

令和 4 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19192

研究課題名(和文)ドーパミン神経系が口腔顔面領域の神経障害性疼痛の緩和に關与するメカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism by which the dopamine nervous system is involved in the relief of orofacial neuropathic pain

研究代表者

前川 博治 (Maegawa, Hiroharu)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：10711012

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、眼窩下神経を結紮して作製したラットのA11細胞群に、ドーパミンD2受容体作動薬を微量注入すると、機械刺激に対する過敏性が減弱すること、またVcに発現するpERK免疫陽性細胞数が減少することがわかった。この結果は、口腔顔面領域の神経障害性疼痛の場合にも、A11細胞群がその症状の変化に關与すること、A11細胞群へのドーパミンD2受容体作動薬が症状を減弱することを示唆する。また、これらの反応は、A11細胞群の活動の変化が、Vcの活動に変化を惹起することを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果から、ドーパミン神経系の一つであるA11細胞群は、眼窩下神経を結紮して作製した神経障害性疼痛モデルラットの症状を変化させうることが示された。ドーパミン神経系を介して、神経障害性疼痛の緩和が可能であるならば、治療法につながるものが考えられ、神経障害性疼痛患者のQOLの改善に寄与するものとなる。本研究はそれに関して基礎的なデータを提供することができたと考える。

研究成果の概要(英文)： We found that microinjection of dopamine D2 receptor agonist into the A11 nucleus attenuated mechanical hypersensitivity and decreased pERK immunoreactive cells in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) in rats with ligation of the infraorbital nerve. These findings suggest that the A11 nucleus is involved in orofacial neuropathic pain and administration of dopamine D2 receptor agonist into the A11 nucleus attenuates symptom of orofacial neuropathic pain. These reaction suggests that changes in the activity of the A11 nucleus evoke changes in the activity of the Vc.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛 A11細胞群 ドーパミンD2受容体作動薬 三叉神経 pERK

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は神経系の原発性あるいは機能障害によって生じる痛みであり (Loeser JD and Treede RD, 2008, The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology, Pain 137, 473-477.) 消炎鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬が奏功しにくいという特徴がある。そのため、神経障害性疼痛患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) が損なわれる。神経障害性疼痛の治療には、抗てんかん薬や抗うつ薬を用いた薬物療法が行われるが、十分な効果が得られない場合 (Finnerup NB et al., Pain 2005, 118, 289-305.) や、副作用のために十分な量の薬剤が服用できない場合がある。そのため、患者の QOL の改善のために、作用機序の異なる鎮痛薬が必要とされている。

ドーパミン神経系が痛みの処理に関係することが報告されている (Chudler EH and Dong WK, 1995, The role of the basal ganglia in nociception and pain, Pain 60 3-38.) われわれが以前に報告した、パーキンソン病モデルラットが痛覚過敏の状態にあること (Maegawa H et al., Neurosci Res 2015, 96, 59-68.) もそれを示唆する。神経障害性疼痛とドーパミン神経系との関係についての研究は行われているものの少なく、また、口腔顔面領域の神経障害性疼痛とドーパミン神経系との関係については調べられていなかったことから、われわれはそれについての研究を行った。眼窩下神経を結紮して作製した神経障害性疼痛モデルラットに、ドーパミン D2 受容体作動薬を投与すると、症状の一つであるアロディニアが抑制されることを報告した (Maegawa H et al., Dopaminergic Modulation of Orofacial Mechanical Hypersensitivity Induced by Infraorbital Nerve Injury. 2019, Int J Mol Sci 21, 1945.)。しかし、神経障害性疼痛とドーパミン神経系との関係については、その一部が明らかにされただけで、その詳細については未だ明らかにされていない。研究を進めることで、新たな治療薬につながる、疼痛緩和のための標的を発見できる可能性がある。

