

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2023

課題番号：21K21064

研究課題名（和文）眼窩下神経結紮モデルを用いた、神経障害性疼痛に対するNetrin-1の関与の検討

研究課題名（英文）Investigation of the effect of Netrin-1 on neuropathic pain model rats by infraorbital nerve injury

研究代表者

本城 有華 (Honjo, Yuka)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90912204

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,200,000円

研究成果の概要（和文）：神経障害性疼痛は、口腔顔面領域においても日常の歯科治療や口腔外科手術により引き起こされる可能性がある難治性の慢性疼痛で、現在行われている治療法では鎮痛効果が不十分な場合や年齢や副作用のため使用できない場合もあり、病態メカニズムを解明することで効果的な治療法を確立することが必要と考えられる。本研究では、過去の研究で脊髄損傷による神経障害性疼痛に関与することが明らかにされたNetrin-1に着目した。眼窩下神経結紮により疼痛を発症させたラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核において、Netrin-1は神経細胞に発現し、神経障害性疼痛への関与の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔顔面領域の神経障害性疼痛は歯科診療でも認められる疾患で、現在行われている治療法では効果が不十分であったり、副作用や年齢の制限などがあるため、より効果的な治療法の確立が求められている。今回、脊髄損傷による神経障害性疼痛に関与していることが明らかになっているNetrin-1というタンパク質に着目し、口腔顔面領域の痛みの伝導経路が存在する延髄において、Netrin-1の存在やその発現している細胞や受容体について研究を行った。この研究により、口腔顔面領域の神経障害性疼痛についてもNetrin-1の関与が示唆され、今後さらなる研究が必要と考えられる。

研究成果の概要（英文）：Neuropathic pain refers to pain caused by lesions or diseases of the somatosensory nervous system that is characteristically different from nociceptive pain. Moreover, neuropathic pain occurs in the maxillofacial region due to various factors and is treated using tricyclic antidepressants and nerve block therapy; however, some cases do not fully recover. Therefore, there is a need to establish an effective treatment by elucidating a novel molecular mechanism.

In this study, we focused on Netrin-1 which has been shown to be involved in neuropathic pain caused by sciatic nerve injury. We found that Netrin-1 expressed at the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) of neuropathic pain model rats by an infraorbital nerve injury. Moreover Netrin-1 expressed at neuron cells in Vc. These results suggested that Netrin-1 involved in the neuropathic pain of orofacial area.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：Netrin-1 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は「体性感覚神経系の病変や疾患によって引き起こされる疼痛」と定義され、侵害受容性疼痛とは異なる特徴的な痛みを呈する。障害された神経支配領域と一致した部位に、自発的な痛み(持続的もしくは間歇的)や刺激によって誘発される痛み(アロディニアや痛覚過敏など)が生じ、神経が障害されることで様々な感覚異常を合併する特徴がある。歯科臨床で日常的に行われる抜髄や抜歯などの処置は、機械的に神経や血管を切断する処置であり、また、口腔外科処置では舌神経や下歯槽神経を誤って損傷する危険性もあることより、神経障害性疼痛は口腔顔面領域においても起こりうる疾患である。治療法としては、電位依存性カルシウムチャネル阻害薬や三環系抗うつ薬、オピオイド鎮痛薬などの薬物療法や神経ブロック療法などが行われているが、鎮痛効果が不十分な場合や副作用や年齢などのために使用できない場合もあり、効果的な治療法の確立のためにも新しい病態メカニズムを解明することが必要と考えられる。

Netrin は細胞外基質を構成するタンパク質であるラミニンに相同性を持つ分泌タンパク質で、細胞移動や細胞死、神経突起形成、シナプス形成など発生・胎生期における神経回路形成に重要な役割を担っている。Netrin-1 は脊椎動物で最初に発見された軸索ガイダンス分子で、その受容体としては Deleted in Colorectal Cancer (DCC) や Neogenin、Unc5 (A-D) などが知られている。これまでに脊髄損傷による神経障害性疼痛に対する Netrin-1 や Netrin-4 の関与が報告されており(Hayano Y. et al., Journal of Experimental Medicine, 2016; Li J. et al., Neuroscience Letters, 2020) さらに研究代表者は Netrin-4 の口腔顔面領域の神経障害性疼痛への関与を報告した(Honjo Y. et al., PLOS ONE, 2021)。以上より、Netrin-1 も Netrin-4 と同様に口腔顔面領域の神経障害性疼痛に関与していること、さらに Netrin family が神経障害性疼痛治療の分子ターゲットとなりうることをおおいに考えられる。

2. 研究の目的

以上を踏まえ、本研究では口腔顔面領域における神経障害性疼痛の病態メカニズムへの Netrin-1 の関与を明らかにするために、眼窩下神経結紮モデルラットを作製し、口腔顔面領域の痛覚伝導路の一次中継核である三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)および上部頸髄(C1-2)における Netrin-1 の発現の有無や発現細胞について検討した。さらに受容体に関しては、これまでの先行研究をもとに DCC と Unc5B について検討した。

