

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22390365

研究課題名(和文) 三叉神経ニューロンの過敏化に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a new treatment for trigeminal neuron sensitization

研究代表者

松香 芳三 (Matsuka, Yoshizo)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：90243477

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：シナプス小胞内への取り込み時に機能するボツリヌス毒素重鎖を蛍光標識したものをラット顔面部に注射したところ、同側の三叉神経節細胞で染色が確認された。反対側や染色液のみの注射では染色は観察されなかった。神経軸索輸送を阻害するコルヒチンを投与したラットでも染色は観察されなかった。三叉神経障害性疼痛モデルにおける温熱刺激(疼痛刺激)に対して、ボツリヌス毒素を顔面部皮膚に投与後には疼痛の減弱が観察された。また、末梢神経障害性疼痛モデルの知覚神経節にボツリヌス毒素を直接投与することにより、鎮痛反応が観察された。

研究成果の概要(英文)：Fluorescein labeled botulinum toxin heavy chain which works for endocytosis was injected into rat face skin and found in ipsilateral trigeminal ganglion. The labeled botulinum toxin heavy chain was not found on the contralateral side or in the only fluorescein injection. The uptake was inhibited by colchicine treatment, which blocks axonal transport. Intradermal injection of botulinum toxin alleviates infraorbital nerve constriction induced thermal hyperalgesia in an operant assay. Direct application of botulinum toxin to dorsal root ganglia reversed the sciatic nerve entrapment induced decreases in withdrawal thresholds.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：三叉神経障害性疼痛モデル 神経節細胞 疼痛行動 知覚神経節 A型ボツリヌス毒素 遊離 神経内走行

1. 研究開始当初の背景

日本では、現在世界に類を見ないほど急速に、高齢化が進行しつつあり、歯科においても高齢者の受診患者は激増している。高齢者に多発する三叉神経障害性疼痛はその病態が十分解明されていないものもあり、不治の疼痛に苛まれている症例も少なくない。難治性で強度の疼痛に苛まれる患者の日常生活は、大きく障害され、社会的に大きな問題となっている。抗てんかん薬や抗うつ薬などが治療に用いられるが、それらの薬物は中枢性副作用が強く、服用不可能である患者も少なくない。

我々はこれら難治性の疼痛に対する新しい治療法を確立するために継続して神経障害性疼痛の基礎研究に携わってきた。その結果、世界に先駆けて、新しい一次侵害受容ニューロンの過敏化メカニズムの一端を解明し、三叉神経障害性疼痛モデルに対し、神経毒素のみを高度に精製した改良 A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) の鎮痛効果を明らかにした。末梢皮内投与した BoNT/A が三叉神経節細胞に到達すること、さらには三叉神経節における疼痛伝達を軽減する詳細なメカニズムは解明されていない。そこで、本研究計画において、BoNT/A の軸索輸送、知覚神経節細胞での効果、BoNT/A の知覚神経節への直接投与による鎮痛効果などを観察し、効果的な治療法の開発に結び付けたい。

2. 研究の目的

(1) 三叉神経内の BoNT/A の軸索輸送

蛍光色素で標識した BoNT/A を培養神経細胞に投与し、神経線維内の軸索輸送を顕微鏡下で観察する。さらに色素標識した BoNT/A を末梢投与し、末梢神経、三叉神経節、脊髄、大脳における標識細胞を観察する。

(2) BoNT/A による三叉神経節における SNAP-25 タンパクの切断

BoNT はシナプス内において SNAP-25 を切断し、小胞性の伝達物質遊離を阻害するので、末梢投与した BoNT/A が三叉神経節において SNAP-25 を切断するのかを Western blot により観察する。