2. 研究の目的

以前から行ってきた研究を進め、ドーパミン神経系の一つである A11 細胞群に着目し、ドーパミン神経が神経障害性疼痛を緩和するメカニズムを明らかにすることが目的である。A11 細胞群は脊髄後角や延髄後角にドーパミン作動性の投射を持つことが知られている (Abdallah et al., 2015, Pain 156, 644-655.)。本研究では、A11 細胞群の活動の変化が、神経障害性疼痛の症状に変化を起こすという仮説を検証するために、眼窩下神経を結紮して作製した神経障害性疼痛モデルラットの A11 細胞群に、ドーパミン D2 受容体作動薬あるいは拮抗薬を微量注入して、神経障害性疼痛の症状に変化が生じるか検討する。

3. 研究の方法

ラットの眼窩下神経 (infraorbital nerve: ION) を結紮して神経障害性疼痛モデルラットを作製した (chronic constriction injury: CCI)。フォンフライ毛を用いて、機械刺激に対する逃避反応の閾値が低下 (6g 以下) している (機械刺激に対する過敏性を示す) 個体を CCI モデルラット (ION-CCI) として以降の実験に使用した。神経結紮を除く同様の手術をしたラットを対照群 (sham) とした。

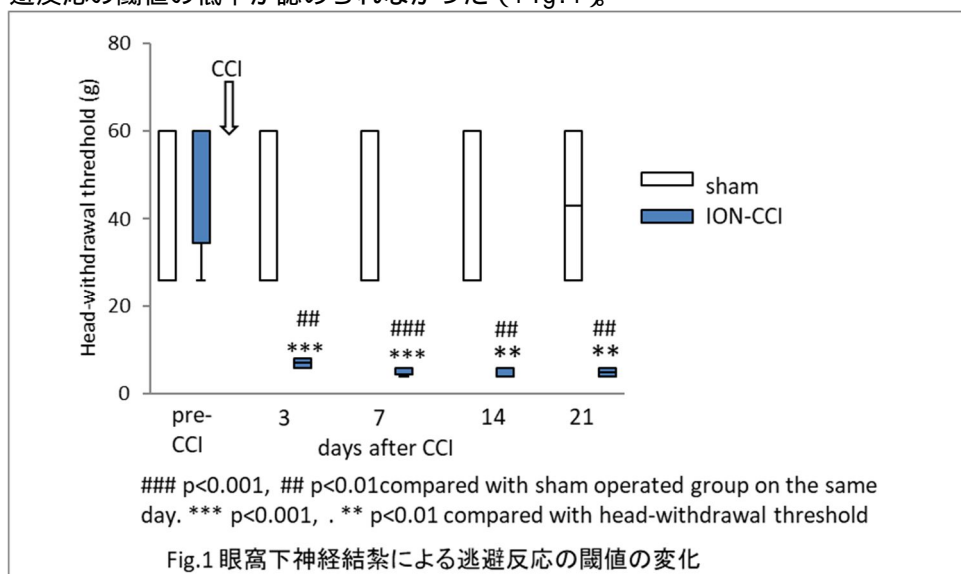
眼窩下神経結紮の 14 日後に、15g のフォンフライ毛を用いて 1Hz、5 分間鼻毛部を刺激した。刺激の 2 時間後に灌流固定を行い、脳を取り出した。A11 細胞群の凍結切片 (50 μ m) を作製し、c-Fos に対する免疫染色を行い、A11 細胞群に発現する c-Fos 免疫陽性細胞数を顕微鏡下に観察し、3 枚ごとに選択した切片の c-fos 免疫陽性細胞数の合計を計算した。

