

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：27102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792374

研究課題名(和文) 顔面部難治性疼痛の分子機構解明とその治療法の確立

研究課題名(英文) The elucidation of the molecular mechanisms of the orofacial neuropathic pain and its treatment strategy

研究代表者

吉田 充広 (Yoshida, Mitsuhiro)

九州歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：40364153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円、(間接経費) 780,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顔面領域の神経障害性疼痛は難治性で患者生活の質の低下につながる上に気分障害(うつ症状)を併発し、治療も未だ確立されていない。本研究では、神経障害性疼痛発症にはグルタミン酸神経系の活性化、脳由来神経栄養因子分泌の低下が関与していることが明らかとなった。また、神経栄養因子誘導剤の投与により、疼痛症状の緩和だけでなく併発するうつ症状の緩和が可能となることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Orofacial neuropathic pain is sometimes results in deterioration of the quality of life in the patients and the disease accompanies with depression. However, the treatment for the disease has not been established.

In this study the neuropathic pain is resulted from the excessive activation of glutamatergic synaptic transmission and involved with reduction of secretion brain-derived neurotrophic factor (BDNF). The administration BDNF inducer ameliorates the pain and depression in neuropathic pain.

研究分野：外科系歯学

科研費の分科・細目：歯科麻酔学

キーワード：神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は難治性のものが多く、患者の生活の質の低下や医療費の高騰に大きな影響を及ぼしている。特に口腔顔面領域におけるものは、食事や呼吸にも多大な影響を及ぼす。また、難治性神経障害性疼痛患者の約 60%には、うつ病の併発が認められる。さらに、このうつ病による経済的損失は非常に膨大で、また、2010 年 9 月 7 日の厚生労働省の発表では、2009 年度のうつ病による経済的損失は 2 兆円以上と試算されている。したがって、難治性神経障害性疼痛と難治性神経障害性疼痛に併発するうつ症状の発症メカニズムの解明とそれに基づく治療法の確立が急務ではあるが、これらの発症メカニズムに関しては基礎的知見の集積が行われているのが現状であり、臨床における治療方法に関しても、現在行われている神経ブロック療法や薬物療法は奏功しているとは言い難い状態であり、患者にとっても医療者にとっても満足のものではない。

2. 研究の目的

外傷性神経損傷後の神経障害性疼痛の分子機構解明を脊髄神経グリア相互作用の時系列的・局所的変化の面から検討し、神経栄養因子誘導剤投与による神経障害性疼痛の治療の可能性について検討した。また、難治性の神経障害性疼痛に併発する気分障害(うつ症状)にも着目し、その発症原因と治療法についても検討した。

3. 研究の方法

当初は、ラット下歯槽神経結紮による神経障害性疼痛モデルを使用して研究を行う予定であったが、モデルの完全な安定性が得られなかったため、多くの先行研究があるラット坐骨神経結紮モデルを使用して基盤となる研究を進めた。

実験には雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、自由に餌と水を与えた。環境に馴化させるため実験開始まで最低数日間はこの環境下で飼育した。

実験数日前、薬物投与のため、ポリエチレンチューブをクモ膜下腔内に挿入留置した。ラットを Halothane 麻酔下にて頭部を固定後、大槽よりカテーテルを挿入し先端が腰髄に位置するよう留置した。

坐骨神経結紮モデルは、ラットを pentobarbital 麻酔下、左背側大腿部皮膚を切開し、坐骨神経を露出させ、不完全に結紮した。術後、運動障害や運動麻痺のみられたものは実験から除外した。

投与薬剤には Agmatine (Glutamate 受容体および NOS 阻害薬)、MK-801 (非競合的 NMDA 受容体阻害薬)、K-252a 群 (Trk-B 受容体阻害薬)、L-NAME (NOS 阻害薬)、4-Methylcatechol (神経栄養因子誘導剤)を用いた。

痛覚過敏は、左右後肢底部に赤外線を照射

し、後肢を挙げるまでの時間を測定し、健常側との差で熱性痛覚過敏を評価した。

うつ症状の評価には強制水泳試験を用いた。ラットを落ち着かせてから円筒型水槽のプールに入れ、後肢の不動時間をもって不動とし意欲低下等による不動時を測定し、うつ症状の指標とした。

坐骨神経結紮手術後に、ラットを Halothane 麻酔下に生理食塩水および Paraformaldehyde で灌流固定し、脊髄組織を取り出した。Paraformaldehyde にて固定後、パラフィン包埋した。脊髄組織は薄切後、ABC 法により免疫組織化学染色を行った後、陽性細胞を光顕的にカウントした。

