

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792336

研究課題名（和文）

口腔顔面領域における神経因性疼痛メカニズムと神経栄養因子の関与の解明

研究課題名（英文）

The mechanism of neuropathic pain and effects of neurotrophic factor in the orofacial area

研究代表者

大山口 藍子 (OYAMAGUCHI AIKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70464237

研究成果の概要（和文）：ラットの小脳延髄槽に IB4-Saporin を投与し、非ペプチド性 C 線維を延髄後角尾側亜核（Vc）領域で選択的に削除し、ラット上唇へのホルマリン注射による疼痛関連行動および c-Fos 発現を調べた。IB4-Saporin 処置ラットにおけるホルマリン誘導疼痛関連行動はコントロールと比較して有意に増加した。IB4-Saporin 処置ラットの Vc における c-Fos 陽性細胞数はコントロールに比べて有意に増加した。さらに、IB4-Saporin 処置ラットにおいてホルマリン誘導疼痛関連行動はアルテミンの上唇部への投与により有意に減少した。

研究成果の概要（英文）：The non-peptidergic fibers in the trigeminal subnucleus caudalis (Vc) decreased after IB4 Saporin injection into the cisterna magna. This study examined formalin-induced pain-related behavior (PRB) in the upper lip and c-Fos expression. In IB4-Saporin-pretreated rats, the formalin-induced PRB was significantly increased compared with those of control rats. The numbers of c-Fos-immunoreactive cells increased compared with those of control rats. In IB4-Saporin-pretreated rats, the formalin-induced PRB after artemin injection in the upper lip was significantly decreased compared with those of saline injection rats.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,200,000	660,000	2,860,000

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：歯科麻酔学・神経因性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は現在のところ発症メカニズムが解明されておらず、決定的治療薬の報告はない。口腔顔面領域でみられる神経障害性疼痛は難治性で治療に長期間を有するため、メカニズムの解明と治療法の開発の必要性を実感している。

侵害受容細径無髄神経である C 線維には 2 種類存在することが報告されている。C 線維を出すのは脊髄後根神経節神経の小型細胞であるが、これらの細胞は栄養因子として

NGF（神経成長因子）に依存するものと、GDNF（グリア由来神経活性因子）に依存するものの 2 種類に分けられる。前者は脊髄第 I 層および第 II 層の外側に入力し、TrkA を発現し、CGRP、SP などのペプチドを産生するペプチド性 C 線維である。後者は、脊髄後角第 II 層の内側に入力し、c-Ret を発現し、アデノシン 3 リン酸の受容体である P2X3 をもつ非ペプチド性 C 線維である。これは IB4 に特異的に標識される。このように、これらペプチド性、非ペプチド性の 2 つの C 線維は個々の

神経栄養因子に感受性を持ち、異なる機能を有している (Jason W. Brain Res. 2004) ことが認識されているが、侵害受容シグナルの機能的意義については明らかではない。1 つ目の目的はこの 2 つの C 線維の機能を明らかにすること。

最近、神経栄養因子の GDNF ファミリーの 1 つであるアルテミンの全身投与がアロディニアや痛覚過敏症を改善するという報告 (Luis R Gardell, Nature, 2003) や、糖尿病性ニューロパチーでは神経成長因子 (NGF) が不足していることが示されている。また臨床医学領域では、NGF や BDNF などの神経栄養因子は、神経細胞が変性してゆく神経難病 (アルツハイマー病や筋萎縮性側索硬化症など) の治療薬、神経再生の促進薬、神経細胞死を防ぐ薬となる可能性が考えられている。したがって、顔面領域の神経損傷においても、神経栄養因子の分化・増殖・神経ネットワークの再構築が重要な役割を果たす蛋白質だと予想している。

そこで今回、GDNF family の 1 つであるアルテミンを投与し、口腔顔面領域での疼痛関連行動、脊髄シナプス伝達を明らかにすることが 2 つ目の目的である。この研究結果が臨床的に神経障害性疼痛に対する治療薬の開発に新知見を与えると考え、本研究課題を申請するに至った。

