

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：32667

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861561

研究課題名(和文)炎症性疼痛に対する三叉神経節内GABA/GABA B 受容体シグナル伝達系の役割

研究課題名(英文)The role of GABA-ergic neurons in the trigeminal root ganglion with peripheral area inflammation.

研究代表者

高橋 誠之(Takahashi, Masayuki)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：00508484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：この研究の目的は顎関節周辺部末梢受容野の慢性炎症による痛覚過敏や異痛症発生時の三叉神経節ニューロンでの変化をGABAに着目し解明する事である。中枢神経系での抑制性伝達物質として知られるGABAであるが、末梢領域での存在や役割についてはほとんど知られていない。我々は正常群と比較してモデル動物の三叉神経節においてGABA合成酵素のGADの発現が有意に増加していることを免疫組織化学的手法で確認し、加えてイオントフォレシス細胞外記録法によりバクロフェンが三叉神経節ニューロンの活動性に変調をもたらす事をつきとめた。これらが慢性炎症に起因する顎口腔顔面領域の痛覚過敏や異痛症の一因となっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was aimed at elucidating changes in the expression of GABA-ergic neurons of TRG in rats which showed hyperalgesia and/or allodynia by artificially-induced chronic inflammation in their TMJ and facial skin. Although GABA is a main inhibitory neurotransmitter in the CNS, little is known about the role in the PNS, including TRG. We compared GAD67 expression of TRG neurons in rats with and without TMJ and facial skin inflammations. In the FG labeled TRG neurons, the proportion of GAD67 immunoreactive cells of EXP group was 16.0%, which was about twice as much as that seen in CONT group. In addition, by using extracellular recording, it was found that microiontophoretically applied baclofen inhibited TRG neurons excitation in pentobarbital-anesthetized rat. Taken together, our results suggest that hyperalgesia and/or allodynia due to orofacial chronic inflammation may be related at least in part to the up-regulation of GAD67-positive GABA-ergic neurons in the TRG.

研究分野：生理学・口腔生理学

キーワード：三叉神経節 炎症性疼痛 GABA GAD 痛覚過敏 関連痛 非歯原性歯痛

## 1. 研究開始当初の背景

一般に歯科臨床における歯髄、顎関節、咀嚼筋などの炎症時に生じる関連痛、異常疼痛(痛覚過敏、アロディニア)発現には、三叉神経系の侵害情報伝達経路において生じる可塑的变化が重要であり、これには一次求心路の変化(末梢性感作)とこれに起因して生じる二次ニューロンレベルの変化(中枢性感作)の二つが考えられる。

三叉神経支配領域の深部組織で生じた炎症/組織損傷による侵害情報は三叉神経脊髄路尾側亜核(Trigeminal spinal nucleus caudalis:Vc)と上部頸髄後角領域(Upper cervical spinal cord:C1/C2)に投射し上位中枢に伝達されることが知られている。

この部位には顎関節、咬筋などの深部組織からの侵害受容性の感覚神経が投射する部位であり、最近、顎関節、咀嚼筋などの深部組織からの感覚入力投射するVc/C1境界領域は炎症、組織損傷などにより活性化され三叉神経系の慢性疼痛の発現とその持続に重要な役割を演ずることが指摘されている。

近年、感覚神経節内において細胞体及びグリア細胞から傍分泌(パラクリン・オートクリン)された様々な生理活性物質が近傍ニューロンに作用してその機能を修飾することが判明してきた。感覚神経節内において、ニューロンからパラクリン機構により分泌され興奮性に作用する修飾物質にはATP, Substance P, サイトカインなど多数知られているが、 $\gamma$ -アミノ酪酸( $\gamma$ -aminobutylic acid:GABA)などの抑制性の修飾物質の機能的役割は不明である。

一般に分泌されたGABAはイオンチャンネル型受容体であるGABAA受容体とGタンパク結合型のGABAB受容体の活性化により、その生理作用を発現する。最近になり、中枢神経系のニューロンにおいて、Gタンパク結合型GABAB受容体の活性化はGABAA受容体による持続的なGABA電流の促進に関連することが指摘され、侵害受容伝達機構の中で、GABAの生理的作用発現においてGABAB受容体が中心的役割を果たすことが注目されている。

