

平成 22 年 5 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791540
 研究課題名（和文） 顎顔面部外傷性および神経因性疼痛における幹細胞移植による細胞再生メカニズムの解明
 研究課題名（英文） Regenerative mechanism by inoculation of neural stem cells on orofacial injury and neuropathic pains.
 研究代表者
 甲斐 絢 (KAI AYA)
 九州歯科大学・歯学部・特別研修員
 研究者番号：80453231

研究成果の概要（和文）：何らかの手術後や炎症、傷害、癌の発生などによって、本来痛みとならない刺激により痛みが生じるような異常疼痛が発生することがよく知られている。口腔顔面領域における異常疼痛の発生は、摂食困難に陥るため、症状はより重篤となる。この発生メカニズムや効果的な治療法に関しては未だ不明な点も多い。そこで、本研究ではラット炎症モデルと癌モデルにおける抗炎症剤による異常疼痛抑制効果を検討したところ、炎症誘発異常疼痛には効果が認められたが、癌誘発異常疼痛にはほとんど影響が見られなかった。

研究成果の概要（英文）： Orofacial cancer rat model exhibits allodynia and hyperalgesia, but it is unclear whether or not the cancer-induced pains are secondarily evoked by cancer-induced inflammation. To address the question, we compared the effects of an anti-inflammatory drug, indomethacin, on abnormal pain in the orofacial inflammation and cancer models. From results, it is suggested that pains in the orofacial cancer model are not significantly mediated by cancer-induced peripheral inflammation although there is a slight involvement.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

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：炎症、癌、異常疼痛、インドメタシン

1. 研究開始当初の背景

臨床現場において、何らかの手術後や炎症、傷害、癌の発生などによって、本来痛みとならない刺激により痛みが生じるような異常疼痛が発生する。口腔顔面領域における異常

疼痛の発生は、食物や食器の接触による触覚・温冷感によって容易に痛みが引き起こされることになるため、結果的に摂食困難・食欲不振に陥り、症状は体幹部より重篤となってしまう。軽度の炎症や傷害であれば抗炎症

剤の服用や、時間と共に改善する場合があるが、多くの場合は不可逆的で治療困難である。異常疼痛の発生メカニズムに関しては未だ不明な点が多く、それゆえに効果的な治療法が定まっていない。発生メカニズムの解明のためには、モデル動物を作成し、その行動や組織、遺伝子レベルを解析することが有効であり、最終的には新規治療法の効果を調べることが可能となる。最近、本学の研究者により顔面癌モデルラットが作製され、臨床における口腔顔面癌患者と同様に異常疼痛（機械刺激アロディニアと熱刺激過敏症）を発生し、最終的に摂食困難に陥ることが報告された(Ono et al. 2009, Eur J Pain)。よって、この顔面癌モデルを含むその他の疼痛モデル動物を解析することで、異常疼痛の発生ならびに治療法の開発が期待されている。

近年、再生医療の分野に非常に大きな期待がなされている。幹細胞を使用することで、失われた神経機能を取り戻すことも1つの大きな目的とされている。そこで、神経幹細胞を移植することで異常疼痛を軽減できないかと考えた。神経幹細胞は脳室下帯に存在するといわれているため、この部位より単離した神経幹細胞を三叉神経節に移植することで口腔顔面モデル動物における異常疼痛を抑制できるかもしれない。

2. 研究の目的

本研究は幹細胞の移植による細胞再生が顎顔面部外傷性および神経因性疼痛に与える影響について検討することを目的とした。まず、経時的に異常疼痛が改善する炎症モデルと改善が認められない癌モデルを行動学的・神経化学的に検討することで異常疼痛の発生メカニズムについて明らかにする。この違いには神経ペプチドが関連している可能性があるため、これについて検討する。さらには、神経幹細胞は神経以外にもアストロサイトやオリゴデンドロサイトにも分化する可能性があるため、これらについても検討する必要がある。特に、アストロサイトは異常疼痛の発生原因として神経障害モデルで報告されていることから、幹細胞移植の際に異常疼痛を逆に発生させてしまう可能性がある。こういったことから、三叉神経節ならびに口腔顔面領域の痛みの中樞受容野である三叉神経脊髄路核尾側垂核におけるアストロサイトの影響についても検討することとした。