## 2. 研究の目的

侵害受容 C 線維には、NGF に依存性のペプチド性 C 線維と、GDNF に依存性の非ペプチド性 C 線維がある。これら 2 種類の C 線維の機能を明らかにする。さらに神経系の発生、機能、再生に関わる重要な細胞外シグナルの神経栄養因子に着目し、疼痛制御への関わりを明らかにし、神経障害性疼痛の治療戦略の足がかりをつかむことを目的とする。

具体的な目的として、

(1) ペプチド性 C 線維と非ペプチド性 C 線維の 2 つの C 線維の侵害受容様式を解明すること。

(2) 神経活動の指標として c-Fos 陽性細胞数を定量し脳内活動部位の同定と活性化の程度を解析すること。

(3) 神経栄養因子の 1 つであるアルテミンを投与することにより疼痛が制御されるのかを解明すること。

## 3. 研究の方法

(1) ペプチド性 C 線維および非ペプチド性 C 線維の選択的削除法の検討

実験動物は SD 系ラット雄性、体重 180~250g のものを使用する (体重 250g 以上であれば、ほぼ 100% で手術は成功し、手術後の回復も良好である)。ペントバルビタール麻酔下、ラットを両耳道で固定し、実態顕微鏡

下にて小脳延髄槽 (大槽) へマイクロシリンジで IB4-Saporin を注入する。Saporin がリボソームを不活性化し、標的細胞を死滅させるメカニズムを利用する。in vitro では 72 時間で細胞死に至ることが知られている。標的細胞体の周囲 (Vc に近い大槽) に Saporin を投与し、延髄後角尾側亜核における IB4 結合性ニューロンの削除を顕微鏡下で確認する。さらに、Vc での NK1 細胞、三叉神経節での IB4 陽性細胞体数を定量し、確実に死滅させていることを確認する。

(2) 急性痛みモデルとしてホルマリンテストによる疼痛関連行動の定量

ラットの顔面領域へのホルマリンテストを行っており、発痛物質 (1~2% ホルマリン水溶液) を眼窩下神経領域 (ラット上唇) に 50  $\mu$ l 注射し顔面こすり運動を測定し侵害受容反応を調べる。ホルマリン皮下注射後に生じる疼痛行動は脊髄系と同様の 2 相性を示すことをこれまで報告した。皮下注射後から 5 分後の第 1 相、続く鎮静期、ホルマリン注射 10 分後から再度疼痛が再開し 60 分持続する第 2 相である。2 つの C 線維の選択的削除が化学刺激侵害受容行動を増させるのか減少させるのかを明らかにするため、今回予備実験から SP-Saporin によりペプチド性 C 線維を選択的削除させたラットでは疼痛行動が減少したことが分かった。さらに IB4-Saporin 投与により非ペプチド性 C 線維を選択的削除させ、化学刺激性侵害受容 (ホルマリン誘導疼痛関連行動) を調べる。

(3) 免疫組織化学法による c-Fos 陽性細胞発現数の同定

ホルマリンテストの後、4% パラホルムアルデヒドによりラットを還流固定し、ミクロトームを使用し下位脳幹の連続横断切片を作成する。免疫組織化学法にて c-Fos 発現量を定量する。顕微鏡下で、中枢神経内のどの領域に c-Fos 陽性細胞が発現するかを調べることにより、活性化される神経回路が特定できる。また c-Fos 陽性細胞数をカウントすることで特定領域の神経細胞の活動性を定量的に理解することができる。つまり、Vc での c-Fos 発現は 1 次中継核での 2 次ニューロンが活性化し、痛み応答が上位脳へ伝達している証拠となる。

(4) 神経栄養因子のアルテミンを全身投与  
神経損傷モデルラットにアルテミンを 14 日以上皮下投与すると、侵害受容行動や感覚運動機能を完全に機能回復させ、その効果は 6 か月以上続く (Wang R, Nat Neurosci, 2008) という報告がある。今回、Saporin 処置後、2~4 週間後、ホルマリンテストの 5 分前にアルテミンを眼窩下神経領域 (ラット上唇部) へ皮下注射し、侵害受容行動を観察する。

## 4. 研究成果

(1) ペプチド性 C 線維と非ペプチド性 C 線維の 2 つの C 線維の侵害受容様式を解明するため、ラットの小脳延髄槽に IB4-Saporin を投与し、非ペプチド性 C 線維を延髄後角尾側亜核 (Vc) 領域で選択的に削除した (図 1)。また三叉神経節の IB4 陽性神経細胞体数がコントロールに比べて減少した (図 2)。

