

学位論文

顎顔面領域の神経障害性疼痛発現における
P2X₇受容体の役割

伊藤 剛志

広島大学大学院

医歯薬総合研究科展開医科学専攻

顎口腔頸部医科学講座 歯科矯正学分野

主指導教官：丹根 一夫 教授

2011年

目次

緒言.....	1
材料と方法.....	6
1. 実験動物.....	6
2. 眼窩下神経絞扼手術.....	6
3. 機械的疼痛逃避行動試験.....	6
4. 薬物の髄膜下投与.....	7
5. 免疫組織化学染色.....	9
6. Real time RT-PCR 解析.....	11
7. Western blot 解析.....	12
結果.....	14
1. 神経因性疼痛モデルとしてのラット眼窩下神経絞扼モデルの有用性.....	14
2. 眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核における小膠細胞および P2X ₇ 受容体の局在と P2X ₇ 受容体の発現動態.....	15
3. 眼窩下神経絞扼モデルでの疼痛発現に対する P2X ₇ 受容体特異的拮抗薬髄膜下投与による影響.....	19
4. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α の発現と P2X ₇ 受容体拮抗薬の影響.....	20
5. 眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核での p38 MAPK のリン酸化.....	22
6. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係.....	22
7. P2X ₇ 受容体作動薬髄膜下投与後の疼痛発現とその特異性.....	24
8. P2X ₇ 受容体作動薬投与後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係.....	26

9. P2X ₇ 受容体作動薬投与後の疼痛および TNF- α 発現に対する TNF- α 受容体 リコンビナント製剤の影響.....	30
考察.....	33
1. 神経因性疼痛モデルの有用性について.....	33
2. 眼窩下神経絞扼後の小膠細胞について.....	34
3. 眼窩下神経絞扼後の P2X ₇ 受容体について.....	34
4. 眼窩下神経絞扼後の小膠細胞と P2X ₇ 受容体の関係性について.....	35
5. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と P2X ₇ 受容体の関係について.....	36
6. TNF- α 産生に関係する細胞内情報伝達経路について.....	39
総括.....	41
参考文献.....	42
謝辞.....	51

緒言

1973年にIASP（国際疼痛学会）は、「痛み（pain）」を「組織の実質的な損傷がある際、もしくは損傷する可能性のある傷害が加えられた際に随伴する不快な感覚や情動性の事象」と定義した(<http://www.iasp-pain.org//AM/Template.cfm?Section=Home>)。すなわち、身体の傷害の有無にかかわらず「痛み」を感じる。また、他の感覚と異なり、「痛み」の感覚を引き起こす原因は患者自身に存在することがしばしばあり（例えば外傷や心因性因子など）、その性質や程度が精神的な要因によって大きく修飾されるため、「痛み」を他人と共有することは多くの場合不可能であり、このことが「痛み」の評価や治療を複雑なものにしている。

本来、「痛み」は生物が生きていくために必要不可欠な危険信号である。すなわち、外部からの刺激により誘発される「痛み」のシグナルは、身体に異常あるいは生存の危険が迫っていることを知らせて、危険からの回避を促す。身体に何らかの病巣がある場合、病巣から発せられる「痛み」の信号は、宿主に対して生体に不都合が生じていることを知らせるという役割がある。一方、癌性疼痛、帯状疱疹治癒後疼痛などのように、病巣の「痛み」が激しく長期継続している場合は、「痛み」が警告としての本来の意味を失い、「痛み」それ自身が病態（慢性疼痛）となる場合がある(Sweet, 1984; 津田, 2007)。これが「痛み」の二面性といわれる所以である。この病的疼痛のうち、神経損傷に基づく形質変化や機能異常により生じているものは神経因性疼痛と呼ばれ、全世界で2200万人以上の患者が苦しんでいるとされている(井上, 2008b)。

歯科臨床においては、口腔顎顔面痛を有する患者の治療そのものがしばしば疼痛を伴うため、歯科治療は患者から嫌われることが多い。それでも近年は、局所麻酔や非ステロイド系の鎮痛薬を適切に使用することにより、患者の心身両面の負担も軽減されている。しかし、まれに歯科領域においても神経因性疼痛に遭遇する場合がある。例えば、持続性の灼熱痛を伴う抜歯後カウザルギー、顎関節症として扱われる筋筋膜痛症候群、顎矯正手術やインプラント埋入後に発現する慢性疼痛が、顎顔面領域での神経因性疼痛に分類される(Koyess and Fares, 2006)。これらの患者の一部では、不適切な治療によってその疼痛が悪化し、治療が大変困難になる場合がある(福田ら, 2003)。神経因性疼痛は患者のQOLを低下させ、その原因となる疾患の治療を妨げるため、適切なペインコントロールが必要とされる。しかし、神経因性疼痛はその発現メカニズムについては未だ不明な点が多くあり、既存の鎮痛薬が奏功しないことが大きな問題となっている(井上, 2008a; 別部, 2001)。また、神経因性疼痛は、脊髄神経系と比べて三叉神経系においてより多く発現することが知られており(Sweet, 1984)、三叉神経系における神経因性疼痛の発症機序を解明することは急務の課題である。