(3) 三叉神経障害性疼痛モデルにおける温熱刺激 (疼痛刺激) に対する BoNT/A 投与後の変化

疼痛モデル作製後の疼痛反応、ならびに BoNT/A 投与後の鎮痛効果を、疼痛を伝達する C 線維を温熱刺激することにより観察する。

(4) 末梢神経障害性疼痛モデルの知覚神経節に BoNT/A を直接投与することによる鎮痛反応

BoNT/A が知覚神経節で作用することを確認するため、体内埋め込み式ポンプを利用し、比較的容易にアプローチ可能である後根神経節に BoNT/A を直接的、持続的に投与し、後根神経障害性疼痛モデル動物の鎮痛効果を行動実験により観察する。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経内の BoNT/A の軸索輸送

in vitro での三叉神経細胞内への BoNT/A の取り込み観察

BoNT は重鎖 (Hc) と軽鎖 (Lc) から構成されており、Hc により BoNT はシナプス小胞内に取り込まれる輸送の鍵である。そこで、蛍光色素標識された Hc の輸送を観察した。BoNT/A-Hc をピンポイントで蛍光標識するため、BoNT/A-Hc の N-末端にシステインタグが付加されるように設計された発現ベクターを構築し、GST 融合 Cys-A-Hc リコンビナントタンパク質を大腸菌で大量合成した。アフィニティー精製後、GST タグを除去し、システインタグを蛍光標識した。生後 7 日目のラットから三叉神経節細胞を分離・培養し、蛍光色素で標識した BoNT/A-Hc で 20 分間培養した。

蛍光色素で標識した Hc を末梢皮内に投与した時の三叉神経節の観察

蛍光色素標識した BoNT/A-Hc を顔面部末梢皮内に投与した。その後、ラット三叉神経節を剖出し、神経節細胞が蛍光標識されているのかを観察した。

(2) BoNT/A による三叉神経節における SNAP-25 タンパクの切断

BoNT はシナプス内において神経伝達物質の遊離を司る SNAP-25 を切断することにより、小胞性の伝達物質遊離を阻害することが理解されている。BoNT/A と SNAP-25 を共培養し、SNAP-25 が切断されているかを Western blot により確認した。

(3) 三叉神経障害性疼痛モデルにおける温熱刺激 (疼痛刺激) に対する BoNT 投与後の変化

顔面部温熱刺激ボックス内で顔面部皮膚を金属チューブに当てて水を飲む訓練を行い、そのボックス内で水を飲む条件付けを行った。顔面部に接触する金属チューブ内は水が流れるようになっており、45 に設定した。ラットが金属チューブに触れると導通が生じ、接触時間をコンピュータに記録した。条件付けが終了した後、ラット両側眼窩下神経をゆるく結紮し、疼痛閾値の低下を確認した。その後、BoNT/A をラットの両側のひげの部分に注射し、閾値の回復を観察した。

(4) 末梢神経障害性疼痛モデルの知覚神経節に BoNT/A を直接投与することによる鎮痛反応

BoNT/A の効果発現部位を明確にするため、知覚神経節に BoNT/A を直接投与することにより、末梢神経障害性疼痛モデル動物の鎮痛効果を行動実験により観察した。チューブの先を後根神経節上に設置した。足底部の温熱刺激に対するベースラインデータを記録後、

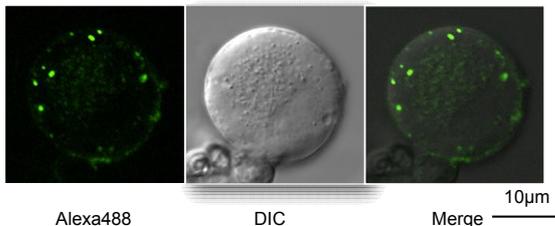
脊髄神経にカフ（1mm 幅）を装着し、末梢神経障害性疼痛モデルを作成し、疼痛閾値の低下を観察した。BoNT/A を投与し、ラットの疼痛反応の変化を観察した。

