

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10042

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるグリア細胞の抑制性介在ニューロンに対する役割に関する研究

研究課題名(英文) A study on the roles of glial cells against inhibitory interneurons in neuropathic pain states

研究代表者

寺山 隆司 (Terayama, Ryuji)

広島大学・医系科学研究科(歯)・教授

研究者番号：60333689

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)：本研究では末梢神経を損傷した後に損傷を受けた神経の中樞投射部位でのグリア細胞の活性化やニューロンの興奮性の変化するののかについて検討するとともにそれらの変化に關与する機構について検討した。神経損傷によって、損傷を受けた神経が接続する中枢の各部位でミクログリアとアストログリアの活性化がそれぞれ異なる時間経過で起こっていること、侵害刺激を与える部位を支配する神経あるいはその周囲を支配する神経を損傷した場合に侵害刺激に対する中枢投射部位でのニューロンの興奮性にそれぞれ異なる変化が起こること、またこのような変化には2次ニューロンへの収斂投射が關与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外傷や手術などで末梢神経を損傷した後に、痛覚異常が長期間持続する場合があるが、本研究はその病態の発症や持続に損傷を受けた神経だけでなくその神経が接続する脊髄や脳幹などの中枢神経系での変化も関わっていることを示すものである。その中枢神経系における変化では感覚情報を伝達するニューロンだけでなくその周囲に存在するグリア細胞での変化も生じ、さらにニューロンとグリア細胞のネットワークによる相互作用も關与していることを本研究では検討してきた。今後このような研究成果が蓄積されていくことで難治性疼痛の原因究明や治療法の確立につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, peripheral nerves were injured and the activation of glial cells and changes in neuronal excitability were examined in the central terminal region of injured nerve. Mechanisms underlying these changes were also investigated. Differential activation of microglia, astroglia revealed in the CNS after peripheral nerve injury. Differential changes in neuronal excitability in the CNS were also observed after peripheral nerve injury when noxious stimuli were applied to the area or the surrounding one innervated by the injured nerve. Convergent primary nociceptive input through neighboring intact nerves may contribute to these changes and pathogenesis of neuropathic pain.

研究分野：神経解剖学

キーワード：痛覚異常 神経損傷 収斂投射 ミクログリア 三叉神経知覚核群 脊髄

1. 研究開始当初の背景

生理的な疼痛は生体の侵害防御反応として必要であるが、神経障害性疼痛などの病的な疼痛は罹患者の大きな苦しみであり、これを取り除くことは医療上の重要な課題である。神経障害性疼痛は末梢あるいは中枢神経系の損傷または機能障害によって起こることが知られている。病的な疼痛の中でも口腔顔面痛はその症状自体の苦痛に加えて、摂食や会話など口腔顔面の機能を障害する場合が多いため、その原因や発症機序を解明し、予防法や治療法を確立することは歯学研究の重要な課題の一つである。

神経障害性疼痛の発症機序や治療法に関して様々な研究が行われてきた。その中で我々は主に脊髄神経系において神経損傷や末梢組織の炎症による末梢神経の持続的な興奮によって、その1次ニューロン自身あるいはその神経が接続する2次ニューロン、さらにはより上位中枢の神経回路で形態的・機能的変化が起こることを明らかにしてきた。これらは痛覚異常の発症がニューロンの可塑性と関連していることを示すものである。一方、中枢および末梢神経系の損傷後にニューロン以外の神経組織の構成要素であるアストログリアやミクログリアが脊髄で活性化することが明らかとなった。活性化したグリア細胞ではMAPキナーゼの活性化が認められるとともに神経栄養因子、各種サイトカインやケモカインを放出しニューロンによる神経伝達を積極的に修飾していることが最近の研究で報告されてきている。したがって、神経障害性疼痛の発症や持続においては、ニューロンとグリア細胞との相互作用が関与していると考えられる。また神経損傷後に、損傷を受けた神経が中枢投射する2次ニューロンにおいて、周囲の損傷を受けていない神経からの収斂投射が起こり、神経障害性疼痛の発症につながることを示された。この収斂投射にはGABA作動性の抑制性介在ニューロンの脱抑制が関与し、この抑制性介在ニューロンに対してグリア細胞からの情報伝達物質が作用している可能性が考えられる。本研究はこれまでの研究を踏まえ、口腔顔面領域を支配する三叉神経の枝を損傷した場合にその中枢投射領域である脳幹に存在する三叉神経知覚核群でのグリア細胞の活性化ならびに侵害情報伝達の変化を検討するものである。

2. 研究の目的

本研究では、口腔の知覚を支配する舌神経や下歯槽神経を損傷した後に各グリア細胞の活性化やニューロンの興奮性の変化、またそれらの変化に関与する機構を解明することを目的とする。

