

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860425

研究課題名(和文)ペリニューロナルネットが関与する顎顔面領域の神経障害性疼痛病態機構の解明

研究課題名(英文)Temporal changes of the perineuronal nets of the rodent trigeminal system after removal of the masseter and temporal muscles.

研究代表者

関 善弘 (Seki, Yoshihiro)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：30597274

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、顎顔面領域神経障害性モデル動物を用いて、ペリニューロナルネット(PNNs)との関連を検討するため、三叉神経核群における、レクチンとアグリカンの蛍光強度について、経時的に検討した。三叉神経主知覚核において、手術後28日で、WFAの発現強度は反対側より手術側で有意に低下していた。また、アグリカンの発現強度は変化がなかった。三叉神経脊髄路核において、手術後3日目と28日目でWFAの発現強度は反対側より手術側で有意に上昇していた。また、手術後3日でアグリカンの発現強度は反対側より手術側で有意に上昇していた。これらの変化は顎顔面領域の疼痛過敏が持続するメカニズムに関与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Peripheral nerve injury following oral surgery results in various sequelae. It has been reported that such impairments might be related to the failure of neuronal circuits. Recent studies have indicated that perineuronal nets (PNNs) may play a role in the regulation of neuronal plasticity. However, it remains unclear how PNNs regulate plasticity after nerve injury. Here we used the trigeminal denervation model, and changes of PNNs were investigated with focus in trigeminal system (principal sensory nucleus:PrV; caudal part of spinal nucleus:SpVC; motor nucleus:5N) and facial nucleus (7N). In PrV, intensity of WFA is significantly reduced at 28 days after operation, but aggrecan is not change. In the SpVC, intensity of WFA is higher than contralateral side at 3 and 28 days after operation. Intensity of aggrecan is higher than contralateral side at 3 days after operation. In the both of 5N and 7N, the intensity is higher than contralateral side at 3, 7 and 28 days after operation.

研究分野：神経解剖

キーワード：神経障害性疼痛 三叉神経 口腔外科 ペリニューロナルネット

1. 研究開始当初の背景

近年、歯科医療の発達により歯科インプラント治療、および外科的矯正歯科治療などの適応が拡大し、咬合機能あるいは審美性が飛躍的に改善するようになった。その一方で、手術後、感覚過敏や、痛覚過敏を訴える歯科患者が増加している。通法どおり行われた処置後にこのような症状が起こると、患者への説明を含めしばしば混乱した状況を招くだけでなく、既存の鎮痛薬が奏功しないため患者のQOLを著しく低下させてしまう。これらの疼痛感覚異常は、手術操作による神経や血管の機械的切断が原因とされているが、未だ根本的な治療法は解明されておらず、歯科医学の進展が切望される分野である。顎顔面領域の神経障害性疼痛は、三叉神経損傷後の三叉神経節における侵害受容一次ニューロンの異常な興奮が治癒後も抑制されず、それによって上位中枢においてもニューロンの可塑的变化を引き起こすことが原因とされる説 (Sessle BJ. et al., Can J Neurol Sci., 1999) や、グリア細胞などを含む二次ニューロン周囲の組織環境の変化が誘発され、これらの変化が神経損傷後の痛覚異常に関与しているとされる説 (Kobayashi A. et al., Mol Pain., 2011) も提唱されているが、依然として決定的な病態機序の解明には至っていない。