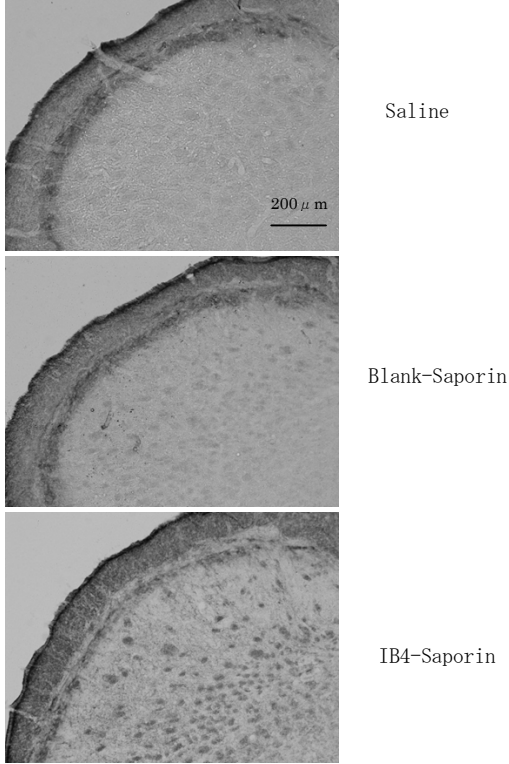


図 1 : Vc における IB4 染色

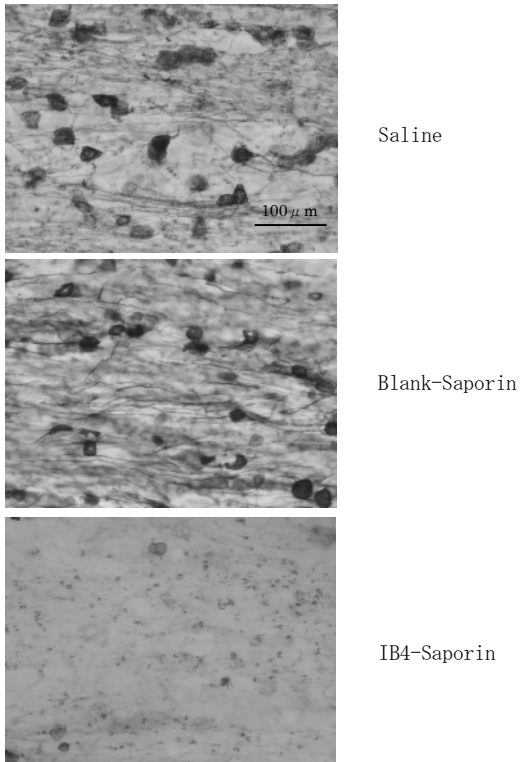


図 2 : 三叉神経節における IB4 組織化学染色

(2) ラット上唇へのホルマリン注射による疼痛関連行動 (PRB) を調べた。また IB4-Saporin 処置ラットにおける PRB は有意に増加した (図 3)。

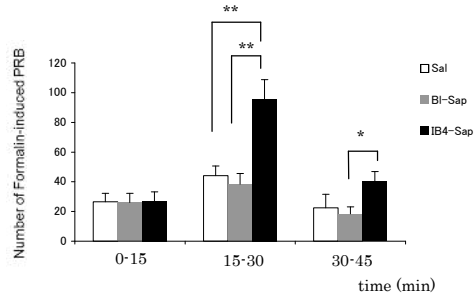


図 3 : ホルマリン誘導平均 PRB 値 (平均値 ± 標準誤差)

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

(3) 神経活動の指標として c-Fos を定量し脳内活動部位の同定と活性化の程度を解析した。結果、Vc の c-Fos 免疫陽性細胞は楕円から円形の核で標識され、標識細胞の多くは Vc の尾側 (門より 1.5-2.4mm 尾側) に分布し、Vc I / II 層の腹外側に分布した (図 4)。IB4-Saporin 処置ラットの c-Fos 発現数はコントロールに比べて有意に増加した (図 5)。

