

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 5日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592324

研究課題名（和文） 口腔・顔面の痛覚異常と中枢神経系グリア細胞の活性化に関する研究

研究課題名（英文） A study of abnormal orofacial pain and activation of glial cells in the central nervous system.

研究代表者

寺山 隆司 (TERAYAMA RYUJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60333689

研究成果の概要（和文）：本研究では口腔や顔面の知覚を支配する神経を損傷した後に起こる痛覚異常に中枢神経のグリア細胞の活性化がどのように関与しているのか、また神経損傷後に脳幹のニューロンの興奮性がどのように変化するかについて検討した。神経損傷によって、損傷を受けた神経が接続する脳幹の部位でミクログリアとアストログリア、さらにグリア細胞の活性化と関連があると考えられている各種 MAP キナーゼの活性化がそれぞれ異なる時期に起こっていることが明らかとなった。また末梢神経損傷後に脳幹におけるニューロンの興奮性の変化を検討したところ、脳幹の各部位によってそれぞれ異なる様式の興奮性の変化が起こっていることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：In this study, involvement of activation of glial cells in the central nervous system in abnormal orofacial pain and changes in neuronal excitability following peripheral nerve injury were investigated. I observed differential activation of microglia, astroglia, and several MAP kinases, considered to be related to glial activation, in the brainstem. Differential changes in neuronal excitability in the brainstem were also observed after peripheral nerve injury.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：MAP Kinase・神経損傷・痛覚異常・ミクログリア・アストログリア・三叉神経知覚核群

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、慢性疼痛や神経因性疼痛などの病的な疼痛は取り除かれるべきで

ある。これらの病的な疼痛は末梢組織の炎症や末梢神経の損傷によって起こることが知られている。中でも口腔・顔面の知覚を支配する三叉神経の末梢枝は顔面頭蓋

の複雑な骨構造の間を走行しているため、顎骨および周囲組織の病変によって刺激を受けやすい。また歯科疾患の治療は観血的処置が含まれることが多いため、微少な神経損傷が不可避となる場合が多い。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機会が多いため、その原因や発症機序を解明し、予防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。

慢性疼痛や神経因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、その神経細胞自身やその神経が接続する2次ニューロン、さらには中脳や延髄に存在する痛覚伝達を調節している神経回路で各遺伝子発現と機能的変化が起こることが証明された。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。しかしながら慢性疼痛や神経因性疼痛の発症機序について十分に解明されたとは言えない。特に神経因性疼痛の症状の中でも末梢神経の支配領域を越えて起こる痛覚異常や、通常では痛覚を伴わない触覚刺激によって痛みを感じる異痛症 allodynia といった現象はニューロン間の相互作用のみで説明することは困難であり、その他の要因が関与していると考えられている。一方、最近の研究で中枢および末梢神経系の損傷時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において活性化することが認められてきた。グリア細胞はニューロンの位置や機能を単に支持するだけの細胞であると以前では考えられてきたが、グリア細胞の活性化が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。中でも損傷を受けた末梢神経の中核投射部位におけるアストロサイトやミクログリアで各種 MAP kinase が活性化し、その結果これらの細胞自身が活性化しサイトカインや COX-2、iNOS など2次ニューロンに作用する物質を放出することが知られており、最近注目を集めている。

こうした状況の中、本申請者は三叉神経系や脊髄神経系について、末梢神経損

傷や末梢組織の炎症が中枢神経系の侵害情報処理機構に与える影響、ならびに脊髄損傷など中枢神経系の損傷によって起こるグリア細胞の動態を研究テーマとして研究活動を行ってきた。その結果、末梢神経の損傷により中枢内2次ニューロンに可塑的变化が起こること、末梢組織の持続的炎症により脳幹部に存在する下行性痛覚調節系に機能的変化が起こることを明らかにした。また中枢神経系損傷後の神経伝達障害にグリア細胞の活性化や細胞死が関与していることを報告してきた。さらに、最近の研究で脊髄神経損傷後に脊髄および延髄後索核におけるMAP kinaseがミクログリアで活性化し、この活性化を抑制することにより病的疼痛が抑えられることを明らかにした。今回三叉神経系におけるMAP kinase やグリア細胞の活性化に着目し、神経因性疼痛の発症や持続期にどのように関与しているのかを明らかにし、これまでの研究をさらに発展させる研究を創案したので、本申請を行うに至った。