4. 研究成果

(1) 三叉神経内の BoNT/A の軸索輸送

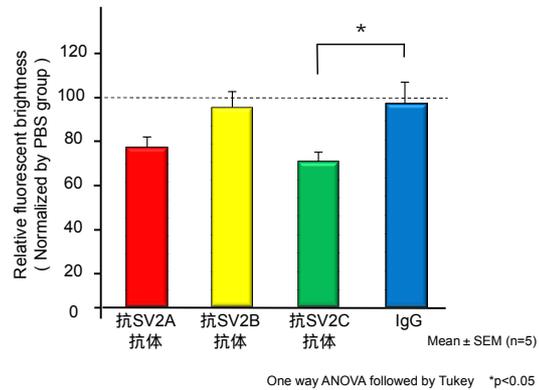
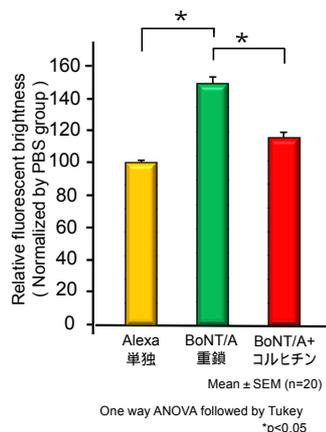
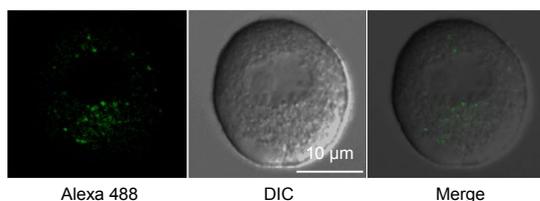
in vitro での三叉神経細胞内への BoNT/A の取り込み観察

蛍光標識した BoNT/A-Hc をラット三叉神経節細胞に投与したところ、細胞内への取り込みが観察された。



蛍光色素で標識した Hc を末梢皮内に投与した時の三叉神経節の観察

蛍光標識した BoNT-Hc をラット顔面部に注射し、数時間後に観察したところ、同側の三叉神経節細胞で染色が確認された。反対側、染色液のみの注射では染色は観察されなかった。また、神経軸索輸送を阻害するコルヒチンを投与したものでも染色は観察されなかった。このことから、末梢に注射した BoNT/A Hc が神経輸送を介して三叉神経節に到達したことが理解できた。さらに、三叉神経への取り込みにおいては抗 SV2C 抗体を事前に投与したものは BoNT/A-Hc の取り込みが減少することが観察され、SV2C 受容体を取り込みに関与していることが理解できた。

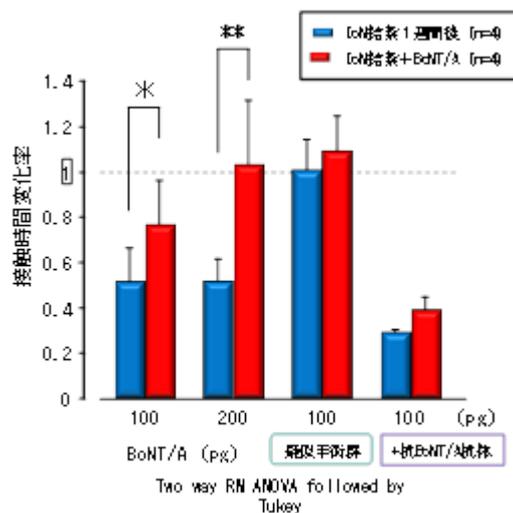


(2) BoNT/A による三叉神経節における SNAP-25 タンパクの切断

BoNT/A と SNAP-25 を共培養し、BoNT/A が SNAP-25 を切断するのかを Western blot により観察することを行ったところ、BoNT/A による SNAP-25 の切断が観察された。

(3) 三叉神経障害性疼痛モデルにおける温熱刺激（疼痛刺激）に対する BoNT 投与後の変化

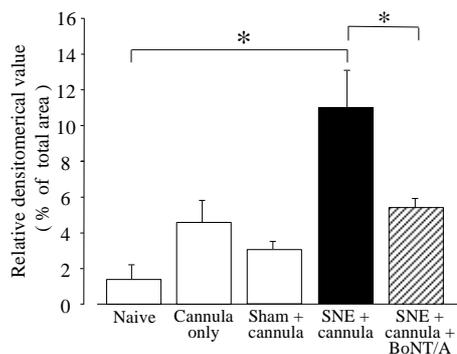
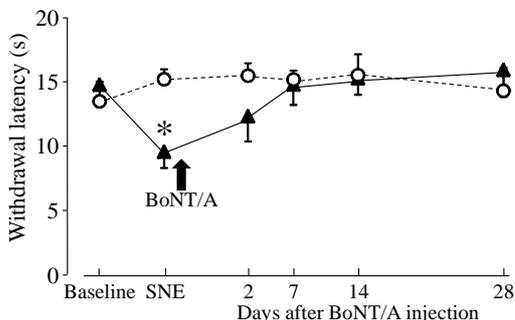
ラットの両側の眼窩下神経を結紮した三叉神経障害性疼痛モデルラットでは、オペラント分析自由行動ラット評価における持続的な温熱性痛覚過敏が発現することが明らかになった。また、BoNT/A を末梢皮膚に投与することにより、温熱性痛覚過敏の疼痛症状は軽減した。