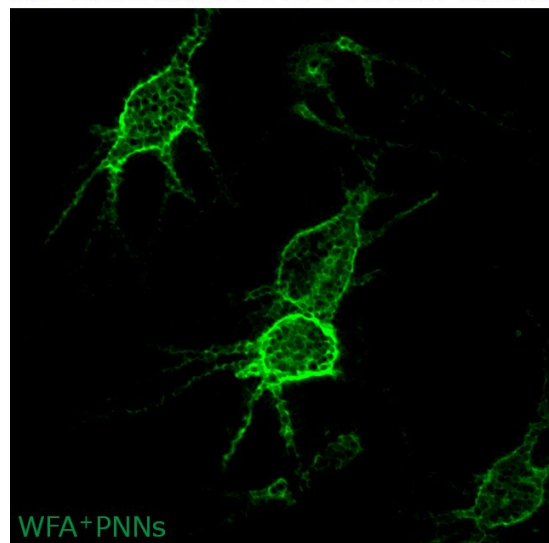
2. 研究の目的

1970年代に Van der Loos らによって、末梢からの感覚入力を遮断すると上位中枢の神経回路が再編されることが報告された (Van der Loos H. et al., Science, 1973)。この現象は臨界期以前の現象と考えられてきたが、成体でも末梢神経が損傷を受けると、大脳皮質体性感覚野の損傷神経に対応する受容野に機能的変化が起こることや (Kaas JH. et al., Neuron, 1999)、末梢神経損傷後の可塑的变化は、大脳皮質のみならず、視床や脳幹などの各中継地点で可塑的变化を起こすことも報告されている (Kaas JH. et al.,

Neuron, 1999; Krupa DJ. et al., Proc Natl Acad Sci USA, 1999)。また、末梢からの感覚遮断が短期の場合は、神経回路の再編は可逆的であるが、長時間感覚を遮断すると、不可逆的に神経回路が再編されることも知られている (Merzenich MM. et al., J Comp Neurol., 1984)。2光子顕微鏡を用いた最近の研究では、神経損傷後数日以内に、大脳皮質において、シナプスの大きさに依存した神経回路のリモデリングが起こり、神経障害性疼痛の病態に關与する可能性が示されている (Kim SK. and Nabekura J., J Neurosci., 2011)。これらの知見より、末梢神経損傷後の神経障害性疼痛は、神経可塑性の再活性化・不可逆的神経回路の再編を経て、多段階的に進行すると考えられるが、どのようにして可塑性が再活性化し、再編後の神経回路が不可逆化するのかわかっておらず、神経障害性疼痛の発症、および難治化する病態メカニズムを理解する上で重要なキーワードになっていると考えられる。

大脳皮質においてペリニューロナルネット (PNNs) と呼ばれるニューロン周囲に形成される網目状の構造物が神経可塑性に關与すると報告され、注目を集めている。PNNs は、ヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (CSPG)、および結合タンパク質が凝集した分子群の複合体で、Wisteria floribunda agglutinin (WFA) レクチンによって染色できる (図1)。PNNs は、それ自身がシナプス形成の物理的障壁となり、神経可

図1 ビオチン標識WFAレクチンによって染色されたPNNs



塑性を制限することが知られている (Wang D. and Fawcett J., Cell Tissue Res., 2012)。また、臨界期終了に伴い、パルプアルブミンを発現するニューロン (PV ニューロン) の周囲に PNNs が形成されることから、PV ニューロンが神経可塑性に大きく貢献すると考えられている (Kosaka T. et al., Brain Res., 1989)。*in vitro* において、電流により機械的侵害刺激を与えた培養ニューロンにコンドロイチナーゼ ABC (ChaseABC) を投与し、ニューロン周囲のパーシカンや、他の CSPG を改変することで、中枢性感作を減弱させること (Kubo A. et al., J Physiol., 2012) や、ニューロン活動依存的に A disintegrin-like and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs (ADAMTS) および Matrix metalloproteinase (MMP) などのプロテオグリカン分解酵素の細胞外濃度が上昇し、PNNs を改変させることで、可塑性が再活性化すること (Yuan W. et al., Neuroscience., 2002) が報告されている。さらに、*in vivo* においては疼痛過敏モデル動物が痛覚過敏状態になった後に、ADAMTS、または糖鎖分解酵素である ChaseABC を髄腔内に注入することで、侵害受容閾値がコントロール群とほぼ同程度になることが報告されており、糖タンパクが神経障害性疼痛の病態に關与すると示唆されている (Bogen O. et al., Neuroscience., 2009)。以上より、PNNs は末梢神経損傷後の中枢性感作、神経回路再編のトリガー、および神経障害性疼痛が難治化する構造的な基盤となっている可能性が考えられる。しかしながら、末梢神経損傷後に PNNs がどのような経時的变化をきたし、神経障害性疼痛の病態に關与するのかが解明されておらず、将来の治療法確立に向けた研究上、重要な課題である。そこで本研究では、顎顔面領域神経障害性モデル動物を用いて、糖鎖が關与する疼痛感覚異常の病態機序を検討し、治療戦略の一助とする事を目的とする。

3. 研究の方法

顎顔面領域における疼痛感覚異常の研究は、三叉神経第 II 枝あるいは、III 枝の障害モデルを用いて検討されている。しかしながら、実際の歯科臨床では神経線維のみを傷害する術式はなく、臨床に即した動物モデルでは検討されていない。そこで、申請者が作出した齧歯類の咬筋、および側頭筋切除神経傷害モデルを使用して、三叉神経核群 (三叉神経主知覚核、三叉神経脊髄路核、および三叉神経運動核) と顔面神経核における組織染色を経時的に検討する。

- (1) 生後 2 か月の C57BL6/J mouse (male) を用いて、支配筋切除による除神経モデルを作出し、3 日、7 日、および 28 日後に 4% Paraformaldehyd/PBS (PFA) と 0.05% Glutar aldehyde (GA) の混合液を用いて灌流固定を行った。
- (2) 4%PFA による浸漬固定を 24 時間おこ

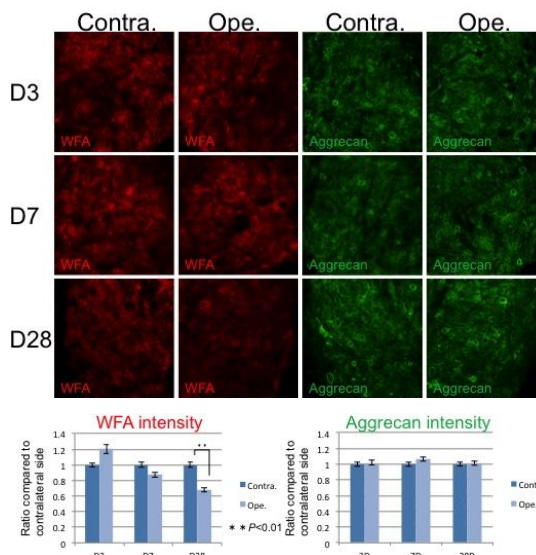
なった後に、30%スクロースによる前処理を行い、凍結切片を作製した。切片の厚みは 40 μm とした。

- (3) レクチン (Wisteria floribunda agglutinin: WFA) による組織染色と、アグリカンによる免疫組織染色を行った。希釈倍率は、WFA は 1:5000、アグリカンは 1:20000 とした。対比染色は YOYO-1 を用いた (1:10000)。
- (4) ImageJ を用いて、WFA とアグリカンの蛍光強度を測定し、それぞれの時期、および手術側神経核と、反対側神経核において比較検討を行った。

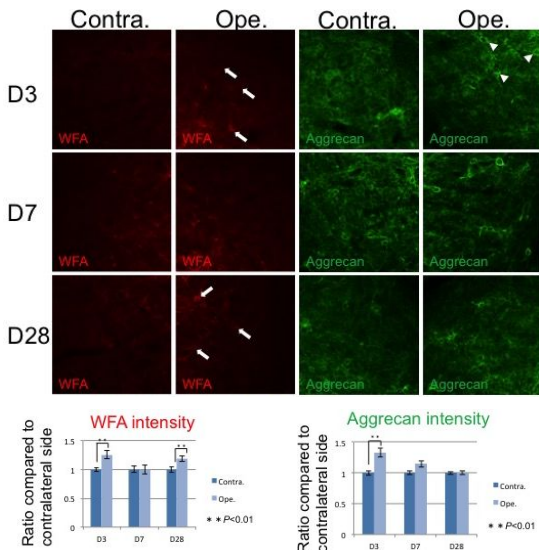
4. 研究成果

支配筋切除による三叉神経除神経モデルを用いて、三叉神経核群、および顔面神経における、WFA とアグリカンの経時的变化を検討した。結果を以下に示す。

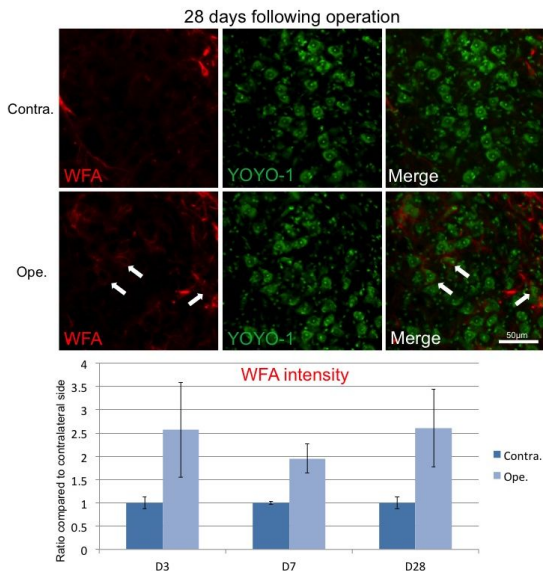
- (1) 三叉神経主知覚核において、手術後 28 日で WFA の蛍光強度は手術側が反対側の 0.68 倍で、有意に低値であった。また、ペリニューロナルネットを構成する主なプロテオグリカンであるアグリカンの蛍光強度は、術後 3、7、28 日を通して、手術側と反対側で、有意差を認めなかった。



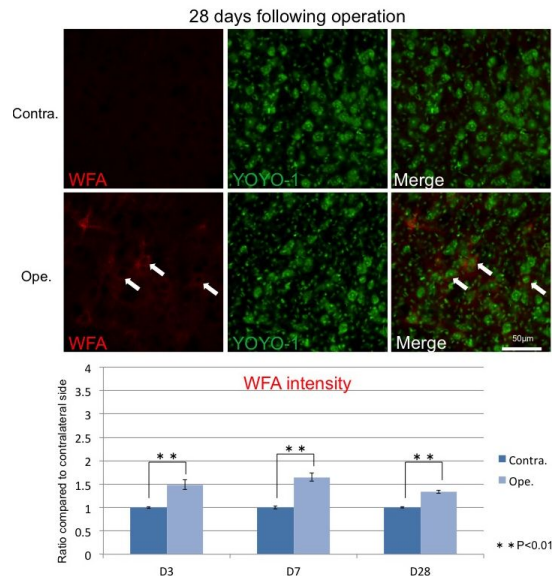
- (2) 三叉神経脊髄路核において、手術後 28 日で WFA の蛍光強度は手術側が反対側の 1.19 倍高く、有意に高値であった。また、アグリカンの蛍光強度は術後 3 日で手術側が反対側の 1.33 倍高く、有意差があることを示したが、手術後 7 日と 28 日では、手術側と反対側において有意に差は認めなかった。写真は術後の経時的变化を示す。手術側で強く発現している WFA 組織染色を矢印で示し、アグリカン組織染色や矢頭で示す。



(3) 三叉神経運動核において、WFA の蛍光強度は、術後 3、7、28 日を通して手術側と反対側で有意差を認めなかったが、いずれの時系列においても、手術側の蛍光強度が高い蛍光であった。写真は術後 28 日の三叉神経運動核を示す。手術側で強く発現している WFA 組織染色を矢印で示す。



(4) 顔面神経核において、WFA の蛍光強度は術後 3、7、28 日を通して、反対側より手術側の方の蛍光強度が有意に高かった (術後 3 日: 1.49 倍、術後 7 日: 1.65 倍、術後 28 日: 1.34 倍)。写真は、術後 28 日目の顔面神経核を示す。手術側で強く発現している WFA 組織染色を矢印で示す。



これらの変化は顎顔面部領域の痛覚過敏や、疼痛過敏が持続するメカニズムに関与している可能性がある。今後は、分子生物学的検索を推進していく予定である。

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)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

なし

〔学会発表〕(計 0 件)

なし

〔図書〕(計 0 件)

なし

〔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 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

関 善弘 (SEKI, Yoshihiro)

九州大学大学院医学研究院精神病態医学分
野・共同研究員

研究者番号：30597274