具体的には、

- 1) 口腔・顔面の知覚を支配する神経を損傷し、その神経の中枢投射領域である三叉神経知覚核群でのグリア細胞の活性化を分析する。(実験1)
- 2) 三叉神経知覚核群での侵害情報伝達における舌神経あるいは下歯槽神経損傷の影響について検討する(実験2)
- 3) 神経損傷後に起こる三叉神経脊髄路核尾側亜核における収斂投射について検討する(実験3)。

3. 研究の方法

1) 末梢神経損傷後の中枢内グリア細胞の活性化について

ラットに全身麻酔を施し、舌神経を結紮・切断する。神経損傷後2時間, 1, 3, 7, 14日でパラホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝液で灌流固定し、三叉神経知覚核群を含む脳幹部を摘出した。脳幹の試料からマイクロトームを用いて凍結切片を作製し、浮遊切片としてミクログリア、アストログリアそれぞれのマーカー抗体(OX-42とGFAP)を用い、蛍光免疫染色を行い、ミクログリアとアストログリアの活性化について定量的に検討した。

2) 三叉神経知覚核群での侵害情報伝達における舌神経あるいは下歯槽神経損傷の影響について
全身麻酔下でラットの舌神経あるいは下歯槽神経を結紮・切断し、神経損傷後 14 日において舌へのカプサイシン塗布を行い、カプサイシン塗布後 5 分または 2 時間後で灌流固定、三叉神経知覚核群を含む脳幹部を摘出し、c-Fos タンパクの発現および ERK のリン酸化を免疫染色により検出した。三叉神経知覚核群各部位における陽性細胞数をカウントし各神経損傷の影響を検討した。

3) 神経損傷後に起こる三叉神経脊髄路核尾側亜核における収斂投射について

全身麻酔下のラットの下歯槽神経を結紮・切断し、損傷後 3 日、7 日、14 日で舌へのカプサイシン塗布および切断した下歯槽神経への高閾値電気刺激を行い、カプサイシン塗布後 2 時間、電気刺激後 5 分で灌流固定、尾側亜核を含む脳幹部を摘出し、尾側亜核における c-Fos タンパクの発現（カプサイシンにより誘発）および ERK のリン酸化（電気刺激により誘発）を蛍光 2 重染色により同一切片上で検出することで収斂投射の検討を行った。

4. 研究成果

1) 末梢神経損傷後の中枢内グリア細胞の活性化について

舌神経損傷後に三叉神経知覚核群の各部位でミクログリアおよびアストログリアの活性化が起こっていることが明らかとなった（図 1）。これらの変化は三叉神経知覚核群の中で主知覚核、脊髄路核吻側亜核、尾側亜核で顕著に認められたが、脊髄路核中位亜核ではあまりに止められなかった。ミクログリアの活性化は神経損傷後 1 日から認められ、3 日をピークに増加し、その後 14 日までにベースラインに戻るということが明らかになった。それに対してアストログリアは神経損傷後 3 日以降活性化が認められ、7 日をピークに増加し、14 日以降でも増加していることが明らかとなった（図 2）。これらの結果から末梢神経を損傷することによって、その中枢投射部位である三叉神経知覚核群の各部位でミクログリアの活性化が比較的早期に起こり、それに引き続いてアストログリアの活性化が引き起こされることが明らかとなった。