(4) 末梢神経障害性疼痛モデルの知覚神経節に BoNT/A を直接投与することによる鎮痛反応

後根神経障害性疼痛モデルを作成したところ、温熱刺激、機械刺激に対する閾値の低下が観察された。このモデルの後根神経節に BoNT/A を直接投与したところ、閾値の回復が観察された。このことから、BoNT/A は神経節において効果を表すことが理解できた。また、BoNT/A 投与後には CGRP に陽性を示す後根神経節細胞が減少しており、BoNT/A が神経伝達

物質の遊離に關与していることが理解できた。



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6件)

松香芳三. 非菌原性歯痛の発症機序, 診断, 治療. 四国歯学会雑誌, 25:29-38, 2013. 査読無, URL 無

Matsuka Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Suzuki T, Nishikawa A, Ohyama T, Watanabe T, Kuboki T, Nagai A, Oguma K. Application of purified botulinum type A neurotoxin to treat experimental trigeminal neuropathy in rats and patients with urinary incontinence and prostatic hyperplasia. Journal of Toxicology (online journal) 2012. 査読有 DOI:10.1155/2012/648384

Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Maruhama K, Yamamoto Y, Neubert JK, Noland TA, Watanabe K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Intradermal injection of Botulinum toxin type A alleviates infraorbital nerve constriction-induced thermal hyperalgesia in an operant assay. Journal of Oral Rehabilitation 39: 63-72, 2012. 査読有 DOI:10.1111/j.1365-2842.2011.02236.x

Svensson P, Baad-Hansen L, Pigg M, List T, Eliav E, Ettlin D, Michelotti A, Tsukiyama Y, Matsuka Y, Jääskeläinen SK, Essick G, Greenspan JD, Drangsholt M. Guidelines and recommendations for

assessment of somatosensory function in orofacial pain conditions - a taskforce report. Journal of Oral Rehabilitation 38:366-394, 2011. 査読有 DOI:10.1111/j.1365-2842.2010.02196.x
Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Yamamoto Y, Sato K, Watanabe K, Kuboki T, Oguma K. Peripheral administration of botulinum toxin type A neurotoxin reverses trigeminal neuropathic pain symptoms. http://posters.f1000.com/PosterList?posterID=763, 2011. 査読有
Kumada A, Matsuka Y, Kitamura Y, Spigelman I, Ishihara Y, Yamamoto Y, Hikasa T, Sonoyama W, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Peripheral administration of Botulinum toxin type A decreases exaggerated neurotransmitter release and reverses neuropathy-induced gene expression changes in trigeminal ganglia. http://posters.f1000.com/Conferences?confID=3§ID=null&posterID=266.12, 2010. 査読有

[学会発表](計14件)

黒厚子璃佳, 岩田こころ, 大本勝弘, 丸瀧功太郎, 松香芳三. 神経障害性疼痛における末梢知覚神経節での神経伝達物質の関与. 四国歯学会, 2014年3月20日, (徳島県)徳島大学.

松香芳三. 口腔顔面痛の疼痛伝達メカニズムと新規治療法の開発 - 知覚神経節細胞からの神経伝達物質遊離 -. 日本歯科基礎医学会, 2013年9月22日, (岡山県)岡山コンベンションセンター.

丸瀧功太郎, 松香芳三, 寺山隆司, 窪木拓男, 杉本朋貞. 一次求心ニューロンによる精製 A 型ボツリヌス毒素の取り込みと軸索輸送. 日本歯科基礎医学会, 2013年9月21日, (岡山県)岡山コンベンションセンター.

丸瀧功太郎, 松香芳三, 古味佳子, 大野光昭, 前川賢治, 窪木拓男. 神経毒素成分を精製した A 型ボツリヌス毒素の三叉神経への効果. 日本補綴歯科学会, 2013年5月18, 19日, (福岡県)福岡国際会議場.

