

平成 22 年 5 月 20 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791554
 研究課題名 (和文) 下歯槽神経切断モデルラットにおける感覚異常発生と
 治癒のメカニズムの解析
 研究課題名 (英文) Analysis for mechanisms of development and recovery of allodynia
 in inferior alveolar nerve transaction model rats.
 研究代表者
 奥村 雅代 (OKUMURA MASAYO)
 松本歯科大学・総合歯科医学研究所・助教
 研究者番号：10362849

研究成果の概要 (和文)：神経因性疼痛モデルの一種である下歯槽神経切断モデルラットの三叉神経節における複数の遺伝子発現変動を確認した。またラットの延髄部にカテーテルを留置する方法を確立し、そこから投与した抗痙攣薬 Gabapentin がモデルラットに生じる感覚異常を抑制することを確認した。さらに、三叉神経節における遺伝子発現変動のうち、電位依存性カルシウムチャンネルのサブユニットである CACNA2D1 の変化のみが感覚異常の症状と共に抑制されることを見出した。

研究成果の概要 (英文)：I detected up-regulations of many gene expressions in trigeminal ganglion of inferior alveolar nerve (IAN) transaction model rat, one of many neuropathic pain model. The allodynia was inhibited by an anticonvulsant, gabapentin, which was infused to medullary through an indwelling catheter. Although many genes were up-regulated in the trigeminal ganglion of the IAN transacted rats, only the up-regulated expression of CACNA2D1, a subunit of voltage-dependent calcium channel, was reversed by gabapentin, along with inhibition of allodynia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	700,000	0	700,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	570,000	3,170,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：神経損傷、遺伝子発現、Gabapentin、CACNA2D1

1. 研究開始当初の背景

神経損傷による神経因性疼痛のモデルはいくつかあるが、それらの解析のほとんどは、感覚異常に伴って起こる各種現象を観察してはいるものの、損傷を受けた神経と感覚異

常が励起される領域を支配する神経が異なることには言及しておらず、また感覚異常発生のメカニズムと薬剤投与による治癒のメカニズムが同一のものであるのかも、よくわかっていなかった。モデル動物を用い

た疼痛研究は坐骨神経を対象にしたものが多く報告されているが、ここでは三叉神経系を用いた。三叉神経の神経線維の走行は叢構造もなく単純で、さらに、三叉神経節とその投射先である延髄部分はどちらも形態的に大きいために観察しやすく、損傷を受けている第Ⅲ枝神経の細胞体とその投射先、感覚異常をおこしている第Ⅱ枝神経の細胞体とその投射先、それぞれを分離して観察することが可能であるという利点がある。

2. 研究の目的

組織としての特徴を考慮して、ここでは三叉神経系を用いた。坐骨神経系を用いたモデルではよくわからないが、下歯槽神経切断モデルラットでは、損傷した下歯槽神経の支配領域は明らかに異なる、眼窩下神経の支配領域である口髭部において感覚異常が発症する。このモデルラットを用いて、非損傷神経の支配領域に発症する感覚異常について解析を行った。

また、神経因性疼痛モデルにおいては様々な薬剤の有効性が報告されているが、それらの作用機序はそれぞれ全く異なっており、モデルラットに生じた感覚異常が改善したとしても、薬剤によっては必ずしも発症原因そのものを解決したものばかりではないことが予想される。そこで本研究では、臨床的にも神経因性疼痛治療薬として用いられる、抗けいれん薬 gabapentin に注目して解析を行った。

(1) 神経損傷に伴って発現が上昇し、かつ神経因性疼痛の原因になると報告されている多くの遺伝子は、下歯槽神経切断モデルの三叉神経節でも発現上昇しているのか。またそれは損傷神経においてか、それとも感覚異常発症領域支配神経においてか。