3. 研究の方法

チオペンタール(50 mg/kg, i.p.)麻酔後、ラット鼻毛部へ癌細胞の接種(Walker256B, 4x10⁶ cells)、炎症誘発物質(Complete

Freund's Adjuvant: CFA)および PBS (control)の投与を行う。すべてのモデル動物は少なくとも術後10日目には安楽死を行う。

(1) 行動観察

この3種のモデル動物に対し、von Frey hairによる機械刺激疼痛逃避閾値、放射熱による熱刺激逃避潜時、自発的顔面グルーミング時間の測定を行う。前者2つの痛覚テストにてモデル動物は痛みを感じるが自発的に逃避することができ、顔面グルーミングは現在では疼痛回避行動の1つとして考えられている。

(2) 抗炎症剤の効果の検討

インドメタシンの投与(100 mg/kg, i.p.)は癌細胞や CFA, PBS の投与前ならびにその後は疼痛テスト後に連日1回投与する。

(3) 組織学的検討

組織サンプルの摘出の際にはチオペンタール(50 mg/kg, i.p.)麻酔後に、PBS もしくは 4%パラホルムアルデヒドの心灌流し、脳幹、三叉神経節、投与顔面領域を摘出する。その後、組織切片を作成し、特異的抗体を用いて神経ならびにアストロサイトについて検討する。

4. 研究成果

まず、顔面炎症モデルと顔面癌モデルの作製を行った。異常疼痛発生を確認するために毎日、von Frey hairによる機械刺激疼痛逃避閾値、放射熱による熱刺激逃避潜時、自発的顔面グルーミング時間の測定を行った。顔面炎症モデルではCFA投与後2日目をピークとしてvon Frey hairによる機械刺激疼痛逃避閾値の低下ならびに放射熱による熱刺激逃避潜時の短縮が引き起こされ、その後徐々に改善しCFA投与後7日目にはほぼ投与前のレベルにまで戻った。また、自発的顔面グルーミング時間も同様の変化をたどった。一方、顔面癌モデルでは癌細胞接種後4-6日目をピークとしてvon Frey hairによる機械刺激疼痛逃避閾値の低下ならびに放射熱による熱刺激逃避潜時の短縮が引き起こされ、その後徐々に投与前のレベルへ戻るような傾向を示した。しかしながら、自発的顔面グルーミング時間は顔面炎症モデルとは異なり、経時的に増加傾向を示していった。この結果は以前にも報告されており(Ono et al., 2009)、顔面癌モデルの癌細胞接種部位は接種後7日目以降より刺激に対して鈍感になるものの、異常疼痛発生部位が組織辺縁部に拡大されるため、疼痛指標の一つである自発的顔面グルーミング時間はむしろ増加傾

向を示すと解釈されている。

インドメタシンの効果について検討したところ、顔面炎症モデルでは異常疼痛が大きく消失したものの、顔面癌モデルではほとんど異常疼痛を抑制しなかった。この結果は、顔面癌モデルにおける異常疼痛は炎症による影響をほとんど受けていないことを示唆している。

この結果に加えて、三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるサブスタンスP、カルシトニン遺伝子関連ペプチド、ガラニンという3種類の神経ペプチドの変化の結果を合わせ、*Journal of Dental Research* に報告した(Harano et al., 2010)。坐骨神経炎症モデルではサブスタンスPとカルシトニン遺伝子関連ペプチドの脊髄後角での発現が上昇することが知られている。一方、坐骨神経傷害モデルでは両ペプチドの発現は減少する。さらにガラニンは神経傷害モデルでは発現は増加すると報告されている。我々の研究結果において、顔面炎症モデルではサブスタンスPとカルシトニン遺伝子関連ペプチドの三叉神経脊髄路核尾側亜核での発現増加を認め、ガラニンは変化していなかった。一方、顔面癌モデルでは3種類の神経ペプチドとも全く変化をしていなかった。この結果は、インドメタシンの行動学的観察結果とも非常によく一致する。また、ガラニンの発現に変化がないことから、顔面炎症モデルと顔面癌モデル共に神経障害は引き起こされていないと考えられる。

