

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890264

研究課題名（和文） 損傷三叉神経再生過程に発症する疼痛異常に対するアストログリアの関与
 研究課題名（英文） Involvement of the astroglia in pain abnormalities during regeneration of the inferior alveolar nerve in rats

研究代表者

人見 涼露 (Hitomi Suzuro)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号：70548924

研究成果の概要（和文）：ラットの下歯槽神経損傷モデルにおいて、下歯槽神経損傷後 14 日目に発症する口ひげ部の痛覚過敏には、三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄におけるアストログリア活性の増強および三叉神経節における transient receptor potential vanilloid 1 陽性口ひげ部投射ニューロンの増加が関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Activation of the astroglia in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord 1/2 nociceptive neurons and increment in transient receptor potential vanilloid 1-positive neurons in trigeminal ganglion may be involved in the pain abnormalities in the whisker pad during the inferior alveolar nerve regeneration.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	980,000	294,000	1,274,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,930,000	579,000	2,509,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系基礎歯科学

キーワード：グリア、神経再生、疼痛異常、三叉神経、延髄

1. 研究開始当初の背景

抜歯やインプラント等の口腔内手術の際に下歯槽神経が損傷されると、しばしば創傷治癒後にも口腔顔面領域に異常感覚や疼痛異常が生じることが報告されている。しかしながら、このような神経損傷によって惹き起

こされる疼痛異常発症のメカニズムはほとんど解っておらず、臨床の場において治療に苦慮しているのが現状である。

現在までに下歯槽神経損傷ラットを用いて神経損傷治癒した後に再生下歯槽神経支配領域に痛覚過敏が発症することを明らか

にした。さらに私は、このような痛覚過敏は損傷下歯槽神経支配領域を超えた口腔顔面領域にも発症することを見出した。よって下歯槽神経の損傷が損傷を受けていない三叉神経の支配領域における疼痛異常に関与することが示唆される。

グリア細胞（アストログリアおよびマイクログリア）は中枢神経系に多く存在し神経細胞に対する栄養補給や形態維持などの補助的な役割を果たすと同時に、二次ニューロンの活動性を調節していることが報告されている。近年、末梢神経損傷後の二次ニューロンの過敏化に脊髄のグリア細胞が大きく関与していることが解ってきた。

2. 研究の目的

三叉神経第三枝である下歯槽神経を損傷し、その再生過程における三叉神経第二枝支配領域に発症する疼痛異常のメカニズムの解明を目的として、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1/C2) におけるグリア細胞活性の経日的変化および、三叉神経第二枝支配領域の皮膚における異所性痛覚過敏発症に対する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の関与について検討する。

3. 研究の方法

(1) 損傷下歯槽神経再生モデルの作製

Sprague Dawley 系雄性ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg i. p.) で麻酔し、側臥位に寝かせ、左側頬部皮膚を約 15 mm 切開し、下顎骨を露出した後、ラウンドバーにて骨表面を切削し、下歯槽神経 (IAN) を約 3 mm 露出した。露出した神経を切断し、切断面を縫合することなく接合させて下顎管内に戻した。その後切開部分を 6.0 絹糸で 3 糸縫合し、これらを IAN 群とした。

下顎骨の切削のみ行い、神経の切断を行っていないものを sham 群、無処置群を Naive

群とした。IAN 群、Sham 群については手術後 14 日経過したものを使用した。

(2) 活性型アストログリアの同定

下歯槽神経切断前および切断 3 日、14 日および 30 日が経過したラットに対して、sodium pentobarbital (50 mg/kg i. p.) で麻酔し、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定する。Vc から第 2 頸髄までの組織を取り出し、マイクロトームを用いて 30 μ m の凍結切片を作成した。浮遊切片を 3%ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体に anti-GFAP rabbit antibody、2 次抗体に anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, Biotinized を使用してインキュベートした。その後 ABC 反応を行い DAB にて発色させた。切片をスライドガラスに封入した後、光学顕微鏡を用いて GFAP 陽性細胞の経日的発現様式を解析した。

(3) 行動学的解析

下歯槽神経切断前および切断後 3 日、14 日および 30 日が経過したラットの口ひげ部にカプサイシン (10mM, 10 μ l) を注入した。カプサイシン注入前後のスクラッチング回数を経日的変化を解析した。

(4) pERK 陽性二次ニューロンの同定

下歯槽神経切断前および切断後 3 日、14 日および 30 日が経過したラットに対して、sodium pentobarbital (50 mg/kg i. p.) で麻酔し、カプサイシン (10mM, 10 μ l) を口ひげ部に注入した。その 5 分後に 4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定した。Vc から第 2 頸髄までの組織を取り出し、マイクロトームを用いて 30 μ m の凍結切片を作成した。浮遊切片を 3%ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体に rabbit anti phosphor-p44/42 MAP kinase (ERK 1/2) antibody、2 次抗体に anti-IgG (H+L), Rabbit, Goat-Poly, Biotinized を使用してインキュベートした。その後 ABC 反応を行い DAB にて発色させた。

