様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号:27102
研究種目:若手研究(B)
研究期間:2010～2011
課題番号:22792005
研究課題名(和文):口腔顔面癌モデルラットに対する中枢疼痛抑制の検討
研究課題名(英文):Examination of central pain suppression in a facial cancer model
研究代表者:原野　望(HARANO　NOZOMU)
九州歯科大学･歯学部･助教
研究者番号:50423976

研究成果の概要（和文）:

我々の口腔顔面癌モデルの初期段階においては、末梢性ではなく中枢性のグリア細胞の活性化が、自発痛の拡大や異痛症そして過敏症の発生に関与していることが判明した。またこの段階において、活性化する中枢グリア細胞にはミクログリアとアストロサイトがあり、後期にはアストロサイトが主に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）:

Glial activation in the central nervous system, but not in the peripheral nervous system, mediates the enhancement of spontaneous pain and the development of allodynia and hyperalgesia at an early stage in the facial cancer model. And central glial hyperactivation, transient microglial hyperactivation and persistent astrocytic hyperactivation, contributes to the development of pain hypersensitivity but not to the maintenance of pain in this model.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
22 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総　計	2,700,000	810,000	3,510,000

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：口腔顔面癌、癌性疼痛、三叉神経脊髄路核尾側亜核、アストロサイト、ミクログリア

１．研究開始当初の背景

我々が開発した口腔顔面癌モデルでは癌性疼痛が出現するが、これは炎症性や神経障害から引き起こされる疼痛とは異なる経路で発症していることがわかった。よって、このことが癌性疼痛の難治性に関与している可能性があった。

２．研究の目的

（１）他の炎症・神経障害モデルではグリア細胞の活性化が痛みの発生に関与していると報告があるが、実際我々のモ

デルではグリア細胞の活性化があるのか、またこのグリア細胞の活性化を抑制することが鎮痛に繋がるのかを調査した。
（２）次に中枢グリア細胞の活性化の経時的変化が癌性疼痛にどのように関連するかを調査した。