これらの結果を踏まえて、顔面癌モデルにおける三叉神経節と三叉神経脊髄路核尾側亜核での神経ならびにアストロサイトについて検討している。神経に関しては、NeuNをマーカーとして蛍光免疫染色を行ったところ、三叉神経節と三叉神経脊髄路核尾側亜核においてsham群と比べてほとんど変化は見られなかった。また、アストロサイトに関してGFAPをマーカーとして蛍光免疫染色を行ったところ、三叉神経節では何ら変化を認めなかったが、三叉神経脊髄路核尾側亜核ではあきらかな細胞増殖を認め、形態も膨らんでおり、明らかな活性化が起きていることが確認された。これらの結果についてはまだ未発表である。現在はさらに顔面炎症モデルでも同様に検討中である。

この未発表の結果より、神経幹細胞の移植には注意が必要であることが明らかとなった。少なくとも三叉神経脊髄路核尾側亜核への神経幹細胞投与はアストロサイトの増殖を引き起こす可能性があるため、上手く神経だけに分化するよう誘導する必要があることが分かった。また、神経細胞の数や傷害の有無に関しては少なくとも顔面癌モデルでは起きていないため、神経幹細胞投与が異常疼痛の緩和に寄与するかどうか疑わしい。よ

って、今後は神経障害モデルでの検討が必要になると考えている。

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3件)

- ① Harano N, Ono K, Hidaka K, Kai A, Nakanishi O, Inenaga K. Differences between orofacial inflammation and cancer pain. *J Dent Res.* 2010 Jun;89(6):615-620. (査読有)
- ② Ono K, Hirase M, Kai A, Inenaga K. Effect of central nicotinic activation on drinking behavior. *Neuroreport.* 2008 19(8):845-9. (査読有)
- ③ 河原 博、甲斐 絢、原野 望、吉田充広、椎葉俊司、中島隆喜、佐々木麻奈未、古田弘之、仲西 修；エアウエイスコープ®用マギール鉗子の使用経験、日歯麻誌 36(5), 577-578, 2008 (査読有)

[学会発表] (計6件)

- ① 河原 博、甲斐 絢、原野 望、仲西 修：イントロック先端部を喉頭蓋谷に位置させるエアウエイスコープ経鼻挿管の検討：第37回日本歯科麻酔学会、名古屋、2009, 10
- ② 松本吉洋、法師山絢、斎藤睦子、吉田充広、原野 望、仲西 修、柿木保明。誤嚥が摂食拒否の原因であった重症心身障害者の1症例。第26回日本障害者歯科学会総会・学術集会。2009年10月31日-11月1日。名古屋
- ③ M. YOSHIDA, N. HARANO, A. KAI, S. SHIIBA, H. KAWAHARA, O. NAKANISHI : An evaluation of nutritional status in preoperative mental retarded person, IADR, Toronto, July2-5 2008.
- ④ Inenaga K, Ono K., Kai A., Nakanishi O. :Temperature-dependent properties of rat subfornal organ neuron. 38th Annual Meeting of Neuroscience Society, Washington, USA, Nov, 15-19, 2008.
- ⑤ 井ノ森巳賀子、吉田充広、甲斐 絢、原野 望、椎葉俊司、河原 博、仲西 修：九州歯科大学附属病院障害者(児)歯科における日帰り全身麻酔下歯科治療用クリティカル・パス(研修医用)について、第68回九州歯科大学総会、九州歯科大学、2008. 5. 31-6. 1
- ⑥ 河原 博、甲斐 絢、原野 望、左合徹平、古田弘之、岡田麻里、佐々木麻奈未、風川美貴、松林恭子、仲西 修：気道3次元 CT による経鼻ファイバースコープ

挿管困難性の評価、第36回日本歯科麻酔
学会総会、大阪大学、2008.10.8-10

6. 研究組織

(1) 研究代表者

甲斐 絢 (KAI AYA)

九州歯科大学・歯学部・特別研修員

研究者番号：80453231