2. 研究の目的

既に述べたように、末梢神経の損傷後に起こる慢性疼痛や神経因性疼痛には中枢内ニューロンの可塑性やグリア細胞の活性化が関与していることが明らかにされつつある。しかしながら口腔・顔面の痛覚異常に中枢内ニューロンの可塑性がどのような機序で起こっているのか、またグリア細胞とニューロンとの相互作用について不明な点が多い。そこで本研究では、口腔・顔面の痛覚異常に中枢内グリア細胞の活性化がどのように関与しているのかを明らかにすることを目的とした。具体的には、

- (1) 口腔・顔面の知覚を支配する神経を損傷し、その神経の中核投射領域である三叉神経知覚核群での MAP kinase およびグリア細胞の活性化を分析する。
- (2) 損傷を受けた神経あるいは損傷を受けた神経に隣接する神経への低閾値および高閾値電気刺激によって侵害情報伝達の指標となる c-Fos タンパクの発現変化を検討する。

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、浮遊切片として以下の染色を行った。

- ① リン酸化型 ERK およびリン酸化型 p38 MAP kinase に対する特異抗体を用いた免疫組織化学的染色 (ABC 法)
- ② ERK および p38 MAP kinase のリン酸化が起こっている細胞タイプの同定
リン酸化型 ERK およびリン酸化型 p38 MAP kinase に対する特異抗体とニューロン、ミクログリア、アストログリアそれぞれのマーカー抗体を用い、同一切片上で蛍光 2 重染色を行った。

①の切片を画像解析することにより、三叉神経知覚核群の各部位での ERK および p38 MAP kinase の活性化の程度を定量的に検討した。②の切片から ERK および p38 MAP kinase のリン酸化が起こっている細胞タイプを同定するとともに、ミクログリアとアストログリアの活性化についても定量的に検討した。

- (2) 損傷を受けた神経あるいは損傷を受けた神経に隣接する神経への電気刺激によって誘発される c-Fos タンパクの発現変化について

ラットに全身麻酔を施し、舌神経または下歯槽神経を結紮・切断する。神経損傷後 14 日で再び全身麻酔を施し、損傷した舌神経あるいは損傷を受けていない舌神経を露出し、双極電極を用いて電気刺激 (5 Hz, 0.5 ms で 10 分間) を行った。電気刺激の強度は 0, 0.1, 10 mA の 3 種類を設定した。電気刺激後 2 時間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 PAP 法を用いた c-Fos タンパクの免疫組織化学的染色を行った。得られた切片から、三叉神経知覚核群に含まれる c-Fos 陽性ニューロンの数を計測し、各実験条件による c-Fos 誘発状況を比較した。

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
ERK のリン酸化は神経損傷後 2 時間から

1 日で増加し、その増加は尾側亜核および吻側亜核で顕著であること、p38 MAP kinase のリン酸化は損傷後 3-7 日で尾側亜核、吻側亜核および主知覚核でその増加が顕著であることが明らかとなった (図 1)。p38 MAP kinase のリン酸化はミクログリアに限定され、ERK MAP kinase のリン酸化はミクログリアとアストログリアで起こっていた。また、神経損傷後にミクログリアおよびアストログリア自身の活性化も起こっていることが明らかとなった (図 2)。

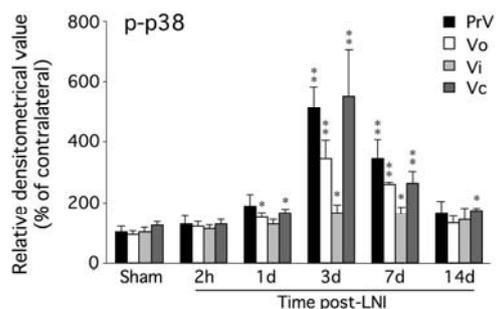
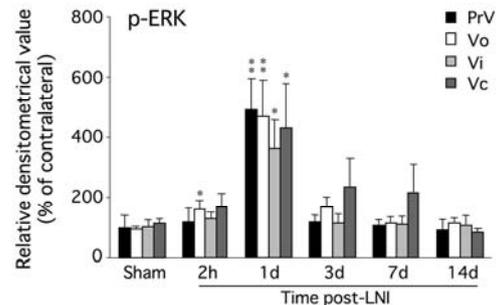