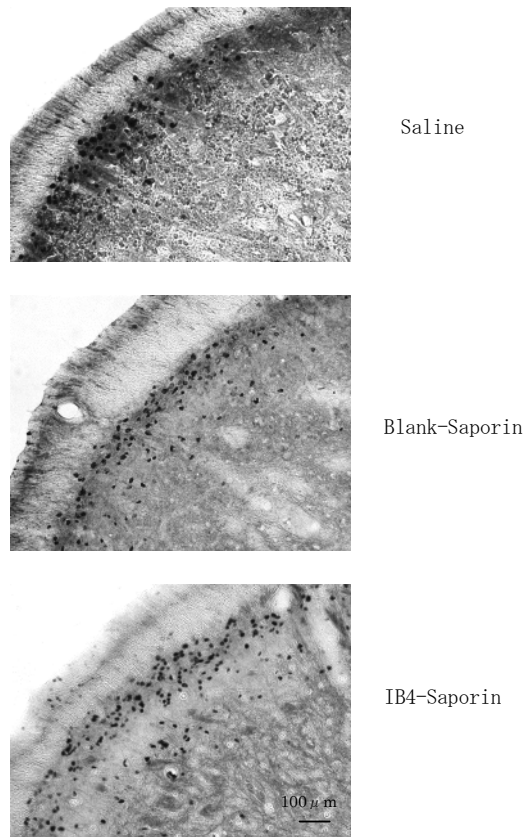


図 4 : Vc におけるホルマリン誘導 c-Fos 陽性細胞の分布

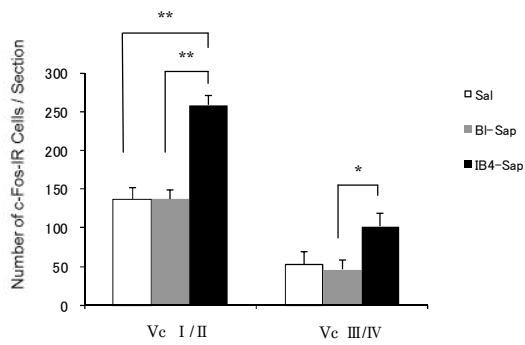


図 5：ホルマリン誘導平均 c-Fos 細胞数  
(平均数±標準誤差)

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

(4) 神経栄養因子の GDNF family の 1 つであるアルテミンにより痛覚過敏が制御されるか調べた。そのため、IB4-Saporin 処置後ラットのホルマリンテスト前に上唇部へアルテミンを投与し PRB を調べた。結果、PRB はアルテミン投与により有意に減少し(図 6)、c-Fos 発現数も減少傾向であった。以上より、非ペプチド性 C 線維は抗侵害受容性制御の役割を持つことが明らかとなり、アルテミンは失った神経機能をもとの状態へ修復する役割を持つ可能性が示唆された。

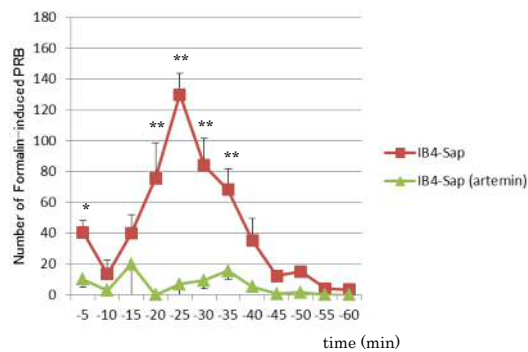
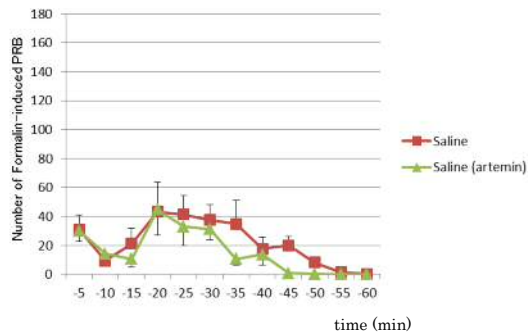


図 6：ホルマリン誘導 PRB 値  
(平均数±標準誤差)

\* $p < 0.05$  \*\* $p < 0.01$

## 5. 研究組織

### (1) 研究代表者

大山口 藍子 (OYAMAGUCHI AIKO)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70464237