口腔顎顔面領域における痛覚を含む感覚刺激は、一次求心性ニューロンの興奮を介して三叉神経脊髄路核の二次ニューロンへ、次いで上位の視床や大脳皮質へ伝達され、特定の感覚として認知される。このうち、一次ニューロンから二次ニューロンへの上行性伝達経路は、これまでの研究結果から慢性疼痛の発症機序を解明する上でとりわけ重要であると考えられており、ニューロンに着目した研究が多数報告されている(Guo et al., 2002; Marchand et al., 2005; Strassman and Vos, 1993; Strassman et al., 1993; Watanabe et al., 2003)。

一方で、ニューロンとともに中枢神経系を構成する細胞群である神経膠細胞が、神経因性疼痛の発生に関与していることが最近明らかになった(Vallejo et al., 2010)。神経膠細胞は星状膠細胞、希突起膠細胞、小膠細胞の3種に大別される。これらの神経膠細胞は、ニューロンの周辺組織の恒常性を維持するなど、ニューロンに対し静的な役割を演じることでシグナル伝達に貢献すると考えられてきた。しかし、神経の傷害または炎症後に星状膠細胞および小膠細胞が形態的に大きく変化すること(Garrison et al., 1994; Guo et al., 2007; Jin et al., 2003; Piao et al., 2006; Takahashi et al., 2010)、星状膠細胞または小膠細胞の活性化阻害薬を髄膜下投与すると神経因性疼痛が抑制されること(Guo et al., 2007; Meller et al., 1994; Milligan et al., 2000; Milligan et al., 2003; Piao et al., 2006; Qin et al., 2006; Ying et al., 2006)などが確認され、慢性疼痛と神経膠細胞との関連性が注目されるようになってきた。また、神経膠細胞の活性化により、炎症性サイトカイン (Clark et al., 2006; Guo et al., 2007; Kim et al., 2007)、プロスタグランジン (Zhao et al., 2007)、脳由来神経栄養因子 (BDNF; Brain-derived neurotrophic factor)(Coull et al., 2005)、ATP (Inoue et al., 2007; Werry et al., 2006)、NO (Kim et al., 2007)、グルタミン酸 (Watkins et al., 2007)が放出され、これらの化学伝達物質がニューロンの脱分極を調節することにより疼痛伝達に修飾を加えていると考えられているが、その詳細なメカニズムの解明はまさに始まったばかりである(Ren and Dubner, 2008)。

小膠細胞に発現するATP受容体には、大きく分けてイオンチャンネル型受容体(P2X_{1~7})とG蛋白質共役型受容体(P2Y_{1~13})の二種類が存在する(Fields and Burnstock, 2006)。このうちイオンチャンネル型の一つであるP2X₄受容体が、神経因性疼痛時に小膠細胞において発現増強することが報告された(Tsuda et al., 2003)。また、同じイオンチャンネル型受容体ファミリーであるP2X₇受容体ノ

ックアウトマウスでは神経因性疼痛が抑制されること(Chessell et al., 2005)、P2X₇受容体の特異的拮抗薬を髄膜下投与すると神経因性疼痛が抑制されること(Honore et al., 2006; McGaraughty et al., 2007)から、P2X₇受容体と神経因性疼痛との関係が注目されているが、その詳細なメカニズムは不明である。さらに、P2X₇受容体活性化後、CXCL2 (Chemokine (C-X-C motif) ligand 2)や interleukin (IL)-1 β などのサイトカインの発現が亢進し(Shiratori et al., 2010; Suzuki et al., 2004; Takenouchi et al., 2009)、培養小膠細胞を用いた実験では、P2X₇受容体の活性化後に tumor necrosis factor (TNF)- α の発現も亢進した(Suzuki et al., 2004)。さらに、慢性疼痛が TNF- α 拮抗薬の投与によって抑制されること、末梢神経および中枢神経において TNF- α の発現が亢進することなどから、TNF- α が慢性疼痛に関与していると考えられる(Schafers et al., 2003a; Schafers et al., 2003b; Sommer et al., 1998)。そこで、我々は P2X₇受容体を介した TNF- α の産生が神経因性疼痛発現に関与しているという仮説を立てた。

