

## 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 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22592039

研究課題名（和文）三叉神経傷害後の顎顔面領域における異所性疼痛発生メカニズムの解明  
 研究課題名（英文）Clarify of extra-territorial pain hyperalgesia in maxillofacial region following a trigeminal nerve injury.

研究代表者

渡邊 峰朗 (Watanabe Mineo)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80325183

研究成果の概要（和文）：骨髄間質細胞を尾静脈より注入すると、ラット眼窩下神経傷害後の痛覚過敏が緩和された。オピオイド受容体拮抗薬naloxone hydrochlorideを投与により、痛覚過敏が再発した (Guo, Watanabe et al. Stem cells 2011)。眼窩下神経傷害またはオトガイ神経切断後に、痛覚過敏が発現し、三叉神経脊髄路核にP2X<sub>7</sub>受容体、TNF- $\alpha$ 、p38 MAPKリン酸化発現が亢進した。痛覚過敏とTNF- $\alpha$ の発現亢進は、P2X<sub>7</sub>受容体拮抗薬、p38 MAPKリン酸化阻害薬により抑制された (Ito, Watanabe et al. European J Pain 2013, Murasaki, Watanabe et al. J Dent Res 2013)。

研究成果の概要（英文）：Intravenous injection of bone marrow stromal cells reversed pain hypersensitivity in rats after the infraorbital nerve injury. The pain hypersensitivity was rekindled by naloxone hydrochloride, an opioid receptor antagonist (Guo, Watanabe et al. Stem cells 2011) . The infraorbital nerve injury or the mental nerve transection induced pain hyperalgesia, and up-regulation of P2X<sub>7</sub> receptor, TNF- $\alpha$  and phosphorylated (p)-p38 MAPK in the trigeminal sensory nuclear complex. Pain hyperalgesia or up-regulation of TNF- $\alpha$  in was inhibited by a P2X<sub>7</sub> receptor antagonist or p-p38 MAPK inhibitor (Ito, Watanabe et al. European J Pain 2013, Murasaki, Watanabe et al. J Dent Res 2013) .

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：口腔解剖学（含組織学・発生学）、病態痛

### 1. 研究開始当初の背景

異所性疼痛は病的疼痛であり、臨床上重大な問題になるがその発生メカニズムは不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本実験では、三叉神経傷害後の顎顔面領域における異所性疼痛について、炎症性サイトカインとギャップ結合に注目してその発生メカニズムを明らかにする。さらに核酸分子を用いた治療薬についても検討する。本研究はギャップ結合と炎症性サイトカインに注目した新たな鎮痛療法を模索するものである。また、siRNA をラットに用いた *invivo* の実験系はほとんど報告されていない。慢性疼痛により世界で 1500 万人以上の多くの患者が苦しみ、その一部は歯科治療を困難にしている。異所性疼痛における痛覚信号の修飾機構の解明は疼痛除去と管理に科学的根拠を与える意味で重要と考えられ、波及効果は極めて大きいと考えられる。

### 3. 研究の方法

実験動物として、Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。麻酔下にて、ラット眼窩下神経損傷 (図 1) またはオトガイ神経切断の手術を行った。術後、異所性疼痛としての有用性を検証するため、von Frey filament を用いて whisker pad における機械的疼痛逃避行動テストを行い、疼痛閾値を評価した (図 2)。ラット眼窩下神経損傷モデルに骨髄間質細胞の尾静脈注入、オピオイド受容体拮抗薬である naloxone hydrochloride、または naloxone methiodide を投与し鎮痛効果を検証した。次に、ラット眼窩下神経損傷、またはオトガイ神経切断後の三叉神経脊髄路核における小膠細胞及び P2X<sub>7</sub> 受容体の発現を確認するため、小膠細胞のマーカーである Iba1 および P2X<sub>7</sub> 受容体などの免疫染色を行った。また、神経損傷後の三叉神経脊髄路核における Iba1、P2X<sub>7</sub> 受容体、p-p38、TNF- $\alpha$  などの発現を Western blot により検討した。P2X<sub>7</sub> 受容体特異的拮抗薬や p38 MAPK リン酸化阻害薬を髄膜下投与し、機械的疼痛逃避行動テストを行い、三叉神経脊髄路核における Iba1、P2X<sub>7</sub> 受容体、p-p38、TNF- $\alpha$  の発現に与える影響を Western blot を用いて検討した。



図 1 ラット眼窩下神経損傷



図 2 疼痛逃避行動テスト

### 4. 研究成果

ラット疼痛モデルに骨髄間質細胞を尾静脈より移植すると病態痛が緩和され、この効果は22週まで持続した。一方、骨髄間質細胞移植後1-5週において、末梢中枢性に作用するオピオイド受容体拮抗薬 naloxone hydrochloride を投与すると骨髄間質細胞移植による鎮痛効果は減弱した。末梢性に作用するオピオイド受容体拮抗薬 naloxone methiodide を投与すると、骨髄間質細胞移植後3週以内では鎮痛効果は減弱が認められたが、3週以後では鎮痛効果の減弱は認められなかった。骨髄間質細胞移植による鎮痛効果は、末梢と中枢のオピオイド受容体が関与することが明らかとなった (Guo, [Watanabe et al. Stem cells 2011](#))。

