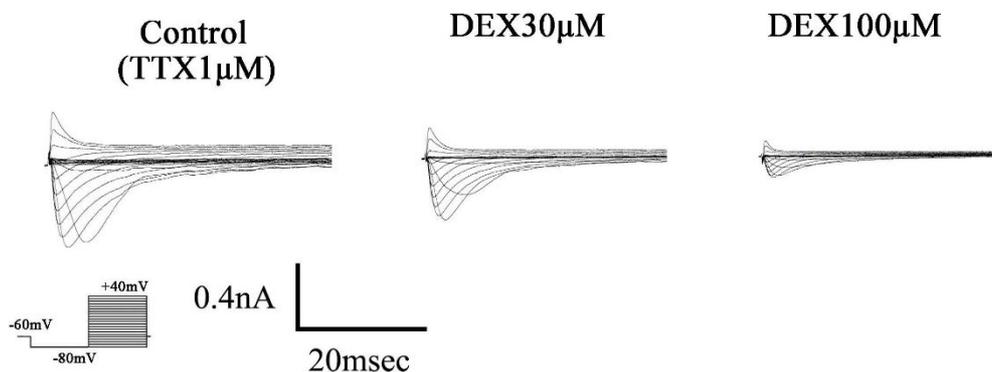


図 2 : DEX (0, 30, 100, 300 μM) による INaR 抑制

測定プロトコール：

- (1) TTX 1 μM 投与 5 分後に測定 (control)
- (2) DEX (各濃度 10, 30, 100, 300 μM) 局所灌流後 (20 秒) に測定

4 . 研究成果

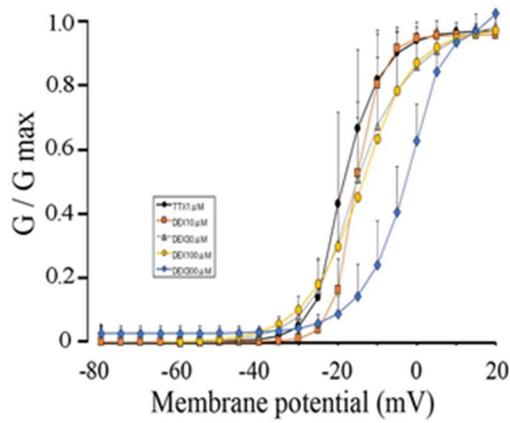
- (1) デクスメトミジンによる INaR 抑制の濃度-効果曲線 (図 3)

測定結果より 1 μM のデクスメトミジンで INaR が完全に阻害されるという仮定のもとで、300 μM のデクスメトミジンでの観察結果に基づいた値を用いてシグモイド曲線を示した。これにより DEX が INaR を濃度依存的に抑制する事を確認した (IC₅₀ = 128 μM, Hill slope 1.89)。

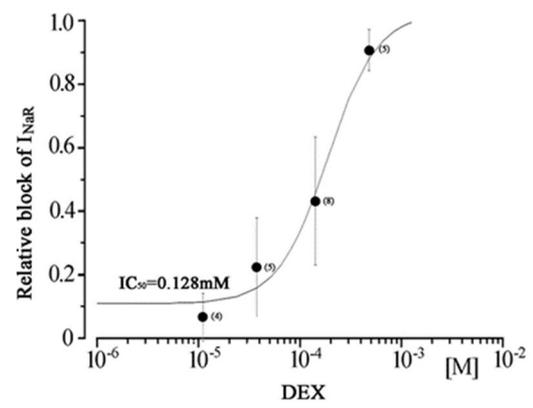
- (2) コンダクタンス-電圧 (活性化) 曲線 (図 4)

DEX は、INaR のピーク振幅の減少を誘導した。正規化されたコンダクタンス-電圧 (活性化) 曲線の V_{1/2} は、300 μM の DEX でのみ有意な右方向へのシフトが観察された (300 μM の DEX 非存在下および存在下でそれぞれ -17.8 および -2.2 mV)。また、slope factor (K) は DEX によって増加する傾向が見られた (DEX 非存在下では 3.75, 10, 30, 100, 300 μM DEX ではそれぞれ 2.84, 6.54, 6.67, 5.84)。

以上より、新生児ラットにおける我々の結果は、デクスメトミジンが侵害受容に関連するものを含む内臓求心性入力を伝える NG ニューロンにおいて TTX-R INa を抑制することを示している。この結果は、DRG ニューロンで観察された結果と一致しており¹⁾、TTX-R INa に対する dex の抑制効果は体性感覚に限らず、内臓感覚にも適用できることが示唆された。



(図 3) 濃度 - 効果曲線



(図 4) コンダクタンス - 電圧曲線

< 引用文献 >

- 1) Gu X-Y et al. Dexmedetomidine inhibits tetrodotoxin-resistant Nav1.8 sodium channel activity through G1/o-dependent pathway in rat dorsal root ganglion neurons. Molecular Brain 2015; 5:15 DOI 10.1186/s13041-015-0105-2.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nagakura Y, Ide R, Saiki C, Kitajima Y, Hashizume N, Imai T |
| 2. 発表標題 Localization of imidazoline 1 and 2-adrenergic receptors in newborn rat brainstem |
| 3. 学会等名 第97回日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ide R, Iwasaki K, Saiki C, Imai T, Matsumoto S. |
| 2. 発表標題 Dexmedetomidine suppresses rat nodose ganglion tetrodotoxin-resistant voltage-gated sodium current. |
| 3. 学会等名 Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|