図 1. 舌神経損傷後の MAP kinase の活性化

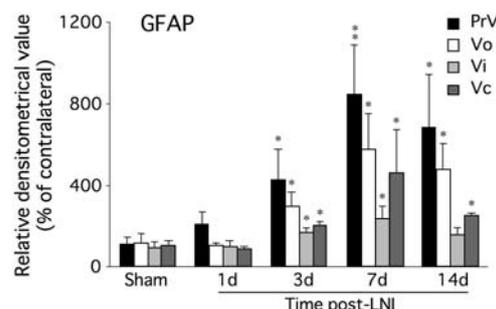
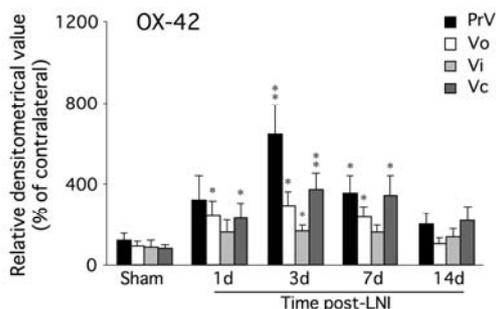


図 2. 舌神経損傷後のグリア細胞の活性化

これまでに、神経損傷後の中枢神経系での変化に関する研究として尾側亜核に関する結果は報告されているが、三叉神経知覚核群の他の部位については国内外を通じて報告がなく、本研究が最初の報告となった。今後神経損傷後の痛覚異常に関する研究に尾側亜核以外の部位を検討することでよりその発症メカニズムが解明されることが期待される。

(2) 損傷を受けた神経あるいは損傷を受けた神経に隣接する神経への電気刺激によって誘発される c-Fos タンパクの発現変化について

舌神経あるいは下歯槽神経損傷後に舌神経を低閾値あるいは高閾値で電気刺激して三叉神経知覚核群におけるニューロンの興奮性の変化を検討したところ、吻側亜核および尾側亜核でそれぞれ異なる様式の興奮性の変化が起こっていることが明らかとなった。すなわち損傷した神経では低閾値電気刺激に対する過剰な興奮が吻側亜核で認められ、損傷した神経に近接する神経では高閾値電気刺激に対する過剰な興奮が尾側亜核で認められた(図3)。

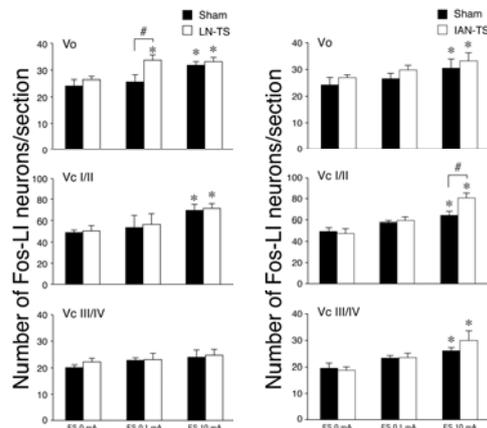


図3. 舌神経への電気刺激による c-Fos 発現に対する神経損傷の影響

電気刺激を含め、末梢への刺激に対する c-Fos の発現変化に関して、三叉神経系では主に尾側亜核で行われ、三叉神経知覚核群の他の部位については国内外を通じて報告がなく、神経損傷後の変化に関しては本研究が最初の報告となった。本研究では吻側亜核および尾側亜核でそれぞれ異なる様式の興奮性の変化が起こることを示したが、それぞれが神経損傷後の様々な症状に関係していることが示唆された。今回の結果をもとに今後神経損傷後の痛覚異常のメカニズムの詳細が解明されることが期待される。

また、本研究で得られた結果の一部は、日本神経科学大会、日本解剖学会、歯科基礎医学会で発表し、神経科学の専門誌として世界的にも有名な学術雑誌にも数編掲載された。さらに今回の結果を元にした総説の執筆ならびに招待講演(日本解剖学会全国学術集会)を行う機会にも恵まれた。

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7件)