眼窩下神経傷害後に、三叉神経脊髄路核において活性化した小膠細胞に P2X<sub>7</sub> 受容体が強発現した。眼窩下神経絞扼後の神経因性疼痛と TNF- $\alpha$  は発現亢進は、P2X<sub>7</sub> 受容体拮抗薬、p38 MAPK リン酸化阻害薬により抑制された。小膠細胞に発現する P2X<sub>7</sub> 受容体にリガンドが結合することにより p38 MAPK がリン酸化し TNF- $\alpha$  の放出され、顎顔面領域における神経因性疼痛を発生していることが明らかとなった (Ito, [Watanabe et al. European J Pain 2013](#))。

ラットのオトガイ神経を切断後、小膠細胞の6週にも及ぶ長期にわたる活性が確認された。小膠細胞に発現する P2X<sub>7</sub>、p-p38、及び TNF- $\alpha$  は6週にも及ぶ長期にわたり増加した。P2X<sub>7</sub> 受容拮抗薬により、p-p38・TNF- $\alpha$  の増加と異所性疼痛が抑制された。小膠細胞が放出

するTNF- $\alpha$ は、異所性疼痛の発生初期だけでなくその慢性期にも関与していることが示された (Murasaki, Watanabe et al. J Dent Res 2013)。

モデル動物の作製が困難であることから、三叉神経領域は坐骨神経などの領域と比べ慢性疼痛の基礎研究があまり進んでおらず、いまだ不明な点が多い。世界的にみて、顎顔面領域の疼痛逃避行動テストを遂行できる実験グループは我々も含めてわずかである。また、骨髄間質細胞、P2X<sub>7</sub>受容体と慢性疼痛についての研究はわずかに数例報告されているだけである。慢性疼痛により世界で1500万人以上の多くの患者が苦しむ、その一部は歯科治療を困難にしている。したがって、本研究の結果は、疼痛除去と管理に科学的根拠を与える意味で重要と考えられ、波及効果は極めて大きいと考えられる。

#### 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. Ito G, Suekawa Y, Watanabe M, Takahashi K, Inubushi T, Murasaki K, Hirose N, Hiyama S, Uchida T, Tanne K. P2X<sub>7</sub> receptor in the trigeminal sensory nuclear complex contributes to tactile allodynia/hyperalgesia following trigeminal nerve injury. Eur J Pain. 査読有, 2013, 85-99.
2. Murasaki K, Watanabe M, Takahashi K, Ito G, Suekawa Y, Inubushi T, Hirose N, Uchida T, Tanne K. P2X<sub>7</sub> receptor and cytokines contribute to extra-territorial facial pain. J Dent Res. 査読有, 2013, 260-5.
3. Guo W, Wang H, Zou S, Gu M, Watanabe M, Wei F, Dubner R, Huang GT, Ren K. Bone marrow stromal cells produce long-term pain relief in rat models of persistent pain. Stem Cells. 査読有, 2011, 1294-303.

[学会発表] (計9件)

1. Takahashi K, Watanabe M, Suekawa Y, Ito G, Murasaki K, Hirose N, Hiyama S, Uchida T, Tanne K. Astrocytic Interleukin-1 $\beta$  contributes to neuropathic pain following mental nerve injury. 88th General Session & Exhibition of the IADR, July 14-17, 2010, Barcelona, Spain
2. Guo W, Zou S, Gu M, Wei F, Watanabe M, Huang G, Dubner R, Ren K. Bone marrow stromal cells produce longterm

pain relief in rat models of persistent orofacial pain. 41st annual meeting of Society for Neuroscience, Nov.13-16, 2011, Washington DC, U.S.A

3. Watanabe M, Hiyama S, Uchida T. IL-1 $\beta$  in trigeminal nucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. 第117回 日本解剖学会総会・全国学術集会, 2012年3月26日~28日, 甲府市
4. Guo W, Gu M, Zou S, Watanabe M, Wei F, Dubner R, Ren K. Altered glutamate homeostasis in descending circuitry correlates with the emergence of pain chronicity. 14th World Congress on Pain, August 27-31, 2012, Milano, Italy
5. Watanabe M, Uchida T. A role of P2X<sub>7</sub> receptor in neuropathic pain following trigeminal nerve injury. 第54回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2012年9月14日~16日, 郡山市.
6. 村崎恭子, 渡邊峰朗, 伊藤剛志, 高橋 拓史, 内田 隆, 丹根一夫. 三叉神経傷害後の顔面領域における異所性疼痛発現に対する小膠細胞の役割. 第71回日本矯正歯科学会大会, 2012年09月26日~28日, 日盛岡市
7. 渡邊峰朗, 伊藤剛志, 村崎恭子, 高橋 拓史, 末川洋平, 広瀬尚人, 丹根一夫, 内田 隆. 顎顔面領域の神経因性疼痛発現における P2X<sub>7</sub>受容体の役割. 第96回広島大学歯学会(併催)第51回広島県歯科医学会, 2012年10月28日, 広島市
8. Murasaki K, Watanabe M, Takahashi K, Ito G, Suekawa Y, Inubushi T, Hirose N, Uchida T, Tanne K. TNF- $\alpha$  in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. The 45th Scientific Congress of Korean Association of Orthodontists 4th Joint Symposium of KAO and JOS, Nov 1-3, 2012, Seoul, Korea.
9. 渡邊峰朗, 伊藤剛志, 村崎恭子, 高橋 拓史, 末川洋平, 広瀬尚人, 丹根一夫, 内田 隆. 顎顔面領域の神経因性疼痛発現におけるP2X<sub>7</sub>受容体の役割. 第118回日本解剖学会総会・全国学術集会. 2013年03月28日~3月30日, 高松市.

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 峰朗 (Watanabe Mineo)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：80325183

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：