３．研究の方法

（１）

①GFP を発現させたラット由来乳癌細胞を３週齢雄性ラットの右側鼻毛部に接種し、モデルを作製した。

②摂取前と接種後３日目に疼痛テストを行なった。

③４日目に三叉神経脊髄路核尾側亜核の組織を摘出し、GFAP、Iba1 を用いて蛍光免疫染色を行なった。

④本モデルでの癌性疼痛機序が神経障害機序と異なるかどうかを確認するため、４日目に三叉神経節の組織を摘出し、ATF-3 を用いて蛍光免疫染色を行なった。

⑤さらに、末梢性グリアの変化をみるために､三叉神経節をGFAP 染色した。

⑥さらにグリア細胞の活性を抑制するプロペントフィリンを腹腔内投与し、グリア活性の抑制効果を疼痛関連行動テストや免疫組織学的観察にて調査した。

（２）

①上記のようにモデルを作製し、接種後 11 日目まで検討した。

②三叉神経脊髄路核尾側亜核を摘出し、免疫蛍光染色方およびウェスタンブロッティング法により Iba1、GFAP の変化について検討した。

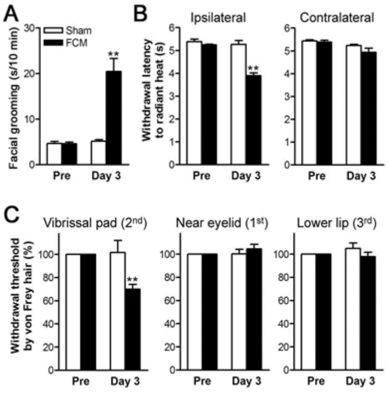
③痛覚関連行動について検討した。

④摂食障害の有無、ならびにプロペントフィリン投与による疼痛抑制効果について検討した。

４．研究成果

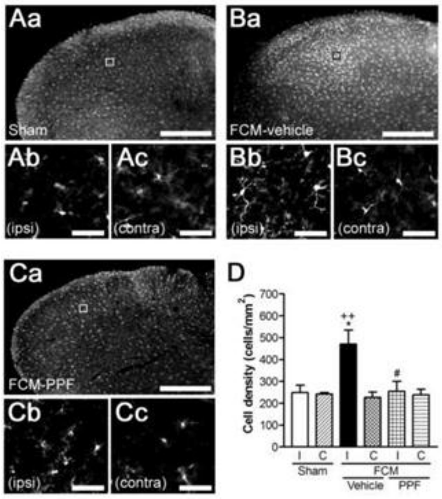
（１）

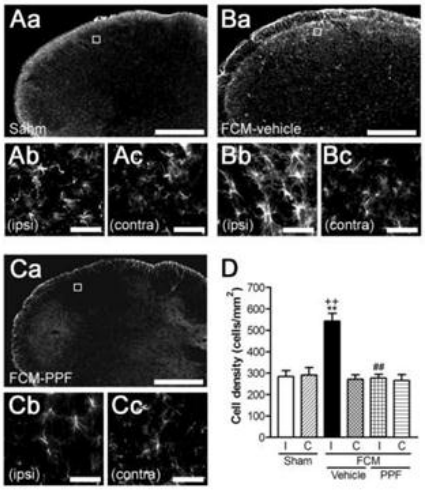
①疼痛テストにおいてGFP 発現癌細胞を投与した癌モデルでは、投与後１日目より機械的刺激疼痛閾値や熱刺激逃避潜時の低下、さらにグルーミング時間の延長がみられ、自発痛、allodynia や hyperalgesia が引き起こされることがわかった。（下図）



②三叉神経節においては GFAP の活性化ならびにATF-3 の発現はみられなかった。
→本モデルでは末梢性グリア細胞は活性化せず、また神経障害もみられないことが示唆された。

③三叉神経脊髄路核尾側亜核では、投与側の Iba1、GFAP の免疫反応像が、反対側や sham 群と比較して顕著に上昇していた。（上図 Iba1、下図 GFAP）





→本モデルでは中枢性グリア細胞が活性化していることが示唆された。

④プロペントフィリン投与により、腫瘍の大きさの変化なしに中枢性グリア細胞が抑制され、異常疼痛も抑制された。

「結果」

口腔顔面癌モデルでの初期における異常疼痛には中枢性グリア細胞の活性化が関与している。

（２）

①癌接種後４日目ではミクログリアの活性化が認められたが、11 日目には活性化は認められなかった。アストロサイト活性化は 4 日目から認められ、経時的に大きくなった。（ウェスタンブロッキング法）

②４日目においてはミクログリアの活性化は脳幹の頭側部分、尾側部分共に認められたが、11 日目にはどちらの部分にも認められなかった。アストロサイトの活性化は４日目では頭側部分に認められ、11 日目には頭側部分、尾側部分に認められた。

③④接種４日後からのプロペントフィリン投与により、接種部位での疼痛には抑制効果はあまり見られなかったものの、接種６日後では他の顔面領域で発生する疼痛に強い抑制を示した。また癌モデルでは接種後９日目で摂食障害を示したが、プロペントフィリン投与によって抑制された。

⑤接種後４日目、７日目、11 日目における脳幹部分でのミクログリアおよびアストロサイトの活性化はプロペントフィリンにより抑制された。（免疫蛍光染色法）

「結果」

口腔顔面癌モデルラットにおける癌性疼痛の発生には初期にはミクログリアとアストロサイトの活性化が関与し、後期にはアストロサイトが主に関与している。

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４件）

Teppei Sago, Kentaro Ono, Nozomu Harano et al, Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model, Brain Research, 1457, 2012, 70-80. 査読有

Ono K, Harano N, Inenaga K, Nakanishi O. A rat pain model of facial cancer, Methods Mol Biol, 851, 2012, 149-157. 査読無

Kentaro Ono, Nozomu Harano et al., Mechanisms of cancer-induced pain, Journal of the Kyushu Dental Society, Vol65, No.3, 60-67. 査読有

K. Hidaka, K. Ono, N. Harano et al, Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model, Neuroscience, 180, 2011, 334-343. 査読有

〔学会発表〕（計３件）

N. Harano et al. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model, Neuroscience, November 15, 2010, San Diego Convention Center

山本 徹, 小野堅太郎, 人見涼露, 原野 望, 吉田充広, 布巻昌仁, 椎葉俊司, 稲永清敏：ラット三叉神経節ニューロンにおけるエンドセリンＢ受容体を介した細胞内カルシウム濃度上昇、第 89 回日本生理学会大会、松本, 2012.3.29

原野 望：口腔顔面癌領域のガン性疼痛の抑制を考える、第 22 回九州歯科麻酔シンポジウム、長崎、2012.3.10

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計◇件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

６．研究組織
(1)研究代表者
　原野　望（HARANO NOZOMU）
　九州歯科大学歯学部・助教
　研究者番号：50423976

(2)研究分担者
　　　　　　　（　　）

研究者番号：

(3)連携研究者
　小野堅太郎（ONO KENTAROU）
　九州歯科大学歯学部・准教授
　研究者番号：40316154

　稲永清敏（INENAGA　KIYOTOSHI）
　九州歯科大学歯学部・教授
　研究者番号：90131903