4. 研究成果

Glutamate 受容体および NOS 阻害薬、非競合的 NMDA 受容体阻害薬、NOS 阻害薬をラット慢性痛モデル投与した結果、痛覚過敏は減弱したため、慢性痛の発症にはグルタメート神経系の活性化が関与していることが明らかとなった。本研究で使用した Agmatine は神経細胞を NMDA 受容体の polyamine 部位に結合して過分極をもたらすほか、細胞内 NOS の非特異的な阻害作用を有する Glutamate 神経系の活動を抑制する化合物である。一方、MK-801 は非競合部位へ作用する。これらのことから、慢性痛の発症には Glutamate 神経系の興奮とそれに連鎖する NO 産生系カスケードに關与することが予想された。また、Trk-B 受容体阻害薬の投与が痛覚過敏を抑制したことから、慢性痛の発症初期には神経栄養因子の分泌増加、あるいは Trk-B の親和性増加が関与していると考えられる。さらに、神経栄養因子誘導剤の投与により、疼痛とうつ症状が緩和したことから、慢性痛の発症時には神経栄養因子の低下が起こっていることが考えられた。

免疫組織化学染色の検討では、坐骨神経結紮手術後に、c-FOS 陽性細胞数は、脊髄後角および前帯状回、扁桃体、視床下部などで有意に増加したが神経栄養因子誘導剤の投与により、これらの増加が軽減された。また、同様に pERK 陽性細胞数も脊髄後角および脳内帯状回、扁桃体、視床下部などで増加したが神経栄養因子誘導剤の投与により、これらの増加が軽減された。pERK の活性化は、核内プロセスに連鎖するが、今回坐骨神経結紮手術後の慢性疼痛において局所 c-FOS 発現が認められ、末梢神経傷害が pERK 発現に続き核内プロセスをもたらすことが示された。慢性疼痛時には痛覚伝導路(脊髄)、さらには情動系でも pERK の活性化が起き、神経栄養因子誘導剤はこの細胞応答の亢進を抑制し、神経障害性疼痛を軽減するものと考えられる。

本研究では脊髄クモ膜下腔内への神経栄養因子誘導剤投与が神経障害性疼痛を軽減することが分かった。またその効果は、BDNF 様作用すなわち TrkB 受容体-ERK 連関の活性化などが考えられる。神経栄養因子は、交感

神経や中枢神経系の形成やその維持の他、ニューロン死の抑制や軸索再生作用などに必須の蛋白である。また、痛覚および情動系に広く分布し、持続痛のほか認知症、うつ病などの情動機能の変調に密接に関与するとされる。シナプス前・後細胞に神経栄養因子の TrkB 受容体が豊富に局在し、脊髄神経-グリア相互作用の調節メカニズムに密接に関与することから神経疾患の病態発症メカニズム解析や治療への応用が注目されているが、ヒトでは神経栄養因子は高分子であるため生体内半減期が短く、また産生部位近傍で働く特性を持つなどのため、有効量が標的細胞まで到達しないこと、まれに神経興奮も惹起することなど大きな課題があり、未だその治療法は確立されていない。そこで、本研究では、神経栄養因子を誘導する薬剤として、4-Methylcatechol を使用した。

4-Methylcatechol は、はカテコール基を有する化合物で、今までの研究から培養ニューロンおよびアストロサイトにおいて BDNF 合成過程を刺激すること、また幼若ラットへの全身投与、あるいは成熟ラットの脳室内投与で BDNF mRNA が発現することが報告されている。これらの結果は、成熟ラットでは末梢から中枢へは脳血液関門によりその分布・吸収に制限があることを示唆する。しかし一方、4-Methylcatechol の全身投与がラットニューロパチーを改善するという報告もある。これらの事実は、4-Methylcatechol の全身および局所的投与は何らかの中枢神経系内作用を及ぼすことを示唆する。本研究結果は慢性痛が神経栄養因子を含む培養細胞の髄腔内投与により抑制されるとした報告や、糖尿病性ニューロパチーでは神経栄養因子の不足があることを示した報告に比較的符号する。

これまで、神経障害性疼痛は、脊髄シナプス伝達における興奮性アミノ酸神経の過剰興奮と、連鎖する細胞内情報伝達の亢進が主に関わると考えられてきた。本研究では、慢性疼痛時には、神経栄養因子不足に加え、関連する細胞内シグナル pERK 活性や c-FOS 発現の増加が起こり、痛覚伝達経路と合わせ記憶や不快情動に関与する神経回路における変調が起きることが予想された。つまり、このような慢性疼痛時の状況を改善していくことが、新しい神経障害性疼痛の治療法につながると考えられた。

この度の研究では、ラット下歯槽神経結紮による神経障害性疼痛モデルを使用して研究する予定であったが、モデルの安定化が得られず、ラット坐骨神経結紮モデルを使用した研究となった。今後は、ラット下歯槽神経結紮による神経障害性疼痛モデルの安定化を目指すとともに、神経障害性疼痛モデルに、薬剤による慢性疼痛発症モデルを加えて、神経障害性疼痛とそれに伴ううつ症状発症の機序を細胞内シグナルの伝達の面から検討していき、神経栄養因子誘導剤および抗うつ薬による神経障害性疼痛の治療の可能性

を探っていく予定である。

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)

論文

1. 山本悟, 西光晴, 佐々木宏典, 石川浩三, 安田聖子, 澄川泰弘, 岸下裕輔, 井田唯香, 吉田充広, 掛田崇寛, 石川敏三: 新しく開発した家庭用磁気刺激装置の肩こりに対する効果、PAIN RESEARCH 26(4): 215 -221 2011

2. 山田史子, 椎葉俊司, 吉田充広, 原野望, 布巻昌仁, 仲西修, 石川敏三: ラット炎症性疼痛の機構に脊髄神経 - グリア相互作用が関与する、九州歯科学会雑誌、64(6) 201-207、2011

3. 松本吉洋, 椎葉俊司, 福原佳世子, 安田聖子, 石川浩三, 吉田充広, 仲西修, 石川敏三: ラット神経障害性疼痛に対する脊髄 4-Methylcatechol 投与の効果、日本歯科麻酔学会雑誌 40(1) 7-14 2012

5. Distinct time courses of microglial and astrocytic hyperactivation and the glial contribution to pain hypersensitivity in a facial cancer model, Sago T, Ono K, Harano N, Furuta-Hidaka K, Hitomi S, Nunomaki M, Yoshida M, Shiiba S, Nakanishi O, Matsuo K, Inenaga K. Brain Res, May 31;1457:70-80, 2012

6. Activation of Different Signals Identified with Glia Cells Contribute to the Progression of Hyperalgesia, Satoru Yamamoto, Yusuke Kishishita, Mitsuhiro Yoshida, Daisuke Miura, Hidenori Suzuki, Kozo Ishikawa, Hirofumi Miyazaki, Junzo Nojima, Misa Yamamoto, Toshizo Ishikawa, Cell Mol Neurobiol, 33:167-174, 2013

7. Endothelin receptor-mediated responses in trigeminal ganglion neurons., Yamamoto T, Ono K, Hitomi S, Harano N, Sago T, Yoshida M, Nunomaki M, Shiiba S, Watanabe S, Nakanishi O, Inenaga K, J Dent Res. Apr;92(4):335-9, 2013

学会発表

1. 吉田充広・安田聖子・石川浩三・岸下裕輔・掛田崇宏・有吉亨・仲西修・石川敏三: 慢性疼痛における痛覚過敏反応の神経薬理的解析、慢性疼痛学会、東京、2012年2月22日~23日

2. 三浦大輔・石川浩三・吉田充広・海江田令次・石川歳三: 難治性疼痛にの発症機構の解析、慢性疼痛学会、東京、2012年2月22日~23日

3. 吉田充広、安田聖子、蓑田誠治、石川浩三、仲西修、石川敏三: ラット慢性疼痛における痛覚に対する過敏反応の分子機構: pERK, BDNF の変調、日本疼痛学会、熊本、2012年7月20~21日

4. 吉田充広、福原佳代子、安田聖子、松本吉洋、仲西修、石川敏三: 慢性疼痛における

痛覚過敏反応およびうつ症状の発症機構解析、日本歯科麻酔学会、福岡、2012年10月5～6日

5. M. YOSHIDA, S. YASUDA, S. MINODA, K. ISHIKAWA, S. YAMAMOTO, Y. KISHISHITA, S. WATANABE, O. NAKANISHI, T. ISHIKAWA : 4-Methylcatechol, neurotrophic factor inducer, prevents abnormal pain-emotion response including hypersensitization and mood disorder in rats with chronic pain, Society for Neuroscience, New Orleans, USA, 2012年10月13～17日

6. 吉田充広、三浦大輔、石川浩三、渡邊誠之、海江田令次、仲西修、石川敏三：中枢性アロディニアにおける脊髄神経-glia相互作用、日本疼痛学会、大宮、2013年7月12～13日

7. 吉田充広、石川浩三、福原佳代子、安田聖子、仲西修、渡邊誠之、石川敏三：GABA-A受容体阻害(Bicuculline)誘発アロディニアにおける脊髄神経-glia機構、日本歯科麻酔学会、横浜、2013年10月2～4日

8. M. YOSHIDA, O. NAKANISHI, K. ISHIKAWA, D. MIURA, H. SASAKI, S. YASUDA, Y. IDA, Y. IWANAGA, S. WATANABE, T. ISHIKAWA, Spinal microglia mediate the modulation in the GABAA receptor antagonist induced allodynia, Society for Neuroscience, 11/9-13, 2013

〔雑誌論文〕(計7件)

〔学会発表〕(計8件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0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0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

(吉田充広)

研究者番号：40364153

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：