3. 研究の方法

(1) 眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛モデルの作成

6週齢の雄性 Sprague-Dawley ラットを使用した(体重:190g-210g)。Vos らの方法を参考に(Vos B. et al., Journal of Neuroscience, 1994) ラットの左側の眼窩下神経を剖出し、2か所を5-0絹糸で緩やかに結紮した後、閉創した(CCI群)。左側の眼窩下神経の剖出のみを行い、結紮せずに閉創する群を Sham 群とした。

(2) 機械刺激に対する疼痛閾値の測定(von Frey test)

Toyama らの方法を参考に(Toyama M. et al., Cephalalgia, 2016) 眼窩下神経結紮手術の前後に von Frey test を行った。手術前、手術後7, 14, 21日後に von Frey

filament (0.16, 0.40, 0.60, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 15.0, 26.0g) を用いて、whisker pad 中央部に機械的的刺激を与え、ラットが5回中3回以上逃避行動を示す filament の最小値を逃避閾値として記録した。また手術後21日目の逃避閾値が手術前の逃避閾値より低下した個体を神経障害性疼痛モデルラットとした。

(3) Vc および C1-2 における Netrin-1 の免疫組織学的検討

眼窩下神経結紮後14日目に von Frey filament test を行った5分後に深麻酔下で灌流固定を行い、三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi) ~ 上部頸髄 (C2) を含むように摘出し、obex より頭側に 1600 μm, 尾側に 2300 μm で厚さ 30 μm の連続冠状断切片を作製した。これらの切片のうち、頭側から尾側まで 720 μm 毎に 6 切片を一次抗体である抗 Netrin-1 抗体 (1:800, INB100-1605)、抗 NeuN 抗体 (1:1000, MAB377)、抗 Iba1 抗体 (1:1000, 019-19741)、抗 GFAP 抗体 (1:1000, G3893) を用いて免疫染色を行い、Vc および C1-2 における Netrin-1 の発現の有無とその発現細胞について検討した。

(4) Vc および C1-2 における DCC、Unc5B の免疫組織学的検討

(3) と同様に脳を取り出し、凍結切片を作製し、抗 DCC 抗体 (1:100, ab32757)、抗 UNC5B 抗体 (1:100, orb158686) を用いて免疫染色を行い、Netrin-1 の受容体とされている DCC、Unc5B について、Vc および C1-2 における発現の有無を検討した。

組織学的な観察には SP8 LIGHTNING 共焦点顕微鏡を使用し、統計解析には Excel による t - 検定と一元配置分散分析を行った。

4. 研究成果

まずラットの眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛モデルを作成し、その行動評価を行ったところ、CCI 群では Sham 群と比較して14日目で疼痛閾値が有意に低下した。また、CCI 群は結紮前と比較して7、14、21日目で疼痛閾値が有意に低下した。以上より、神経障害性疼痛モデルラットが確立できた。

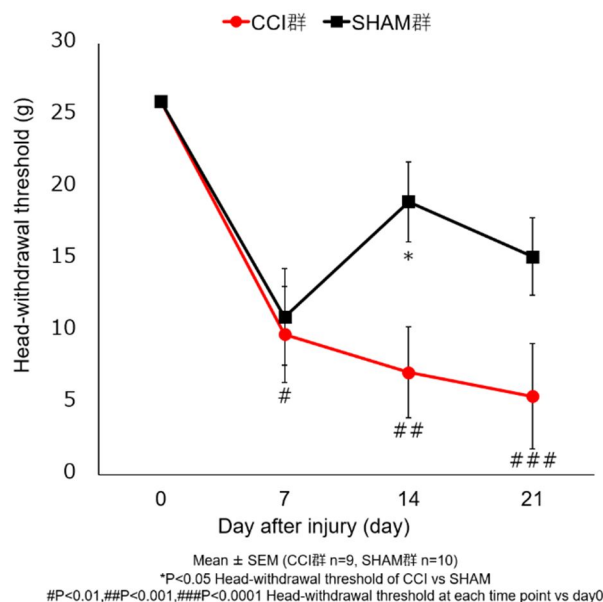


図1 眼窩下神経結紮による疼痛閾値の経時的変化

次に確立した神経障害性疼痛モデルラットにおいて、Vc および C1-2 における Netrin-1 の発現について解析したところ、図2のように Sham 群と比較して CCI 群で Netrin-1

