

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 5 月 31 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592270

研究課題名（和文）三叉神経節におけるグリアを介した情報伝達システムの解析

研究課題名（英文）Analysis of the communication-of-information system through glial cell in trigeminal ganglion

研究代表者

徳永 敦（Tokunaga Atsushi）

大阪歯科大学・歯学部・講師（非常勤）

研究者番号：70254521

研究成果の概要（和文）：

行動学的検討において、下歯槽神経切断後 1 日目より顔面領域（口ひげ部）における持続的な疼痛閾値の低下が確認された。また、免疫組織学的検討において切断側の三叉神経脊髄路核尾側垂核においてグリア細胞のマーカー蛋白 Iba1 と GFAP の発現増加、さらには IL-18 の著明な発現増加が 3 日目より認められた。さらに二重染色において IL-18 は Iba1 と p-p38 との同局在を認めた。

以上より、下歯槽神経損傷によりグリア細胞が活性化し、IL-18 の発現増加が神経損傷に起因する慢性疼痛の発現に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Interleukin -18 (IL-18) is an important regulator of innate and immune responses, and is known to be expressed in various types of cells and upregulated in pathological conditions including tissue injury and inflammation, suggesting it has both proinflammatory and compensatory roles. Here we show that IL-18 was increased in microglia in the trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) after peripheral nerve injury. We used a trigeminal neuropathic pain model in which the withdrawal threshold of maxillary whisker pad skin was significantly decreased after inferior alveolar nerve transection, and observed a striking increase in IL-18 expression in the Vc around the obex area from 3d and continued until 14d after nerve injury. The IL-18 labeled cells were largely colocalized with Iba1, suggesting this upregulation occurred in hyperactive microglia. We also found that the IL-18 induction coexisted with phosphorylated p38 MAPK, indicating a possible role of p38 in the regulation of IL-18. Our findings are the first report that injury of trigeminal nerve induced IL-18 upregulation in activated microglia in the Vc, suggesting a possible role of IL-18 in orofacial neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：三叉神経 グリア 情報システム

1. 研究開始当初の背景

近年、末梢神経損傷や末梢の炎症などにより脊髄や脳幹で microglia や astrocyte が活性化され、これら glial cell で IL-1 β などの cytokine が産生されることが示唆されている。また、脊髄だけではなく、後根神経節においても末梢神経傷害などにより glial cell の活性化が示唆されている。これは、神経細胞がシナプスを介することなく情報を伝達、あるいは影響を及ぼし合う可能性を示唆しており、末梢神経傷害において後根神経節内で損傷神経が非損傷神経に何らかの影響を及ぼし神経傷害性疼痛を惹起、あるいは増強している可能性が考えられる。三叉神経領域においては支配領域の異なる神経細胞が同一神経節に存在するため損傷領域の神経細胞が非損傷領域の神経細胞に何らかの影響を及ぼし非損傷領域での感覚異常を引き起こすことが想像される。動物実験においては下歯槽神経などの末梢神経傷害後、損傷神経の支配領域を越えて hyperalgesia や allodynia が出現することが報告されている。また、眼窩下神経(上顎神経領域)の損傷後、三叉神経節の下顎神経領域で preprotachykinin mRNA が増加することが報告されている。microglia と考えられる ED-1 陽性細胞を認めた。ED-1 陽性細胞は損傷神経細胞のマーカーである ATF3 陽性ニューロンの周囲だけでなく、下顎神経領域以外でも観察され、非損傷領域にまで何らかの影響が及んでいることが確認された。

2. 研究の目的

抜歯やインプラント、根管治療などの歯科処置における神経障害性疼痛の発生率は 0.36~6% であり、疫学的には多いとはいえないが、発症すると難治性でありその病的疼痛状態は患者の QOL を著しく低下させる。この異常疼痛に関して様々な研究がなされているが、そのメカニズムに関して不明な点が多い。