眼窩下神経の結紮の 7 日後に、A11 細胞群に対する薬剤投与用の金属カニューレをラットの頭蓋骨に設置した (Bregma の 3.9mm 尾側、正中から 0.5mm 左側、脳表から 6mm 腹側)。その 7 日後に、ドーパミン D2 受容体作動薬 quinpirole (20 μ g/0.25 μ L)、D2 受容体拮抗薬 eticlopride (45 μ g/0.25 μ L)、生理食塩水 (0.25 μ L) を、カニューレを通して A11 細胞群に微量注入し、その 20 分後から、機械刺激に対する逃避反応の閾値の測定を行った。また、同様に微量注入した 20 分後に、15g のフォンフライ毛を用いて 1Hz、5 分間鼻毛部を刺激した。刺激の 5 分後に灌流固定を行い、脳を取り出した。三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) を含む脳幹部の凍結切片 (50 μ m) を作製し、pERK に対する免疫染色を行った。Vc 表層に発現する pERK 免疫陽性細胞数を顕微鏡下に観察し、陽性細胞数の多い連続した切片 5 枚を選択して、切片 1 枚当たりの pERK 免疫陽性細胞数を計算した。また、薬剤を微量注入したラットに対して、凍結切片を作製し、注入部位の確認を行った。行動学的データについては、二元配置反復測定分散分析後に Bonferroni 法による多重比較を、免疫組織学的データについては、一元配置分散分析後に Bonferroni 法による多重比較を行った。p < 0.05 を有意とした。

4. 研究成果

眼窩下神経結紮の前後で、機械刺激に対する逃避反応の閾値を測定した。統計分析の結果、時間要因と処置要因との間に有意な交互作用が認められた [F(4,40) = 8.20, p < 0.001]。眼窩下神経を結紮したラット (n = 6) は、神経結紮の 3 日後から機械刺激に対する逃避反応の閾値の

低下を示し、それは神経結紮の21日後まで持続した(3, 7日後, $p < 0.001$; 14, 21日後, $p < 0.01$)。また、測定を行った各時点で、sham群($n = 6$)に比べ、有意な閾値の低下を示した(7日後, $p < 0.001$; 3, 14, 21日後, $p < 0.01$)。Sham群のラットには、機械刺激に対する逃避反応の閾値の低下が認められなかった(Fig.1)。



眼窩下神経を結紮した14日後に、15gのフォンフライ毛を用いて1Hz、5分間鼻毛部を刺激した。2時間後に灌流固定し、c-Fosに対する免疫染色を行い、A11細胞群にc-Fos免疫陽性細胞が認められた(Fig.2A)。ION-CCIとshamの両群においてc-Fos免疫陽性細胞は、A11細胞群の吻側から尾側にわたる全域に認められ、また、各切片において、c-Fos免疫陽性細胞数に左右差は認められなかった。作製した切片を3枚毎に選択し(10枚)、両側のA11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞数を計測し、合計数を計算した。ION-CCI群($n = 7$)のA11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞数は 212 ± 29.3 個、sham群($n = 7$)のc-Fos免疫陽性細胞数は 155 ± 17.3 個であり、有意差は認めなかった(Fig.2B)。