陽性細胞を有意に多く認めた。このことから神経障害性疼痛に Netrin-1 が関与することが示唆された。

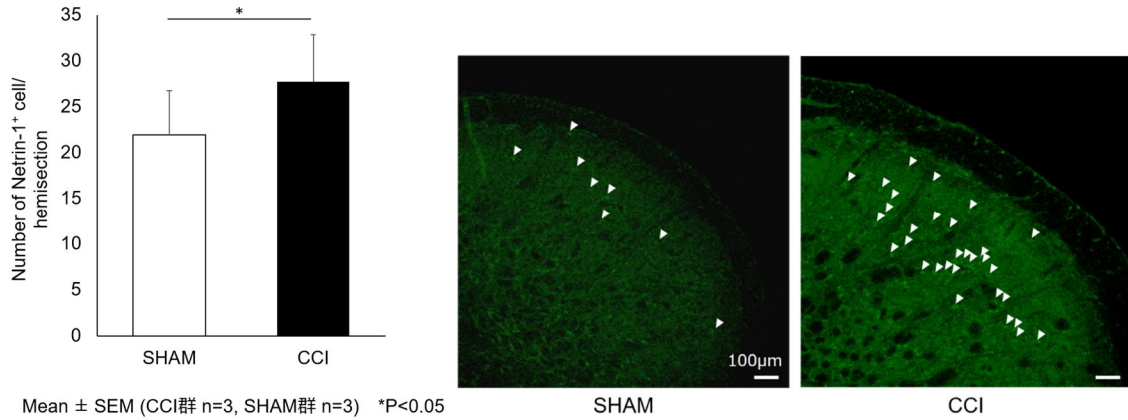


図2 Sham 群と CCI 群における Netrin-1 陽性細胞数の比較

さらに Vc および C1-2 において Netrin-1 の発現する細胞について解析したところ、図3に示すように神経細胞に発現しており、ミクログリアやアストロサイトでは発現を認めなかった。また図4に示すように、Netrin-1 陽性神経細胞数は Sham 群と比較し、CCI 群で有意に増加していた。