近年、脊髄後角や三叉神経脊髄路核でのサイトカイン (IL-1 β , TNF- α など) やグリア細胞 (マイクログリアやアストロサイトなど) の発現増加が神経障害性疼痛の病態に関与しているという報告が増えてきている。インターロイキン 18 (IL-18) は、先天的免疫反応における重要な調節因子であり、また組織損傷や炎症などの病的状態で増加する炎症性サイトカインとして、生体への関与が注目されている。

本研究の目的は、三叉神経損傷に起因する三叉神経脊髄路核尾側亜核における IL-18 の発現動態と IL-18 とグリア細胞の関連を調べ、神経障害性疼痛の発症機序を解明すること

である。

3. 研究の方法

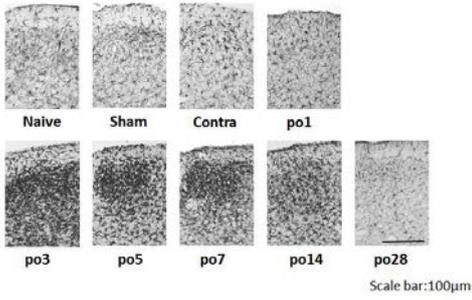
方法は、ペントバルビタール麻酔ラットの左側下歯槽神経を切断し、下歯槽神経損傷モデルを作製した。同様の麻酔下で疑似手術 (Sham) 群の作製も行った。行動学的実験は、von Frey filament を用いて顔面領域 (口ひげ部) における疼痛発現変化を経時的に検討した。モデル作製前に control (Control 群) を測定し、下歯槽神経切断後 1, 3, 5, 7, 14, 28 日目に疼痛閾値を測定した。Control 群, Sham 群, 下歯槽神経切断後 1, 3, 5, 7, 14, 28 日目のラットの灌流固定を行い、脳幹を摘出して、三叉神経脊髄路核における各種グリア細胞のマーカー (Iba1:マイクログリアのマーカー, GFAP:アストロサイトのマーカー), p-p38:リン酸化 p38, および IL-18 の発現変化について免疫組織学的に検討した。

4. 研究成果

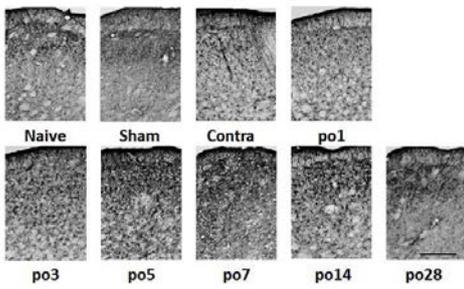
行動学的検討において、Sham 群は手術後 1 日目に Control 群と比較して疼痛閾値の低下が認められ、術後 3 日目から疼痛閾値が術前レベルまで戻ったのに対し、下歯槽神経損傷群は術後 1 日目から 28 日目まで持続的な疼痛閾値の低下が認められ、神経障害性疼痛モデルであることを確認した。免疫組織学的検討では、IL-18 の発現は非損傷側に比べて、門 (obex) から尾側に 4 mm~頭側に 2 mm の範囲で増加が認められた。最も発現増加が認められたエリアは obex から尾側に 1 mm であった。また、経時的定量測定において下歯槽神経損傷後 3 日目から 14 日目まで IL-18 の発現増加が認められ、最も顕著であったのは損傷後 3 日目であった。二重染色法において、IL-18 陽性細胞は GFAP 陽性細胞とは同一局在を認めなかったのに対し、Iba1 陽性細胞と p-p38 陽性細胞とは同一局在を認めた。

下歯槽神経損傷後の IL-18 の発現増加の経時的变化はマイクログリアの経時的变化と類似しており、二重染色においてマイクログリアと p-p38 は同一局在であったことより、IL-18 はマイクログリアの p38MAPK シグナル経路の活性化により活性型マイクログリアから遊離することが示唆された。また行動学的検討において疼痛閾値の低下が 28 日まで持続したのに対し、IL-18 の発現増加は 14 日目までであったことより、IL-18 は神経障害性疼痛の初期の段階において病態形成に関与していることが示唆された。以上より IL-18 のシグナル抑制が、口腔顔面における神経障害性疼痛の治療となりうることが示唆された。