(2) 非損傷神経の支配領域に発症する allodynia にも、他の神経因性疼痛モデル同様に gabapentin が有効であるのか。

(3) 薬剤投与によって allodynia が抑制されたのち、神経組織に観察されるいくつかの変化はどうなっているのか。そのままなのか、それとも神経損傷前の状態へと戻るのか。

3. 研究の方法

(1) 下歯槽神経切断モデルラットの作成
ペントバルビタールで深麻酔下にあるラットの片側の下顎部を切開して下顎骨を露出し、その表面を削って内部を走行する下歯槽神経を 1mm 幅で切除した後、筋と皮膚を縫合した。

(2) 延髄カテーテル留置法

ペントバルビタールで深麻酔下にあるラットの後頭部を切開し、後頭骨と第一頸椎の間の硬膜に針先程度の穴を開け、そこにポリエチレンチューブ (PE10) を、5cm 程度のチューブを体外に残して 1cm 程度挿入し、先端はプラグで封じた。そのまま筋と皮膚を縫合して、1 週間程度安静に飼育した。

(3) 薬剤投与

延髄カテーテルを留置したラットを 1 週間程度安静に飼育した後、下歯槽神経を切断した。さらに 1 週間後から、5 日間にわたって 200 μ g/day の gabapentin を延髄留置カテーテルから注入した。対照としては生理食塩水を同様に注入した。

(4) 機械刺激逃避閾値測定

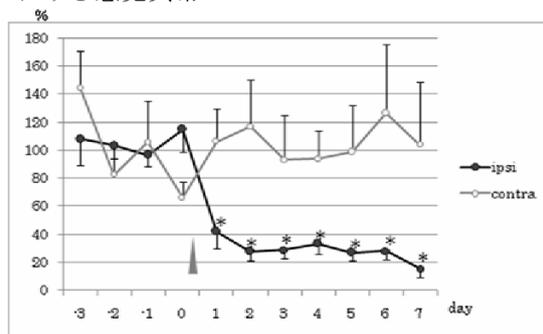
機械刺激としてラットの口髭部を von Frey filament にて刺激し、ラットが刺激から逃避する機械刺激の強度を測定した。測定は 1 日 1 回、測定後に手術や投薬等の処置を行った。

(5) リアルタイム PCR

ラットの三叉神経節を摘出し、下歯槽神経の細胞体を含む第Ⅲ枝領域と、眼窩下神経の細胞体を含む第Ⅰ枝第Ⅱ枝領域に分離した。それぞれから RNA を抽出、cDNA を合成した。解析対象とする遺伝子は所属研究室におけるこれまでの研究結果をもとに選別し、それぞれに対するプライマー及び蛍光標識プローブを合成した。TaqMan 法を用いて PCR 反応を行い、シグナルを解析した。