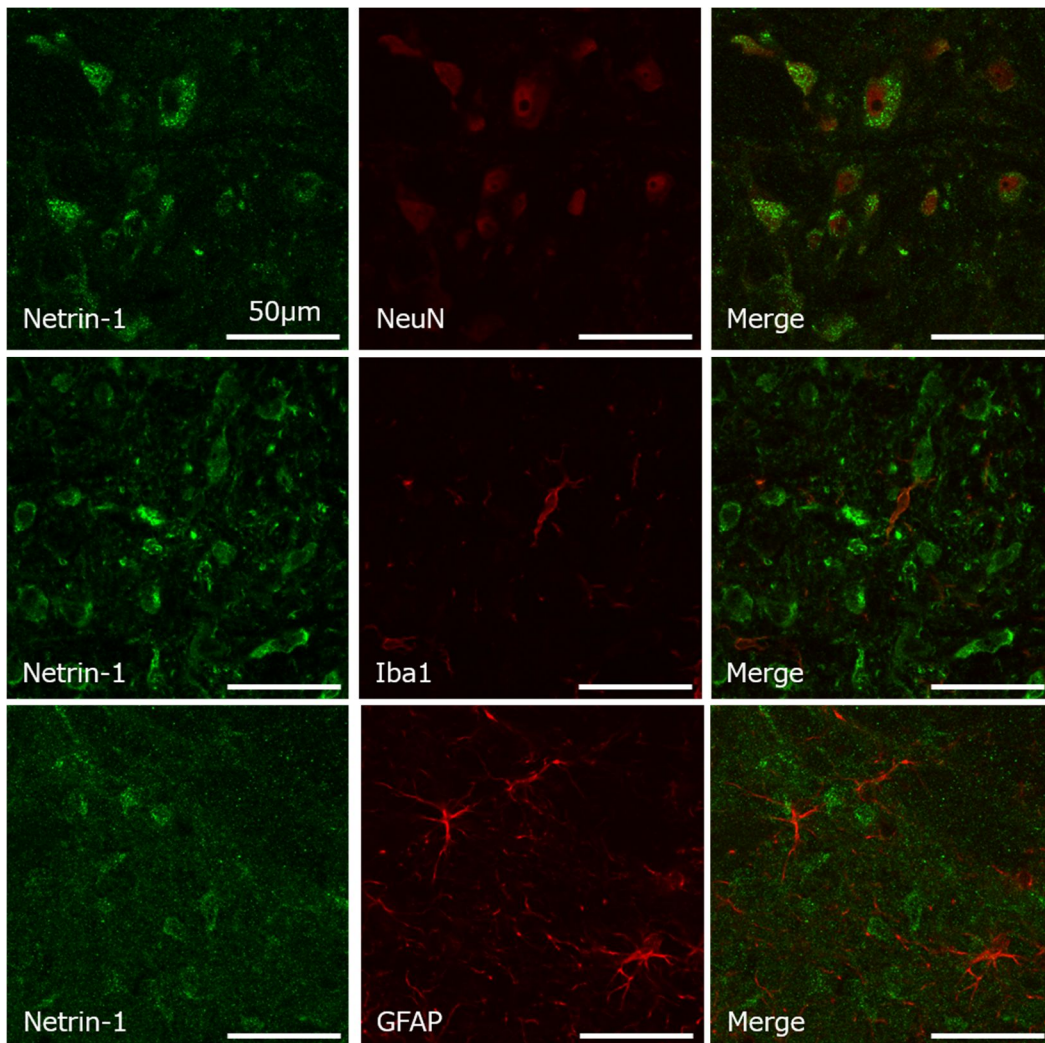


図3 Netrin-1 と NeuN、Iba1、GFAP の共染色像

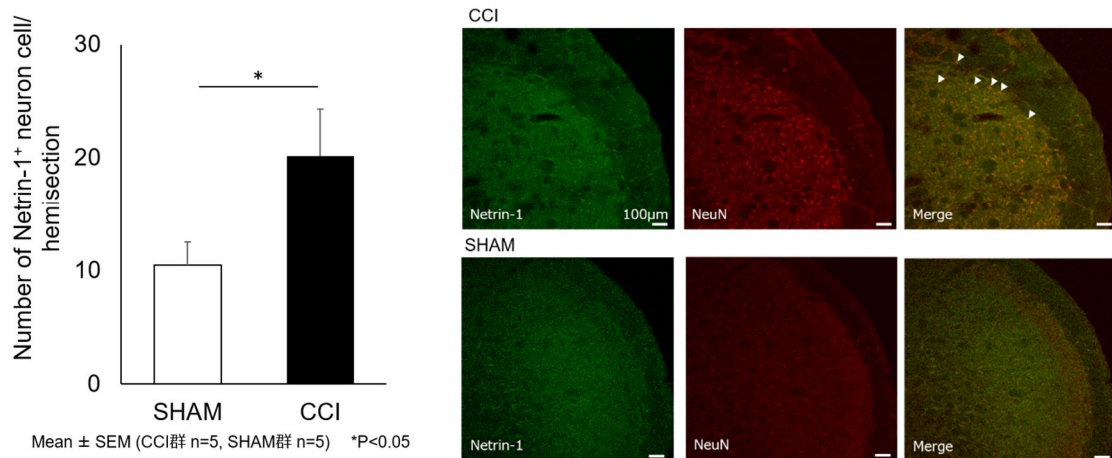


図4 Sham群とCCI群でのNetrin-1陽性神経細胞数の比較

最後にVcおよびC1-2におけるNetrin-1の受容体について、DCCとUnc5Bについてそれぞれ免疫染色を行ったところ、図5に示すように、Sham群と比較してCCI群で有意にUnc5B陽性神経細胞を多く認めた。

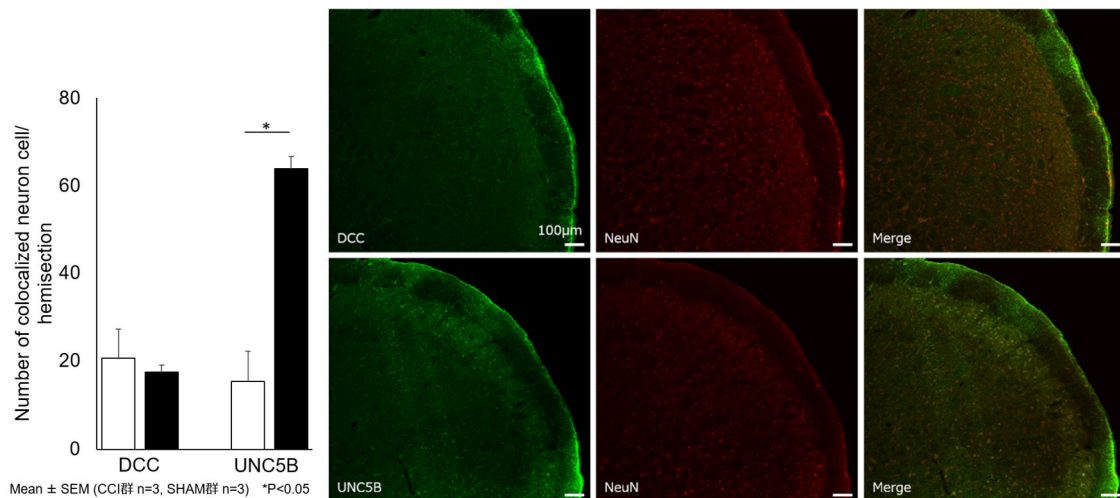


図5 DCC陽性神経細胞とUnc5B陽性神経細胞の比較

以上の結果より、Netrin-1はVcおよびC1-2において神経細胞に発現しており、その受容体であるUnc5Bと共に眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛に関与していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------