三叉神経節(Trigeminal ganglion: TG)ニューロンには両者の受容体のmRNAとタンパクの発現が確認されているが、三叉神経系の侵害受容ニューロンに対する生理的役割は不明である。

## 2. 研究の目的

顎関節、咀嚼筋等の炎症性疼痛により生じる異常疼痛発現は三叉神経系の情報伝達経路における可塑的变化が重要な役割を担う。

近年、三叉神経脊髄路尾側核/上部頸髄後角(Vc/C1)境界領域が口腔顔面領域の深部組織から侵害情報の中継核として注目され

ている。

一方、抑制性伝達物質として知られるGABAが三叉神経節内で傍分泌されGABA受容体を介して、侵害受容ニューロンの興奮性を修飾し、痛覚過敏などに関わることが指摘されている。

本研究では、Vc/C1境界領域に投射し炎症性痛覚過敏に関わる三叉神経節ニューロンの興奮性に対するGABA/GABAB受容体シグナル伝達系の病態生理的役割をin vitroとin vivoの両面より系統的に解析することを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) 顎関節または咬筋炎動物の作成と痛覚過敏の確認

Wistarラットを吸入麻酔器を用いてイソフルランによる麻酔後、咬筋または顎関節腔に刺入したマイクロシリンジにて起炎物質を投与し、これを“炎症群”とする。一方、溶媒(0.9%NaCl, pH, 7.2)投与群を“対照群”とする。起炎物質投与2-5日後、咬筋・顎関節を覆う顔面皮膚に加えたvon Frey filamentsによる機械刺激による逃避反射閾値測定(低下)により痛覚過敏の有無を判定する。

(2) 顎関節または咬筋支配及びVc/C1に投射するTGニューロンの二重蛍光標識

上記の処置を施したラットをイソフルランによる吸入麻酔後、頸部皮膚を切開し延髄から頸髄後角背側面を露出する。蛍光色素をマイクロシリンジに充填する。これを電動マイクロインジェクターに固定しVc/C1境界領域に注入し、この部位に投射するTGニューロンをMBにより蛍光標識する。一方、同側の咬筋または顎関節にマイクロシリンジを用いて(0.2%Fluorogold: FG,  $10 \times 10^{-1}$ )注入し、この部位を支配するTGニューロンをFGにより蛍光標識する。

(3) GABAとGABAB受容体の免疫組織化学凍結切片作成と免疫染色

蛍光標識1-5日後のラットをイソフルランによる吸入麻酔、ホルマリン灌流固定後、片側三叉神経節を取り出し、固定後、スライディングマイクロトームを用いて厚さ $10 \mu\text{m}$ の凍結切片を作成する。三叉神経節切片をスライドガラス上に付着させ、GABA抗体(希釈倍率1:100)とGABAB受容体抗体(1:500)に24時間インキュベーション後、二次抗体として励起波長の異なる2種の蛍光抗体(Alexa488/568/1:1000)を反応させる。

GABAとGABAB受容体免疫陽性細胞の解析共焦点レーザー顕微鏡(現有設備)を用いてFG/MBで標識された三叉神経節TGニューロンの細胞体の大きさ(小型、 $<30 \mu\text{m}$ : A<sub>-</sub>、C-ニューロンに相当; 中型、 $31-40 \mu\text{m}$ : A<sub>-</sub>、A<sub>-</sub>ニューロンに相当; 大型、 $>41 \mu\text{m}$ : A<sub>-</sub>ニューロンに相当)とGABAとGABAB受

容体の発現関係を画像解析ソフトを用いて解析する。また小型ニューロンにおける A<sup>-</sup> と C<sup>-</sup> ニューロンを弁別するため、Neurofilament protein 200 (NF-200) 抗体 (有髄線維のマーカー) と GABAB 受容体抗体を用いて反応させ細胞体径との関連を検討する。

(4) 顎関節または咬筋支配 及び Vc/C1 に投射する TG 単一ニューロン活動の記録  
ネンブータル麻酔後、ラット三叉神経節を被う脳組織をアスピレーターにより吸引後、三叉神経節にマルチバレルガラス微小電極を刺入し、ユニット放電を交流アンプ (DAM80) を用いて記録する。