4. 研究成果

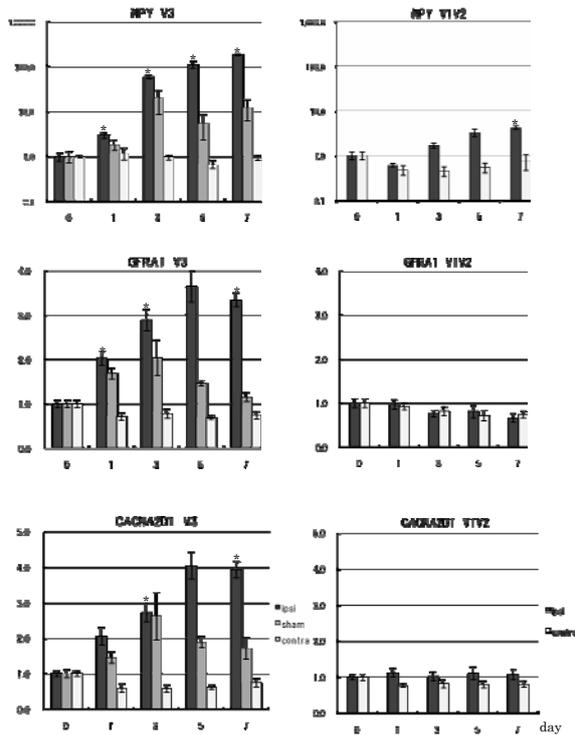
(1) 下歯槽神経切断モデルラットの口髭部における感覚異常



下歯槽神経切断後 1 日目から機械刺激逃避閾値の現象が認められ、allodynia が発症していることが確認された。

(2) 損傷神経における遺伝子発現の上昇

下歯槽神経切断後から 1 週間後までの三叉神経節における遺伝子発現をリアルタイム PCR にて調べたところ、多くの遺伝子の発現が上昇していることが確認できた。

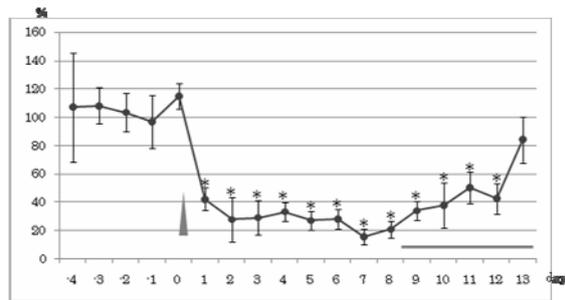


NPY、GAL、VIP、PAP といった多くの神経ペプチドの発現上昇が確認され、また GFRA1 (GDNF 受容体)、CACNA2D1 (電位依存性カルシウムチャネルのサブユニット) といった、allodynia 発症に深く関連していると報告のある遺伝子も発現上昇していた。しかし、これらの遺伝子の発現が上昇していたのは損傷神経である下歯槽神経の細胞体を含む第 III 枝領域においてのみであった。感覚異常を発症している口髭部は眼窩下神経に支配されているが、眼窩下神経の細胞体を含む三叉神経節第 I 枝第 II 枝領域においては大きな遺伝子発現変動は検出されなかった。

(3) 延髄カテーテル留置モデルの確立
gabapentin を投与するにあたっては、gabapentin の作用部位が脊髄であるとされていることを考慮して、延髄部に注入することとした。また連続投与の必要性から留置カテーテルを用いることとした。方法は、坐骨神経系の研究にて用いられる脊髄カテーテル留置法を改変した。硬膜下に挿入する部分が 1cm 程度と非常に短いので、脊髄カテーテル法のままでは抜け落ちてしまう例が多く見られた。そこで、ポリエチレンチューブの柔軟性を活かし、挿入部の直近に結び目を作り、筋の縫合時に一緒に縫合糸で縫いとめたところ、よく改善された。またチューブ挿入時にラットの延髄を傷つけてしまうと、意図した下歯槽神経損傷ではなく延髄損傷による感覚過敏が生じてしまうが、これはチューブ挿入時のラットの体制を鼻先を下向きに

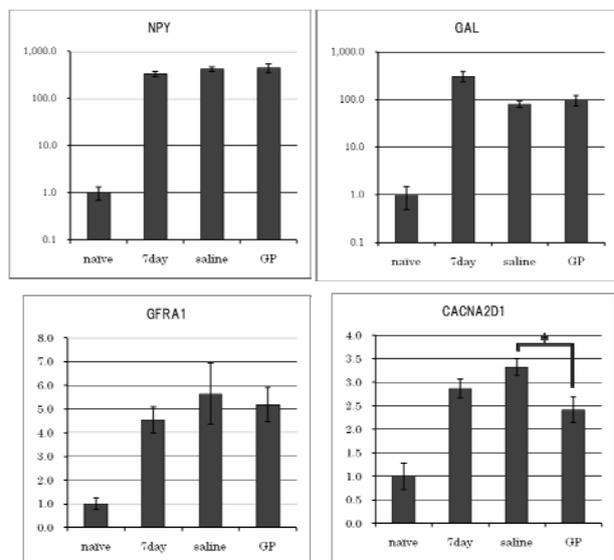
しっかり固定し、チューブの向きを上向きにして挿入するように、かつ実験者の技術向上により改善した。