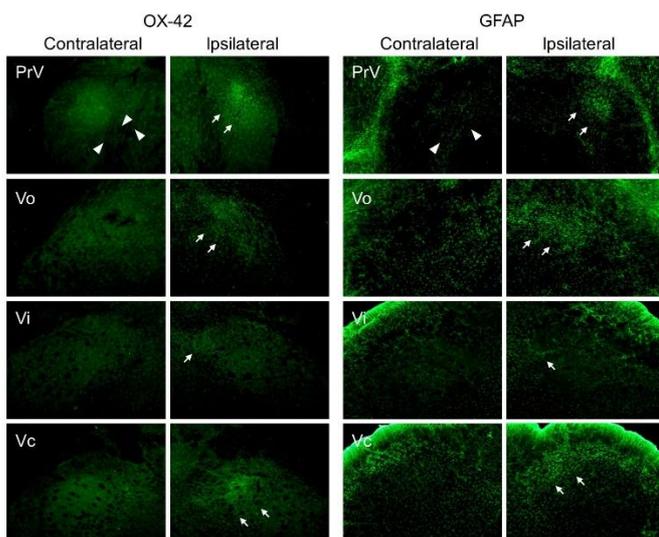


図 1. 舌神経損傷後の三叉神経知覚核群での OX-42（ミクログリア）と GFAP（アストログリア）の免疫染色像

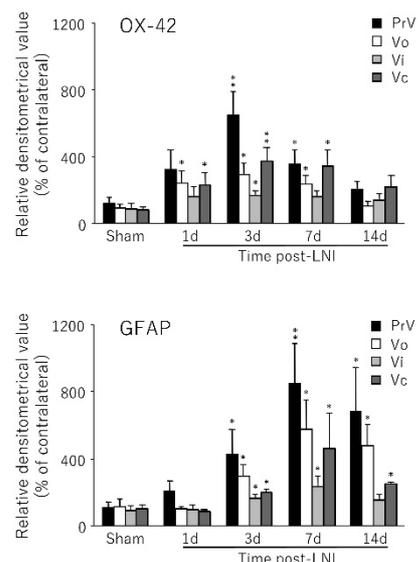


図 2. 舌神経損傷後の三叉神経知覚核群での OX-42 と GFAP の免疫染色像の定量的解析

2) 三叉神経知覚核群での侵害情報伝達における舌神経あるいは下歯槽神経損傷の影響について
この研究ではラット舌背へのカプサイシン塗布による三叉神経知覚核群各部位での c-Fos タンパクおよびリン酸化型 ERK(p-ERK)の誘発における舌神経あるいは下歯槽神経損傷の影響を検

討した。手術を伴わないラットあるいは各神経損傷手術に対する擬似手術を施したラット舌背へのカプサイシン塗布によって多くの c-Fos および p-ERK 陽性細胞が三叉神経脊髄路核尾側亜核で両側性に誘発された。舌背へのカプサイシン塗布により、三叉神経脊髄路核吻側亜核においても数は少ないながらも c-Fos および p-ERK 陽性細胞の誘発が両側性に認められた。舌神経損傷後 14 日において、神経損傷側の尾側亜核でカプサイシン塗布による c-Fos および p-ERK 陽性細胞数の有意な減少が認められた(図 3 および 4)。下歯槽神経損傷後 14 日において、神経損傷側の尾側亜核でカプサイシン塗布による c-Fos 陽性細胞数の有意な増加が認められたが、p-ERK 陽性細胞数に変化は認められなかった(図 3 および 4)。舌神経あるいは下歯槽神経損傷後 14 日において、両側の吻側亜核でカプサイシン塗布による c-Fos および p-ERK 陽性細胞数の有意な増加が認められた(図 3 および 4)。これらの結果から、通常の侵害受容伝達において c-Fos および p-ERK は同様に誘発されるが、神経損傷後の侵害受容伝達では両者の誘発に相違が認められることが明らかとなり、三叉神経知覚核群での c-Fos および p-ERK 誘発における各神経損傷の異なる影響は神経障害性疼痛症状の複雑性に関与している可能性が考えられた。

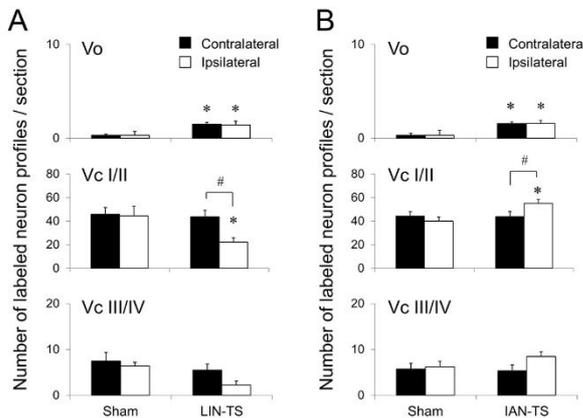


図 3. 舌神経 (A) または下歯槽神経 (B) 損傷後のカプサイシンの舌への塗布によって誘発する尾側亜核 (Vo) および尾側亜核 I/II 層 (Vc I/II)、尾側亜核 III/IV 層 (Vc III/IV) における c-Fos 陽性細胞数

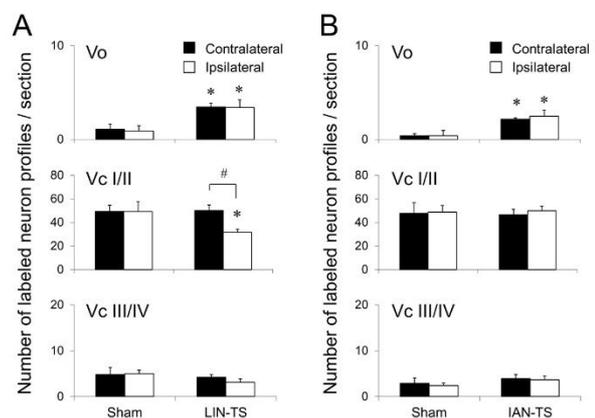


図 4. 舌神経 (A) または下歯槽神経 (B) 損傷後のカプサイシンの舌への塗布によって誘発する尾側亜核 (Vo) および尾側亜核 I/II 層 (Vc I/II)、尾側亜核 III/IV 層 (Vc III/IV) における p-ERK 陽性細胞数

(3) 神経損傷後に起こる三叉神経脊髄路核尾側亜核における収斂投射について

この研究では末梢神経損傷後における c-Fos 過剰応答および神経障害性疼痛への尾側亜核での収斂投射の関与を検討した。下歯槽神経損傷後の各時間経過で、舌にカプサイシン塗布による侵害刺激を与るとともに下歯槽神経に高閾値電気刺激による侵害刺激を与え、それぞれ c-Fos タンパクの発現と ERK のリン酸化を同一切片上での検出を試みた。カプサイシン塗布によって誘発される c-Fos 陽性細胞数は下歯槽神経損傷後に増加したが、損傷した下歯槽神経への電気刺激によって誘発されるリン酸化型 ERK 陽性細胞数には変化は見られなかった(図 5 および 6)。収斂投射を受けていると考えられる 2 重陽性細胞は下歯槽神経損傷後に有意に増加した(図 5 および 6)。また下歯槽神経損傷後にカプサイシン塗布による侵害受容行動が増大することも明らかとなった。これらの結果から末梢神経損傷後に起こる中枢投射部位での収斂投射が c-Fos 過剰応答および神経障害性疼痛の病態に関与していることが示唆された。

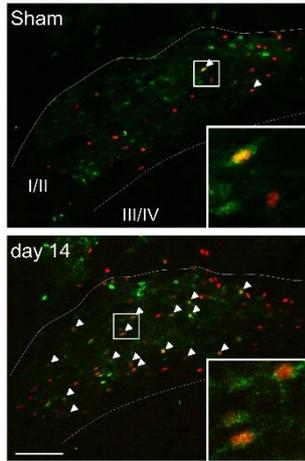


図 5. 下歯槽神経損傷あるいは擬似手術後 14 日に舌へのカプサイシン塗布(c-Fos; red)および下歯槽神経への電気刺激(p-ERK; green)による尾側亜核での陽性像

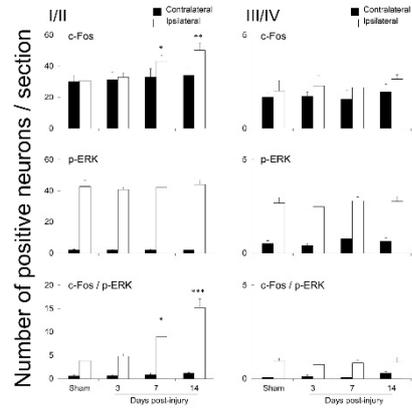


図 6. c-Fos、 p-ERK および 2 重陽性細胞数の経時的変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Terayama R, Uchibe K	4. 巻 -
2. 論文標題 Reorganization of synaptic inputs to spinal dorsal horn neurons in neuropathic pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Int J Neurosci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/00207454.2021.1873980	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hiyama S, Yokoi M, Akagi Y, Kadoyama Y, Nakamori K, Tsuga K, Uchida T, Terayama R	4. 巻 50
2. 論文標題 Osteoclastogenesis from bone marrow cells during estrogen-induced medullary bone formation in Japanese quails.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Mol Histol.	6. 最初と最後の頁 389-404
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10735-019-09835-x.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ayaka Nakatani, Ryo Kunimatsu, Yuji Tsuka, Shuzo Sakata, Kayo Horie; Hidemi Gunji, Shota Ito, Isamu Kado, Nurul Aisyah Rizky Putranti, Ryuji Terayama, and Kotaro Tanimoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of high-frequency near-infrared diode laser irradiation on pain induced by experimental tooth movement in rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Lasers med sci	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺山隆司 内部健太
2. 発表標題 神経障害性疼痛に対するアデノシンA3 レセプターアゴニストの作用機序
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内部健太 寺山隆司
2. 発表標題 軟骨細胞におけるレチノイン酸シグナルの機能解析
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺山隆司
2. 発表標題 神経障害性疼痛に対するアデノシンA3アゴニストの効果
3. 学会等名 日本解剖学会第74回中国・四国支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺山隆司
2. 発表標題 アデノシンA3アゴニストはミクログリアの活性化と収斂投射を抑制することで神経障害性疼痛を減弱させる
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺山隆司
2. 発表標題 末梢神経損傷後の痛覚異常と脊髄後角における変化
3. 学会等名 第24回一般社団法人日本口腔顔面痛学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺山隆司, 内部健太
2. 発表標題 神経障害性疼痛におけるミクログリア活性阻害の効果
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺山隆司, 内部健太
2. 発表標題 アデノシンA3レセプターの活性化は末梢神経損傷後の痛覚異常を抑制する
3. 学会等名 第44回日本神経科学大会
4. 発表年 2021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
研究協力者	内部 健太 (UCHIBE kenta)		
研究協力者	中谷 文香 (NAKATANI ayaka)		

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
---------	---------