神経伝導速度の算定によるニューロンの分類

顎関節および Vc/C1 に刺入したステンレススチールの双極刺激電極を用いた電気刺激による順向性および逆行性スパイクの衝突よりニューロンを同定する。

伝導速度は、反応潜時と刺激 記録部位の距離より算定し、ニューロンタイプ (A<sup>-</sup>, C<sup>-</sup>) を同定する。

三叉神経節内の GABAB 受容体作動薬電気泳動的微小投与の効果

1) TG ニューロンの自発放電の変化

自発放電の有無を確かめた後、マルチバレルの他の電極より “デュアルマイクロイオントフォレーシス” を用いて電気泳動的に GABA B 受容体作動薬 (Baclofen, 10mM, pH, 3.5) を記録電極近傍に投与し、自発放電が抑制されるか否かを正常動物と炎症動物で比較解析する。もし、投与電流依存性に放電頻度の変化が誘発されたら、この反応が受容体特異的か否かを判定するため、その拮抗薬 (Saclofen, 10mM, pH, 3.5) の同時投与において効果の消失を確かめる。

侵害刺激に対する TG ニューロンのユニット放電の変化

上記のユニットに対して電気泳動的 GABA B 受容体作動薬投与により、顎関節に電動マイクロインジェクターを用いて注入した ATP (0.1-1mM) または Bradykinin (0.1-1mM) (侵害化学刺激) に対する応答を解析する。もし GABA 受容体作動薬により変化が得られたなら拮抗薬 (Saclofen) の同時投与において効果の消失を確かめる。

#### 4. 研究成果

本研究は、顎関節周辺部末梢受容野の慢性炎症による痛覚過敏や異痛症発生時の三叉神経節ニューロンでの変化を GABA に着目し解明する事である。

中枢神経系での抑制性伝達物質として知られる GABA であるが、末梢領域での存在意義や役割についてはほとんど知られていない。

我々は正常群と比較して炎症モデル動物

の三叉神経節において GABA 合成酵素の GAD の発現が有意に増加していることを免疫組織化学的手法で確認し、加えてイオントフォレーシス細胞外記録法によりバクロフェンが三叉神経節ニューロンの活動性に変調をもたらす事をつきとめた。これらが慢性炎症に起因する顎口腔顔面領域の痛覚過敏や異痛症の一因となっている可能性がある。

GABA 受容体作動薬は従来より、疼痛の治療薬として知られており、これらの知見は歯科臨床領域における異常疼痛発現機構の病態解明に基礎を与え、GABA B 受容体関連物質、K チャネル開口薬が三叉神経系の疼痛緩和に貢献する可能性を明らかとした。

#### 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 2 件)

Takahashi M, Takeda M, Matsumoto S, Somatostatin enhance tooth-pulp evoked cervicodorsal horn neuronal activity via disinhibition of GABAergic interneurons, Brain Res Bull, 査読有、100、2014、p76-83 DOI:10.1016/j.brain res bull.11.008

Tamiya J, Ide R, Takahashi M, Saiki C, Effects of dexmedetomidine on cardiorespiratory regulation in spontaneously breathing newborn rats, Paediatric Anaesthesia, 査読有、24(12)、2014、p1245-1251 DOI:10.1111/pan.12530

[学会発表](計 2 件)

Takahashi M, Sato N, Gokita J, Ide R, Saiki C, Imai T, The Role of GABA-ergic neurons in the trigeminal root ganglion, 94th General Session & Exhibition of IADR, 2016年6月22日~2016年6月25日、「COEX モール・ソウル(韓国)」

武田 守、高橋 誠之、北川 純一、那須 優則、金澤 卓也、島津 徳人、松本 茂二、咬筋炎症に伴う三叉神経脊髄路中間・尾側亜核境界領域に投射する小型三叉神経ニューロン興奮性の BDNF による増強効果、第 37 回 日本神経科学大会、2014年9月11日~2014年9月13日、「パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)」

[図書](計 0 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

高橋 誠之 (TAKAHASHI, Masayuki)  
日本歯科大学・生命歯学部・講師  
研究者番号：00508484

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )