

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659832

研究課題名(和文) 難治性三叉神経障害性疼痛発症に対するグリア - 神経細胞機能連関の関与

研究課題名(英文) Involvement of glia-neuron functional interaction in intractable trigeminal neuropathic pain

研究代表者

岩田 幸一 (IWATA, Koichi)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60160115

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)神経細胞と活性型グリア細胞との機能連関に注目し、異所性痛覚過敏の発症機構を解明した。その結果、三叉神経障害および口腔顔面領域に発症した炎症によってVcに存在するアストログリアおよびミクログリアが免疫系を介して活性化し、さらにMAPキナーゼ系によって細胞活動が亢進して口腔顔面の異所性痛覚過敏および顎運動をはじめとする口腔顔面の運動機能亢進が誘導されることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We focused on neuron-glia cell interaction in the trigeminal spinal subnucleus caudalis (Vc) and tried to clarify the mechanisms underlying orofacial extraterritorial pain associated with trigeminal nerve injury or orofacial inflammation. Astroglial and microglial cell activation occurs in the Vc following trigeminal nerve injury or orofacial inflammation via chemokine-immune-cell system and further enhancement of Vc neuronal activity caused by MAP kinase cascade, resulting in the extraterritorial orofacial pain or enhancement of the orofacial motor function.

研究分野：歯学

キーワード：歯科基礎医学 神経科学 三叉神経 疼痛制御 グリア細胞 三叉神経脊髄路核 神経障害性疼痛 異所性痛覚過敏

1. 研究開始当初の背景

末梢神経損傷あるいは末梢組織に炎症が引き起こされると、損傷神経の支配領域を超えた領域に疼痛異常が発症するが、このメカニズムには中枢神経系における新たな神経回路形成による神経の可塑的变化だけでなく、グリア細胞の活性化が重要な働きを有することが報告された。特に、三叉神経が損傷を受けると Vc の神経細胞に異常興奮が引き起こされ、これによって三叉神経損傷後に口腔顔面領域に疼痛異常が発症することが明らかにされた (Iwata et al. 2001 JNP, Tsuboi et al. 2004 Pain, Saito et al. 2008 JNP)。さらに、我々はこの Vc の神経細胞の異常興奮には神経細胞内において MAP Kinase ファミリーの一つである ERK のリン酸化が重要な働きを成すことを明らかにした (Shimizu et al. 2006 Brain Res., Noma et al. 2008 JCN, Kobayashi 2011 Mo. Pain, Honda et al. 2011 Mol Pain)。また、下歯槽神経損傷後、Vc におけるアストログリアの活性化が誘導され、Vc 内において損傷神経投射領域を超えた広い領域に分布するアストログリアおよびミクログリアの活性化が誘導され、これらの領域に存在する神経細胞活動が増強されることが明らかになった (Okada-Ogawa et al. 2009 J Neuroscience, Tsuboi et al. 2011 EJ Neuroscience)。しかし、アストログリアとミクログリアがいかなるメカニズムで Vc の神経細胞活動の増強に関与するかについてはほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

三叉神経傷害あるいは口腔顔面領域の炎症後、口腔顔面領域に発症する神経障害性疼痛あるいは炎症性疼痛の神経機構を解明する目的で、眼窩下神経損傷モデルラット、筋炎モデルラット、下歯槽神経切断モデルラットおよび臨床に問題となっている口腔乾燥症あるいは口腔癌のモデルとして、舌乾燥モデルおよび舌癌モデルラットを作製し、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄に分布するアストロサイトおよびミクログリアの機能連関、さらにこれら両グリア細胞と Vc 神経細胞活動との関係、またグリア細胞と運動ニューロン活動との関係を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作製

本研究では、眼窩下神経結紮、下歯槽神経切断、下唇あるいは頸筋への complete Freund's adjuvant (CFA) を投与した炎症モデルを作製し、研究を行った。実験にはネンブータルで深く麻酔 Sprague Dawley 系雄性ラットを用いた。ラットの眼窩下神経を口腔内より露出し、Chronic gut にて緩く結紮して、眼窩下神経結紮モデルを作製、同様の麻酔を用いて、下歯槽神経を切断した下歯槽神経切断モデル、頸筋へ CFA を注入した炎症モ

デルを作製した。また、現在は神経損傷や炎症が関与すると考えられる舌乾燥および舌癌播種による舌乾燥モデルおよび舌癌モデルラットを作製し、研究を行っている。

(2) 逃避反射閾値の測定

眼窩下神経損傷、頸筋炎、下歯槽神経切断、舌乾燥および舌癌播種後、1~14 日後まで、浅麻酔下で顔面皮膚に機械刺激を加え逃避行動を起こす刺激閾値、あるいは熱刺激を与え逃避反射が起こるまでの潜時を計測した。さらに、アストログリア活性阻害剤 (fluoroacetate) およびミクログリア活性阻害剤 (minocycline) を別々におよび同時に延髄髄腔内に投与した後、機械閾値および熱逃避潜時の変化を計測した。顎顔面領域の機械刺激の対する逃避閾値の計測に関して、頭板状筋の EMG の変化を指標とした計測法を確立している (Honda et al., Mol Pain, 2008)。この計測法によって、より正確で客観的な逃避閾値の計測が可能となる。

(3) 免疫染色方法

浅麻酔下にてモデルラットの顔面皮膚に機械刺激あるいは熱刺激を加え、5 分後に灌流固定を行い三叉神経脊髄路核を摘出した。三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄に発現する pERK 陽性細胞、GFAP (アストログリア) 陽性細胞および Iba1 (ミクログリア) 陽性細胞およびリン酸化 p38 を免疫組織学的に検出した。さらに fluoroacetate、minocycline および p38、フラクタルカインあるいは IL1 の阻害薬を別々におよび同時に延髄髄腔内あるいは全身投与後、顔面皮膚に機械刺激を加え 5 分後に灌流固定し、三叉神経脊髄路核尾側亜核の pERK 陽性細胞、GFAP 陽性細胞および Iba1 陽性細胞発現を解析した。

(4) IL1 およびフラクタルカインのタンパク定量

IL1 およびフラクタルカインのタンパク定量については Western blotting 法を用いて、解析を行った。モデル動物を作製後、深麻酔下において延髄を摘出し、通法に従ってタンパクの定量解析を行った。

(5) 各種拮抗薬および阻害薬投与方法

本研究プロジェクトでは各種阻害薬や拮抗薬を三叉神経節内、あるいは末梢組織に注入した。三叉神経節に注入する場合には神経節内にあらかじめガイドカニューレを設置し、このカニューレを介して神経節内に薬物を投与した。末梢組織への投与は、起炎物質である CFA の投与と同時に投与する方法を用いた。

4. 研究成果

(1) 眼窩下神経結紮モデルの延髄におけるリン酸化 ERK 発現解析

このプロジェクトは本研究費が給付される前から継続して行っていたもので、この研究結果に基づいて活性型グリア細胞の解析領域を決定した。眼窩下神経結紮モデルラットの口ひげ部を機械刺激して発現するリン酸化 ERK 陽性細胞は主に obex 付近で Vc 領域に限局していた。この発現は Vc の表層部に集中しており、深層には少数認められるだけであった。また、陽性細胞数は刺激強度を増すにしたがって増加しており、刺激強度と発現細胞数が正の相関を示す可能性が示された（発表論文）。

(2) 筋炎モデルラットの延髄におけるグリア細胞活性解析

本研究は、頸筋に CFA を投与し、これによって引き起こされる顔面領域の痛覚過敏の神経機構の解明を目指したプロジェクトである。頸筋に CFA を投与すると、投与後 1 日目から口腔顔面領域に機械アロディニアが発症した。このラットの延髄には多くのミクログリアの活性化がみられた。ミクログリアの活性化はケモカインの一つであるフラクタルカインの受容体をブロックすることによって阻害された。さらに、活性型ミクログリアにはリン酸化 p38 が共発現していた。また、活性型ミクログリアからは IL1 が放出され、2 次ニューロンの活性化が高まることも示された。一方で、リン酸化 p38 を抑えることによってミクログリアの活性化は阻害され、同時に IL1 の放出も減少しニューロン活動が低下することによって痛覚過敏が抑制された。（発表論文 および）

(3) 眼窩下神経結紮モデルラットのグリア細胞活性と運動出力との関係

本研究ではさらに、眼窩下神経結紮モデルラットを用いて、神経損傷後に発症する運動機能亢進に関しても研究を行った。本研究では、眼窩下神経結紮によって Vc に発現するアストログリアの関与に注目し、解析を行った。眼窩下神経結紮によって、Vc には多くの活性型アストログリアの発現が認められた。アストログリア活性は Vc だけでなく腹側部の運動核周辺部においても求められ、活性型アストログリアが運動ニューロンの活動性制御に関与する可能性が示された。さらに、アストログリアの活性化阻害薬の髄腔内投与によって、顎運動および開口反射閾値の増加が認められた。この結果は三叉神経損傷によってアストログリアが活性化され、運動出力細胞である咬筋運動ニューロン活動を増強した可能性を示している。（発表論文）

(4) 舌乾燥誘導性舌の痛覚異常に対する延髄ニューロンの役割

これはこれまでの研究結果をもとに昨年からはスタートさせたプロジェクトで、現在進行中の研究である。これまでの研究結果では、舌を乾燥させることによって、熱痛覚過敏は

発症しないにもかかわらず、機械痛覚過敏が発症することが明らかになった。また、このような機械痛覚過敏には Vc の存在するニューロンにおけるリン酸化 ERK が関与することが明らかになった。この結果とこれまでの研究結果とを合わせて考察すると、舌の乾燥によってアストログリアの活性化が亢進する可能性がある。

(5) 舌癌モデルのゼツツ発症に対する延髄ミクログリアの関与

本研究はこれまでの神経障害あるいは炎症モデルを用いた研究結果をもとに、新たに計画したテーマである。これまでの研究結果で、申請者は舌に扁平上皮癌細胞を播種し、3 日経過すると、舌癌が発症する。舌癌発症後 1 週間目までは舌の機械刺激に対する痛覚過敏は発症しなかった。このメカニズムとして、癌舌癌の発症当初は癌細胞からオピオイドが放出され、癌細胞週に分布する自由神経終末の活動性を低下させる可能性があるという結果を得ている。

<引用文献>

Iwata, K., Imai, T., Tsuboi, Y., Tashiro, A., Ogawa, A., Morimoto, T., Masuda, Y., Tachibana, Y. and Hu, J.W.: Alteration of Medullary Dorsal Horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol.*, 2001, 86, 2868-2877.

Tsuboi, Y., Takeda, M., Tanimoto, T., Ikeda, M., Matsumoto, S., Kitagawa, J., Teramoto, K., Simizu, K., Yamazaki, Y., Shima, A., Ren, K., Iwata, K.: Alteration of the second branch of the trigeminal nerve activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *Pain*, 2004 111(3), 323-334.

Kimiko Saito, Suzuro Hitomi, Ikuko Suzuki, Junichi Kitagawa, Yoshiyuki Tsuboi, Masahiro Kondo, Barry J Sessle, Koichiro Ueda and Koichi Iwata. Modulation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neuronal activity following regeneration of transected inferior alveolar nerve in rats. *J Neurophysiol.*, 2008, 99: 2251-2263.

Kohei Shimizu, Masatake Asano, Junichi Kitagawa, Bunnai Ogiso, Ke Ren, Hiroshi Kamo and Koichi Iwata. Phosphorylation of Extracellular Signal-Regulated Kinase in the medullary and upper cervical cord neurons following noxious tooth pulp stimulation. *Brain Res.*, 2006 1072, 99-109.

Noboru Noma, Yoshiyuki Tsuboi, Masahiro Kondo, Hidero Oki, Mitsuhiko Matsumoto, Barry J Sessle, Junichi Kitagawa and Koichi Iwata. Organization of pERK-immunoreactive cells in trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following capsaicin injection into oral and craniofacial regions in rats. *J Comp Neurol.*, 2008, 20: 1428-1440.

Azusa Kobayashi, Masamichi Shinoda, Barry J Sessle, Kuniya Honda, Yoshiki Imamura, Suzuro Hitomi, Yoshiyuki Tsuboi, Akiko Okada-Ogawa, Koichi Iwata. Mechanisms underlying alteration of medullary and upper cervical spinal cord neurons following cervical nerve transection in rats. *Mol Pain*, 2011, Feb 10;7:12.

Kuniya Honda, Noboru Noma, Masamichi Shinoda, Makiko Miyamoto, Ayano Katagiri, Daiju Kita, Ming-Gang Liu, Barry J Sessle, Masafumi Yasuda and Koichi Iwata. Involvement of primary afferent ionotropic glutamate receptors in tongue thermal hyperalgesia in rats. *Mol Pain*, 2011, Sep 28;7(1):75.

Akiko Okada-Ogawa, Ikuko Suzuki, Barry J Sessle, Chen Yu Chiang, Michael W Salter, Jonathan O Dostrovsky, Yoshiyuki Tsuboi, Masahiro Kondo, Junichi Kitagawa, Azusa Kobayashi, Noboru Noma, Yoshiki Imamura and Koichi Iwata. Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms, *J Neurosci.*, 2009, 29, 11161-11171.

Y. Tsuboi, K. Iwata, J.O. Dostrovsky, C-Yu Chiang, B.J. Sessle and J. W. Hu. Modulation of glutamine synthetase activity in astroglia affects nociceptive behavior and central sensitization of medullary dorsal horn nociceptive neurons in a rat model of chronic pulpitis. *E J Neurosci.*, 2011, 34, 292-302.

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 5件)

Masaaki Kiyomoto, Masamichi Shinoda, Kuniya Honda, Ayano Katagiri, Satoshi Kamakura, Tomio Inoue, Koichi Iwata, p38 phosphorylation in medullary microglia mediates ectopic orofacial inflammatory pain. *Mol Pain*, 査読有、

2015 (submitted). doi: 10.1186/1744-8069-8-23

Akiko Okada-Ogawa, Yuka Nakaya, Yoshiki Imamura, Masayuki Kobayashi, Masamichi Shinoda, Kozue Kita, Barry J Sessle and Koichi Iwata. Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. *Exp Neurol*, 査読有、 267, 42-52, 2015 doi: 10.1016/j.expneurol.

Rahman Md. Mostafezur, Hossain Md. Zakir, Masamichi Shinoda, Hanako Takatsuji, Kojiro Takahashi, Yoshiaki Yamada, Kensuke Yamamura, Koichi Iwata, Junichi Kitagawa, Involvement of astroglial glutamate-glutamine shuttle in modulation of the jaw-opening reflex following infraorbital nerve injury, *Eur J Neurosci*, 査読有、 2014、 39(12):2050-2059. doi: 10.1111/ejn.12562

Masaaki Kiyomoto, Masamichi Shinoda, Yoshiyuki Tsuboi, Barry J Sessle, Yoshiki Imamura, Koichi Iwata, Fractalkine signaling in microglia contributes to ectopic orofacial pain following trapezius muscle inflammation, *J Neurosci*, 査読有、 33(18), 2014, 7667-7680. doi: 10.1523/JNEUROSCI

Ikuko Suzuki, Yoshiyuki Tsuboi, Masamichi Shinoda, Kazuo Shibuta, Katagiri A, Masaaki Kiyomoto, BJ Sessle, Kinuyo Ohara, Kentaro Urata, Koichi Iwata, ERK phosphorylation of trigeminal spinal subnucleus neurons is involved in facial hyperalgesia and cold allodynia in the rats with infraorbital nerve injury, *PLoS One*, 査読有、 2013、 8(2):e57278. doi: 10.1371/journal.pone.0057278

〔学会発表〕(計 12件)

Nakaya Y, Okada A, Tsuboi Y, Shinoda M, Imamura Y, Iwata K (2014.11/16) The role of trigeminal spinal subnucleus caudalis in dry-tongue pain. *Neuroscience* 2014, Washington DC (USA.)

中谷有香、岡田明子、坪井美行、篠田雅路、岩田幸一、今村 佳樹 (2014.11/2) 口腔乾燥により発生する舌痛に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核の役割 第19回口腔顔面痛学会 東京医科歯科大学(東京都文京区)

中谷有香、坪井美行、篠田雅路、岩田幸一 (2014.9/26) 三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるリン酸化ERKの口腔乾燥による舌痛への関与 第56回歯科基礎医学学会学術大会 福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

中谷有香、岡田明子、坪井美行、篠田雅路、岩田幸一、今村佳樹 (2014.6/21) 口腔乾燥による舌痛に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核のリン酸化ERK 第36回日本疼痛学会 KKRホテル大阪 (大阪府大阪市)

澁田一夫、長谷川桃子、近藤真啓、篠田雅路、清水典佳、岩田幸一 (2013.3/28) 実験的歯牙移動による三叉神経脊髄路核における細胞外シグナル調節キナーゼ(ERK)のリン酸化 第90回日本生理学会大会タワーホール船堀 (東京都江戸川区)

清本聖文、今村佳樹、岩田幸一、篠田雅路 (2013.2/24) Fractalkine signaling in microglia contributes to ectopic orofacial pain following trapezius muscle inflammation. 第42回日本慢性疼痛学会 京王プラザホテル (東京都新宿区)

岩田幸一、鈴木郁子、坪井美行、篠田雅路 (2012.9/19) 眼窩下神経結紮ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核細胞におけるERKのリン酸化は温度痛覚過敏に関与する 第35回日本神経科学大会 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

Kiyomoto M, Shinoda M, Imamura Y, Iwata K. (2012.8/29) Fractalkine signaling in microglia contributes orofacial pain induced by trapezius muscle inflammation. The 14th world congress on pain, Milan(Italy).

Noma N, Imamura Y, Shinoda M, Tsuboi Y, Iwata K. (2012.8/28) Involvement of ATP, IL-6 and IL-1 in rat model of masseter muscle pathological pain. The 14th world congress on pain, Milan(Italy).

Iwata K, Suzuki I, Tsuboi Y, Shinoda M. (2012.8/28) Involvement of ERK phosphorylation of the trigeminal spinal subnucleus neurons in facial hyperalgesia in the rats with experimental trigeminal mononeuropathy. The 14th world congress on pain, Milan (Italy).

澁田一夫、鈴木郁子、坪井美行、篠田雅路、清水典佳、岩田幸一 (2012.7/20) ラット眼窩下神経損傷後に発症する二次性痛覚

過敏に対するミクログリアの関与 第34回日本疼痛学会 熊本市国際交流会館 (熊本県熊本市)

Iwata K, Suzuki I, Shinoda M. (2012.7/16) ERK phosphorylation of the trigeminal spinal subnucleus neurons contributes facial hyperalgesia with experimental trigeminal mononeuropathy. 8th FENS Forum of neuroscience, Barcelona (Spain).

〔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：
出願年月日：
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

岩田 幸一 (IWATA, Koichi)
日本大学・歯学部・教授
研究者番号：60160115

(2) 研究分担者

小林 真之 (KOBAYASHI, Masayuki)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：00300830

中西 博 (NAKANISHI, Hiroshi)
九州大学・歯学研究科 (研究院)・教授
研究者番号：20155774

篠田 雅路 (SHINODA, Masamichi)
日本大学・歯学部・准教授
研究者番号：20362238