(4) 下歯槽神経切断モデルにおける Allodynia に対する gabapentin の効果



下歯槽神経切断により allodynia を発症したラットに、8 日目から 5 日間にわたって gabapentin を投与したところ、他のモデルと同様に allodynia の改善がみられた。投与量 (200 μ g/day) は他の報告を参考にして決定したが、この少量で効果が見られたということは、作用部位も投与部位である延髄部であると考えられる。

(5) allodynia の抑制と遺伝子発現変動の関連



下歯槽神経切断により allodynia を発症したラットに、8 日目から 5 日間にわたって gabapentin (GP) もしくは生理食塩水 (saline) を投与した後、三叉神経節第 III 枝領域における遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR にて調べた。NPY、GAL、VIP のような神経ペプチドも GFRA1 も、生理食塩水投与群と gabapentin 投与群の間に差は見られず、gabapentin によって allodynia は回復しつつある状態にも関わらず遺伝子発現は上昇し

たままであった。しかし、CACNA2D1 のみは gabapentin 投与後に発現上昇の抑制が認められた。gabapentin の作用は CACNA2D1 に結合して電位依存性カルシウムチャネルの機能を阻害することであるので、これは CACNA2D1 が allodynia の発症と治癒に深く関与する物質であることを示すと同時に、CACNA2D1 は自身の働きによって自身の発現を調節している可能性を示唆している。また、gabapentin による allodynia 改善の後も他の遺伝子群の発現に変化が見られなかったことは、これらの遺伝子発現の抑制が必ずしも allodynia の改善とは結び付かないことを示している。

神経因性疼痛の治療薬は gabapentin のような抗けいれん薬のみではなく、抗鬱薬や、交感神経系に作用する薬剤など、全く作用機序の違うものも臨床的に使用されている。それらの薬剤によって治療した場合にはこれらの遺伝子発現はどう変化するか。また最近報告の多い脊髄におけるミクログリアなどのグリア細胞の活性化はそれぞれの治療法によりどう変化するか。今後の研究の進展により、神経損傷後の神経因性疼痛がいかに発症していかに治癒するのかが明らかになっていくと思われる。

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)

[学会発表] (計 5 件)

①奥村雅代、金銅英二、神経損傷によるアロディニアと遺伝子発現の変化に対する Gabapentin の効果、第 14 回日本口腔顔面痛学会学術大会、2009 年 7 月 25 日、東京、タワーホール船堀

②奥村雅代、金銅英二、神経損傷によるアロディニアと遺伝子発現の変化に対する Gabapentin の効果、第 31 回日本疼痛学会、2009 年 7 月 17 日、名古屋、名古屋国際会議場

③奥村雅代、金銅英二、下歯槽神経損傷に対する Gabapentin の影響、日本解剖学会第 68 回中部支部学術集会、2008 年 10 月 11 日、名古屋、名古屋市立大学医学部

④Masayo Okumura, Takeya Tanaka, Tadashi Tokizaki, Eiji Kondo, Gene expression in rat trigeminal ganglion neurons after inferior alveolar nerve injury. 12th WORLD CONGRESS ON PAIN, 2008 年 8 月 18 日、スコットランド・グラスゴー、Scottish Exhibition & Conference Centre

⑤奥村雅代、田中丈也、時崎匡史、姫野勝仁、金銅英二、下歯槽神経切断モデルラットの三叉神経細胞における遺伝子発現変動、第 8 回口腔顔面痛学会・第 12 回 JAOP 共催学術集会、2007 年 9 月 16 日、塩尻、松本歯科大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥村 雅代 (OKUMURA MASAYO)

松本歯科大学・合歯科医学研究所・助教

研究者番号：10362849

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：