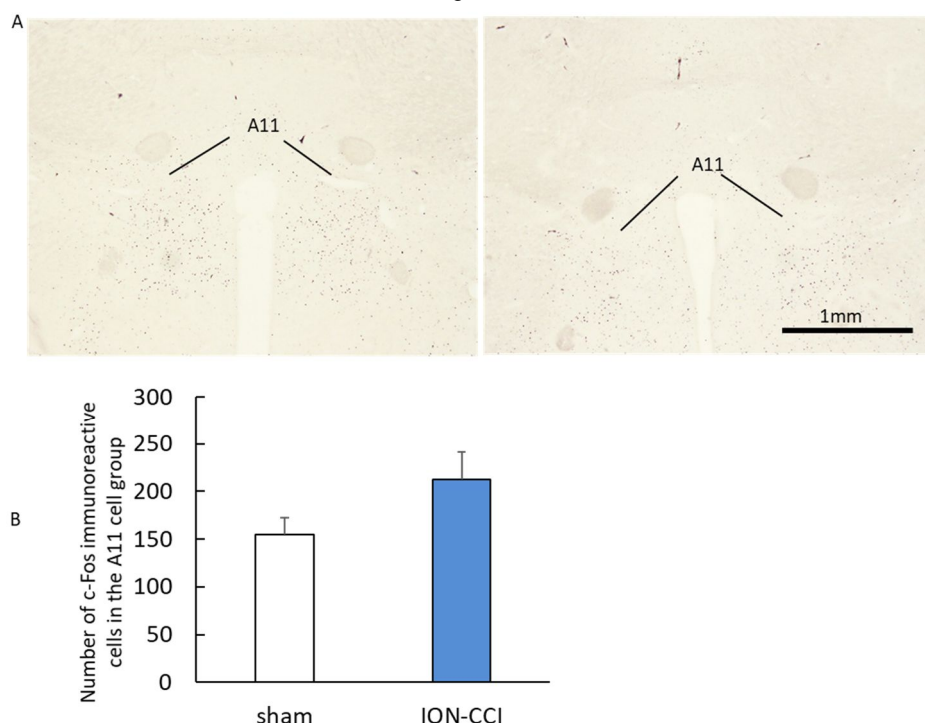


Fig. 2 A11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞
(A)A11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞の顕微鏡写真 (B)A11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞数

薬剤を微量注入したラットに対しては、凍結切片を作製し、注入部位の確認を行った(Fig.3)。薬剤の注入部位は各群ともに、Bregmaから3.3から3.9mm尾側の範囲に分布していた。

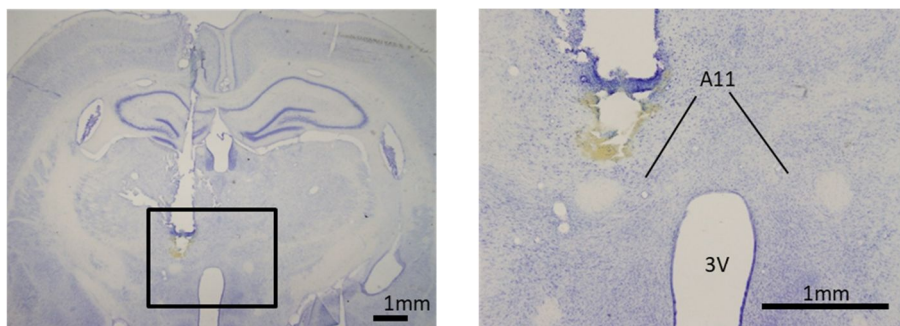


Fig. 3 A11細胞群に微量注入を行った際の注入部位の顕微鏡写真

A11細胞群に薬剤を微量注入した後、機械刺激に対する逃避反応の閾値を測定した。統計分析の結果、時間要因と薬剤要因に有意な交互作用を認められた[F(6,18) = 24.436, $p < 0.001$]。多重比較を行った結果、A11細胞群にquinpiroleを注入したION-CCIラット(CCI+quinpirole群, $n = 7$)は、注入前と比較して、注入20分後と40分後において有意な閾値の上昇を示した($p < 0.001$, Fig.4A)。また、CCI+quinpirole群は、A11細胞群に生理食塩水、あるいはeticloprideを注入したION-CCIラット(CCI+saline群, CCI+eticlopride群, 各群 $n = 7$)と比較して、注入後20分後と40分後の閾値が有意に上昇した($p < 0.001$)。また、同様にA11細胞群に薬剤を微量注入した20分後にフォンフライ毛を用いて、鼻毛部に機械刺激を加えた後、灌流固定し、脳の凍結切片を作製し、pERKに対する免疫染色を行った。Vc表層にはpERK免疫陽性細胞が認められ、各群ともにobexから尾側に1.4mmの部位に最大の陽性細胞数を認めた(Fig.4B)。統計分析の結果、切片一枚当たりのpERK陽性細胞数には有意な主効果が認められた[F(2,102)=84.604, $p < 0.001$]。多重比較の結果、CCI+quinpirole群のpERK免疫陽性細胞数は、CCI+saline群とCCI+eticlopride群に対して有意な減少を示した(15.9 ± 0.4 vs. 27 ± 0.72 , $p < 0.001$, 15.9 ± 0.4 vs. 31.4 ± 0.72 , $p < 0.001$, Fig.4C)。また、CCI+eticlopride群のpERK免疫陽性細胞数は、CCI+saline群に対して有意な増加を示した(27 ± 0.72 vs. 31.4 ± 0.72 , $p < 0.01$)。本研究の結果から、ドーパミン神経系の一つであるA11細胞群は、眼窩下神経を結紮して作製した神経障害性疼痛モデルラットの症状を変化させることが示された。