- ① Fujisawa N, Terayama R, Yamaguchi D, Omura S, Yamashiro T, Sugimoto T, Fos protein-like immunoreactive neurons induced by electrical stimulation in the trigeminal sensory nuclear complex of rats with chronically injured peripheral nerve, *Exp Brain Res*, 査読有, 2012 in press.
- ② 寺山隆司, 杉本朋貞, 三叉神経一次知覚ニューロンの中枢内投射と痛覚受容機構、*脳2* 1、査読無、Vol.14、No.4、2011、84(376)-85(379).
- ③ Terayama R, Fujisawa N, Yamaguchi D, Omura S, Ichikawa H, Sugimoto T, Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury, *Neuroscience Res*, 査読有, 69(2), 2011, 100-110.
- ④ Terayama R, Fujisawa N, Yamaguchi D, Omura S, Ichikawa H, Sugimoto T, Persistent hypoglossal artery with hypoplasia of the vertebral and posterior communicating arteries, *Anat Sci Int*, 査読有, 86(1), 2011, 58-61.
- ⑤ Ichikawa H, Zhao BR, Kano M, Shimizu Y, Suzuki T, Terayama R, Matsuo S, Sugimoto T, Tunicamycin-induced cell death in the trigeminal ganglion is suppressed by nerve growth factor in the mouse embryo, *Cell Mol Neurobiol*, 査読有, 30(3), 2010, 461-467.
- ⑥ Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, Sugimoto T, Peptide 19 in the rat superior cervical ganglion, *Neuroscience*, 査読有, 161(1), 2009, 86-94.
- ⑦ Ichikawa H, Terayama R, Yamaai T, Jacobowitz DM, Qiu F, Xiang M, Sugimoto T, Brn-3a deficiency transiently increases expression of calbindin D-28 k and calretinin in the trigeminal

ganglion during embryonic development, Cell Mol Neurobiol, 査読有, 29(5), 2009, 691-698.

[学会発表] (計9件)

- ① 寺山隆司、三叉神経一次知覚ニューロンの中枢内投射と痛覚受容機構、第117回日本解剖学会総会・全国学術集会(招待講演)、2012/3/27、山梨県甲府市・山梨大学甲府キャンパス
- ② 寺山隆司、舌神経損傷後の三叉神経知覚核群における MAP kinase およびグリア細胞の活性化、日本解剖学会第66回中国・四国支部学術集会、2011/11/13、徳島県徳島市・徳島大学蔵本キャンパス
- ③ 山口大輔、末梢神経損傷後の脊髄後角ニューロンの過剰興奮に対するアデノシン A1 受容体 アゴニスト 2-chloro-N(6)-cyclopentyladenosine (CCPA) の効果、日本解剖学会第66回中国・四国支部学術集会、2011/11/13、徳島県徳島市・徳島大学蔵本キャンパス
- ④ 寺山隆司、Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury、第34回日本神経科学大会、2011/9/17、神奈川県横浜市・パシフィコ横浜
- ⑤ 藤澤直子、末梢神経損傷後の舌神経刺激に対する三叉神経二次知覚ニューロンの応答、第88回日本生理学会大会 第116回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会、2011/3/30、誌上開催 Journal of Physiological Sciences
- ⑥ 寺山隆司、末梢神経損傷後の三叉神経知覚核群における MAP kinase およびグリア細胞の活性化、第52回歯科基礎医学会学術大会、2010/9/21、東京都江戸川区・タワーホール船堀
- ⑦ 藤澤直子、末梢神経損傷後の吻側亜核におけるニューロンの興奮性の変化、第52回歯科基礎医学会学術大会、2010/9/21、東京都江戸川区・タワーホール船堀
- ⑧ 寺山隆司、舌神経損傷後の三叉神経知覚核群における p38 および ERK MAP kinase の活性化、第51回歯科基礎医学会学術大会、2009/9/11、新潟県新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
- ⑨ 藤澤直子、舌神経損傷後の三叉神経知覚核群におけるニューロンの興奮性の変化、第51回歯科基礎医学会学術大会、2009/9/11、新潟県新潟市・朱鷺メッセ新潟コンベンシ

ョンセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺山 隆司 (TERAYAMA RYUJI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：60333689

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

杉本 朋貞 (SUGIMOTO TOMOSADA)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：50135729