切片をスライドガラスに封入した後、光学顕微鏡を用いて pERK 陽性細胞の経時的発現様式を解析した。

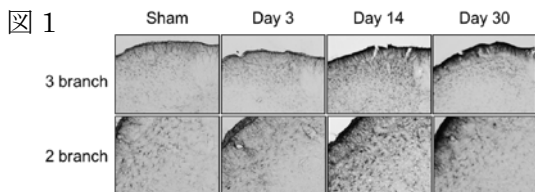
(5) TRPV1 陽性一次ニューロンの同定

Naïve ラットおよび下歯槽神経切断後 12 日が経過したラットに対して、sodium pentobarbital (50 mg/kg i.p.) で麻酔し、口ひげ部に逆行性トレーサーである DiI (10 μ l) を注入した。その 2 日後、麻酔したラットを 4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定した。三叉神経節を取り出し、クライオスタットを用いて 16 μ m の凍結切片を作成しスライドガラスに貼り付けた。切片を貼り付けたスライドガラスにおいて、3%ヤギ血清にてブロッキングを行った後、一次抗体に rabbit anti-TRPV1 polyclonal antiserum、二次抗体に AlexaFluor-488-conjugated goat anti-rabbit IgG を使用してインキュベートした。その後封入をし、蛍光顕微鏡を用いて DiI 陽性 TRPV1 陽性細胞数の経時的発現様式を解析した。

4. 研究成果

(1) アストログリアの同定

IAN 切断 14 日目、Vc および C1/C2 の三叉神経第三枝および第二枝領域において Sham 群と比較してアストログリア活性の増強が認められた (図 1)。



1) 行動学的解析

IAN 切断 14 日目において、Naïve 群と比較してカプサイシン注入後のスクラッチング回数の有意な増加が認められた。また、すべての群において、カプサイシン注入前と比較して注入後で有意にスクラッチング回数が増加した。

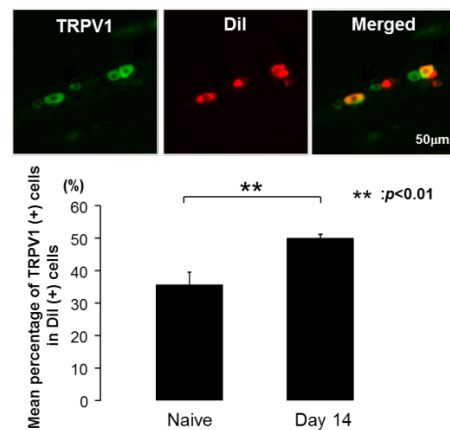
(2) pERK

IAN 切断 14 日目において、Naïve 群と比較してカプサイシン注入後、有意に Vc における pERK 陽性細胞数の増加が認められた。また、すべての群においてカプサイシン注入側において、非注入側と比較して有意に pERK 陽性細胞が増加した。

(3) TRPV1

IAN 切断 14 日目において、口ひげ部に投射する TRPV1 陽性神経細胞数は Naïve 群と比較して有意に割合が増加していた (図 2)。

図 2



以上の結果から、三叉神経第三枝である下歯槽神経切断後の再生過程において、三叉神経脊髄路核尾側亜核の第三枝領域、第二枝領域におけるアストログリアの活性化が切断 14 日で最も多く認められた。また下歯槽神経切断 14 日後、三叉神経第二枝領域皮膚においてカプサイシン刺激に対する痛覚過敏が発症し、三叉神経節において TRPV1 陽性口ひげ部投射ニューロンの増加が認められた。

よって、下歯槽神経切断後に発症する口ひげ部の痛覚過敏には、Vc におけるアストログリア活性化および三叉神経節における TRPV1 陽性口ひげ部投射ニューロンの増加が関与していることが示唆された。

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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① Suzuro Hitomi, Ikuko Suzuki and Koichi Iwata, Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in trigeminal spinal subnucleus caudalis neurons during regeneration of the trigeminal nerve in rats. 第 3 回 Neuropathic Pain, 2010/5/28, Athens, Greece
- ② 人見涼露, 鈴木郁子, 篠田雅路, 近藤真哲, 岩田幸一 三叉神経切断モデルラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄ニューロンにおける ERK のリン酸化 第生理 87 回日本生理学会大会, 2010/5/21, 盛岡市民文化ホール, 岩手
- ③ 人見涼露, 損傷下歯槽神経再生過程に発症する異所性痛覚過敏の神経メカニズム 学術フロンティア研究報告会, 2010/2/19, 日本大学, 東京
- ④ Hitomi S, Saito-Abe K, Suzuki I., Iwata K. Mitogen activated protein kinase involvement in secondary hyperalgesia during the inferior alveolar nerve regeneration, 第 39 回 Society of Neuroscience, 2009/10/18, Chicago, USA
- ⑤ 人見涼露, 阿部仁子, 岩田幸一 損傷下歯槽神経再生過程において顔面領域に発症する異常疼痛の神経機構 第 51 回歯科基礎医学会 2009/9/9, 朱鷺メッセ, 新潟

6. 研究組織

(1) 研究代表者

人見 涼露 (Hitomi Suzuro)

日本大学・歯学部・ポスト・ドクトラル・フェロー

研究者番号 : 70548924

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号 :

(3) 連携研究者
なし ()

研究者番号 :