A11細胞群にはドーパミンD2受容体が存在することが報告されている(Bouthenet et al., Neurosci 1987, 20, 117-115.)。また、A11細胞群にドーパミンD2受容体作動薬を注入すると、脊髄神経を結紮したラットの機械刺激に対する過敏性を減弱することが報告されている(Wei et al., Pharmacol Res 2009, 59, 355-363)。本研究では、眼窩下神経を結紮して作製したラットのA11細胞群に、ドーパミンD2受容体作動薬を微量注入すると、機械刺激に対する過敏性が減弱すること、またVcに発現するpERK免疫陽性細胞数が減少することがわかった。この結果は、口腔顔面領域の神経障害性疼痛の場合にも、A11細胞群がその症状の変化に関与すること、A11細胞群へのドーパミンD2受容体作動薬が症状を減弱することを示唆する。また、これらの反応は、A11細胞群の活動の変化が、Vcの活動に変化を惹起することを示唆する。

本研究では、A11細胞群に発現するc-Fos陽性細胞数を計測したが、sham群とION-CCI群との間に有意差は認められなかった。A11細胞群には3種類のニューロン、すなわちドーパミン含有ニューロン、gamma-aminobutyric acid (GABA)含有ニューロン、calcitonin gene-related peptide (CGRP)含有ニューロンが存在することが知られている(Skageberg et al., Brain Res 1985, 342, 340-351; Pappas et al., J Comp Neurol 2010, 518, 2423-2436)。A11細胞群に発現するc-Fos免疫陽性細胞は、これら3種類のニューロンの活動性を合わせたものと考えられる。各ニューロン別にその活動性を比較した場合には、sham群とION-CCI群との間に差が認められた可能性がある。

VcにはドーパミンD2受容体が存在し(Bregerot et al., Ann Neurol 2007, 61, 251-262; Lapirot et al., Pain 2011, 152, 1821-1831; Liu et al., Pain 2019, 160, 334-344)。Vcにドーパミン受容体作動薬を注入するとc線維の反応を抑制することが報告されている(Lapirot et al., Pain 2011, 152, 1821-1831)ことから、Vcの活動の調節にはドーパミン受容体も関与していることが示唆される。神経障害性疼痛の場合、Vcに発現するドーパミン受容体の発現量や、ドーパミンに対する感受性に変化が生じている可能性がある。また、A11細胞群に含有されるドーパミン量に変化が生じている可能性もある。これらの事項は今後の研究において明らかにする必要がある。ドーパミン神経系を介して、神経障害性疼痛の緩和が可能であるならば、治療法につながるものが考えられ、神経障害性疼痛患者のQOLの改善に寄与するものとなる。本研究はそれに関して基礎的なデータを提供することができたと考える。