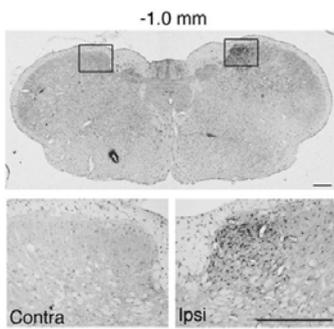
Iba1 (マクログリアのマーカータンパク)



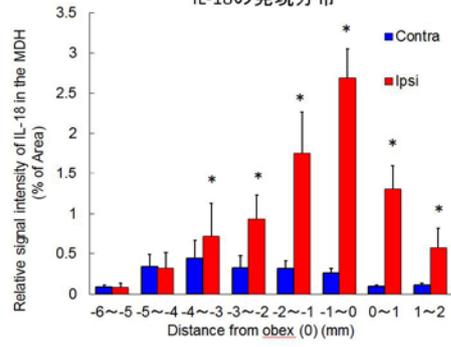
GFAP (アストロサイトのマーカータンパク)



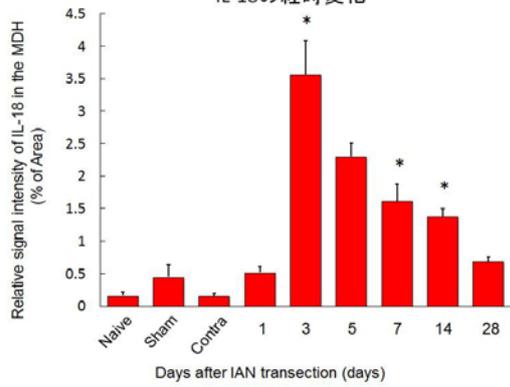
IL-18 の発現レベル



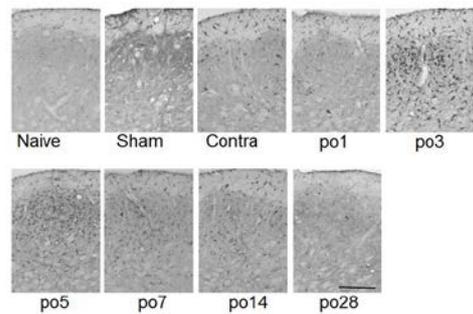
IL-18の発現分布



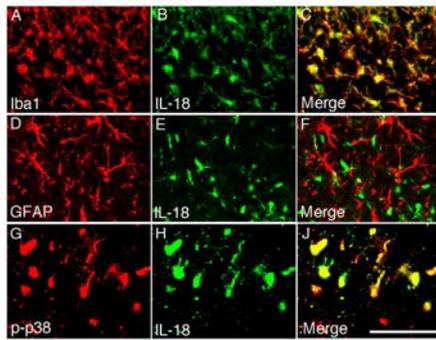
IL-18の経時変化



IL-18 の発現の経時的変化



二重染色



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1件)

- ① 大郷英里奈、佐久間泰司、徳永 敦、三好 歓、野口光一、小谷順一郎、下齒槽神経損傷モデルにおける三叉神経脊髓路核での IL-18 の発現増加、第 109 回近畿臨床歯科麻酔研究会 大阪、2013 年 2 月 9 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

徳永 敦 (Tokunaga Atsushi)
大阪歯科大学・歯学部・講師 (非常勤)
研究者番号：70254521

(2) 研究分担者

小谷 順一郎 (Kotani Junichiro)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：40109327

佐久間 泰司 (Sakuma Yasushi)
大阪歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：20205800

(3) 連携研究者

野口 光一 (Noguchi Koichi)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号 10212127