Maruhama K, Matsuka Y, Yamamoto Y, Terayama R, Komi K, Ono M, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Sugimoto T, Matsushita O, Kuboki T. Botulinum toxin endocytosis into trigeminal neurons alleviates neuropathic pain. International Association for Dental Research, 2013年3月22日, (アメリカ)ワシントン州コンベンションセンター.

松香芳三, 丸瀧功太郎, 三宅愛, 山本由弥子, 前川賢治, 古味桂子, 園山 亘, 小

熊惠二, 窪木拓男. 神経障害性疼痛へのボツリヌス毒素の効果. 日本歯科医学会総会, 2012年11月11日, (大阪府) インテックス大阪.

丸濱功太郎, 松香芳三, 山本由弥子, 寺山隆司, 古味佳子, 大野充昭, 前川賢治, 上岡 寛, 山城 隆, 杉本朋貞, 松下治, 小熊惠二, 窪木拓男. 神経毒素成分を精製したA型ボツリヌス毒素の三叉神経への取り込みと輸送. 日本口腔顔面痛学会, 2012年11月3日, (東京都) 慶應義塾大学.

Maruhama K, Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Yamamoto Y, Suzuki T, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Botulinum neurotoxin type A endocytosis into trigeminal neurons and its effect on neuropathic pain behavior. Society for Neuroscience, 2011年11月15日, (アメリカ)ワシントン州コンベンションセンター.

Oguma K, Yamamoto Y, Suzuki T, Yokoyama T, Matsuka Y, Arimitsu H, Kuboki T. Medical application of clostridial toxins; 1) Clostridium botulinum neurotoxin. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月9日, (北海道) 札幌コンベンションセンター.

Kumada A, Matsuka Y, Yamamoto Y, Suzuki T, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Watanabe K, Maruhama K, Maekawa K, Kamioka H, Yamashiro T, Kuboki T, Oguma K. Botulinum toxin type A neurotoxin endocytosis into trigeminal neuron and its effect onto neuropathic pain behavior. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月7日, (北海道) 札幌コンベンションセンター.

渡邊一博, 松香芳三, 丸濱功太郎, 熊田 愛, 前川賢治, 園山 亘, 窪木拓男. 知覚神経節へのボツリヌス毒素投与による神経障害性疼痛モデルラットの疼痛行動変化. 日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2011年9月4日, (岡山県) 岡山大学.

熊田 愛, 松香芳三, 丸濱功太郎, 前川賢治, 窪木拓男. 三叉神経領域における神経障害性疼痛に対する改良A型ボツリヌス毒素の効果. 日本補綴歯科学会, 2011年5月20-22日, (広島県) 広島国際会議場.

Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Yamamoto Y, Satoh K, Watanabe K, Kuboki T, Oguma K. Peripheral administration of Botulinum toxin type A neurotoxin reverses trigeminal neuropathic pain symptoms. Society for Neuroscience, 2010年11月

15日, (アメリカ) サンディエゴコンベンションセンター.

Kumada A, Matsuka Y, Spigelman I, Neubert JK, Nolan TA, Yamamoto Y, Sato K, Watanabe K, Yamamoto K, Murakami K, Kuboki T, Oguma K. Peripheal administration of Botulinum toxin type A neurotoxin reverses trigeminal thermal hyperalgesia. Asian Academy of Craniomandibular Disorders, 2010年10月3日, (福岡県) 九州大学.

〔図書〕(計1件)

松香芳三. 非歯原性歯痛の診断手順、異所性疼痛メカニズム. 医歯薬出版, 歯界展望, 2013, 121: 344-350.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松香 芳三 (MATSUKA, Yoshizo)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授
研究者番号: 90243477

(2) 研究分担者

窪木 拓男 (KUBOKI, Takuo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00225195

山本 由弥子 (YAMAMOTO, Yumiko)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20403496

熊田 愛 (KUMADA, Ai)
岡山大学・岡山大学病院・医員
研究者番号: 40610895

(3) 連携研究者

小熊 惠二 (OGUMA, Keiji)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 00002262