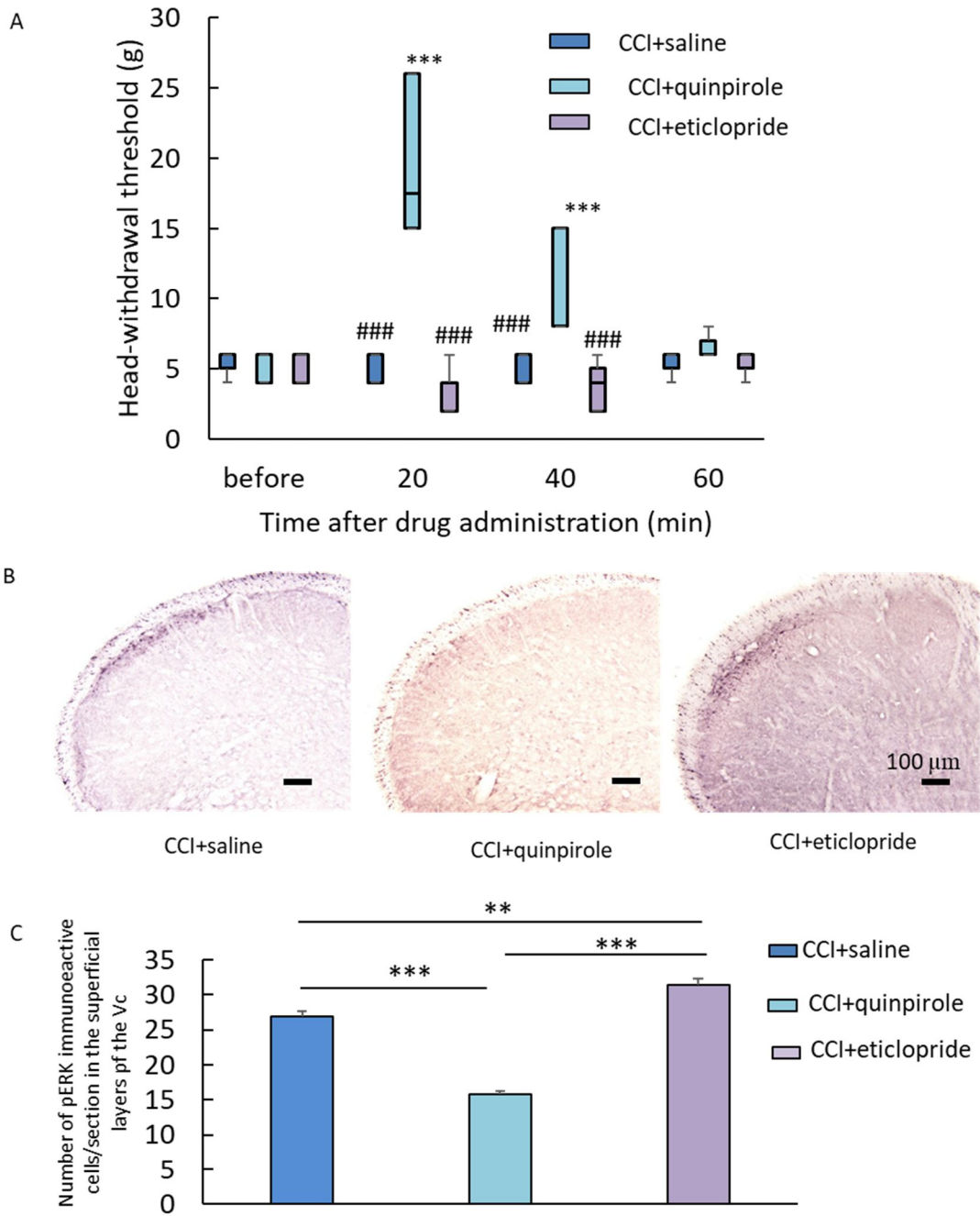


Fig. 4 A11細胞群に対するドーパミンD2受容体作動薬あるいは拮抗薬の微量注入がアロディニアに与える影響. (A)微量注入後の逃避反応を起こす閾値の変化. ### $p < 0.001$ compared with CCI+quinpirole group on the same time. *** $p < 0.001$ compared with head-withdrawal threshold before microinjection. (B)Vcに発現するpERK免疫陽性細胞の顕微鏡写真. (C)切片1枚当たりのVcのpERK免疫陽性細胞数. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maegawa Hiroharu, Usami Nayuka, Kudo Chiho, Hanamoto Hiroshi, Niwa Hitoshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Dopaminergic Modulation of Orofacial Mechanical Hypersensitivity Induced by Infraorbital Nerve Injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1945 ~ 1945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms21061945	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 前川 博治、本城 有華、藤田 雅俊、宇佐美 奈由香、丹羽 均
2. 発表標題 眼窩下神経結紮ラットの機械刺激に対するアロディニアへの A11 細胞群の関与
3. 学会等名 第49回日本歯科麻酔学会学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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