一方、脊髄後角に存在する小膠細胞において、神経傷害後に細胞内情報伝達経路の一つである p38 MAPK (Mitogen-activated protein kinase)のリン酸化が起こること(Kobayashi et al., 2008; Tsuda et al., 2004)や、坐骨神経傷害後に p38 MAPKの活性化を阻害することで TNF- α の発現が減少し、疼痛が抑制されたことから(Xu et al., 2007)、小膠細胞において p38 MAPKを介した TNF- α の産生経路が存在する可能性が考えられるが、その詳細は不明である。

以上のことより、本研究では三叉神経脊髄路核の小膠細胞において、p38 MAPKを介した TNF- α 放出経路が P2X₇受容体と関係し、神経因性疼痛を誘発しているとの仮説を立て、以下の項目について検討した。

1. 神経因性疼痛モデルとしての眼窩下神経絞扼モデルの有用性

2. 眼窩下神経絞扼による三叉神経脊髄路核での小膠細胞および P2X₇ 受容体の局在と P2X₇ 受容体の発現動態
3. 神経因性疼痛に対する P2X₇ 受容体拮抗薬投与の影響
4. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と、これに対する P2X₇ 受容体拮抗薬の影響
5. 眼窩下神経絞扼による、三叉神経脊髄路核における p38 MAPK のリン酸化発現
6. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係
7. P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛発現とその特異性
8. P2X₇ 受容体作動薬投与後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係
9. P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛および TNF- α 発現に対する TNF- α 受容体リコンビナント製剤の影響

材料と方法

1. 実験動物

実験動物として8週齢雄性 Sprague-Dawley ラット（日本チャールズ・リバー、横浜）を用いた。動物の取り扱いは、広島大学自然科学研究支援開発センター動物実験施設倫理委員会の承認を受けて、国際疼痛学会の実験指針を順守して行った (Zimmermann, 1983)。

2. 眼窩下神経絞扼手術

実験動物（動物の数は結果に記入）の処置は、ネンブタール(大日本住友製薬、大阪)の腹腔内投与 (0.5 ml/kg)による深麻酔下で行った。神経因性疼痛の誘発のため、左側眼窩下神経を露出し、4-0号牛 chromic gut (Ethicon, Ltd., Edinburgh, Scotland., UK)を用いて約1 mm 間隔で3か所を、緩く結紮した (Bennett and Xie, 1988)。対照群では同部の露出のみ行い、絞扼しないで創部を縫合した。

3. 機械的疼痛逃避行動試験

疼痛閾値を測定する行動試験は、von Frey filament (Toch-test™ Sensory Evaluatory, North Coast Medical Inc., Morgan Hill, CA, USA) を用いて行った。術者は綿の手袋を装着し、ラットを後ろ足で立たせ、手のひらに屈みこませるように訓練した。Whisker pad (ヒゲの部分) に、曲げに必要な力の大きさが0.02-100 g の von Frey filament を押し当て、頭を急激に動かした場合を反応有

りと判断した。von Frey filament を 5 回押し当てた時の反応回数を記録して、反応頻度（反応回数/5）を計算し、刺激反応曲線を作成した後、GraphPad Prism（GraphPad Software Inc., San Diego, CA. USA）を用いて非線形回帰曲線を作成し、EF₅₀ 値を算出した。EF₅₀ 値は 50%の頻度で von Frey filament に反応する値として定義される。

4. 薬物の髄膜下投与

機械的疼痛逃避行動試験後、薬物投与の準備を行った。ネンブタール（大日本住友製薬）による深麻酔下で、ポリエチレンチューブ（PE10; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA）を第一、第二頸椎間から埋入し、チューブ先端を第三頸椎相当部の髄膜下に留置し、他端を皮膚外に位置させた。次いで、傷口を縫合し、消毒した。外科的侵襲による疼痛の影響を排除するため 1 週間の休息期を設けた後、眼窩下神経絞扼術あるいは薬物投与を行った。

1) 眼窩下神経絞扼後の薬物投与

眼窩下神経絞扼 3 日後に、留置したチューブを介してラット髄膜下に P2X₇ 受容体特異的拮抗薬である A438079 hydrochloride (3.5 mg/ml, TOCRIS Bioscience, Ellisville, MO, USA) を生理食塩水に溶解した溶液 10 μ l、対照群には同量の生理食塩水を投与した。その後、経時的に投与後 1 日まで機械的疼痛逃避行動試験を行った（図 1）。

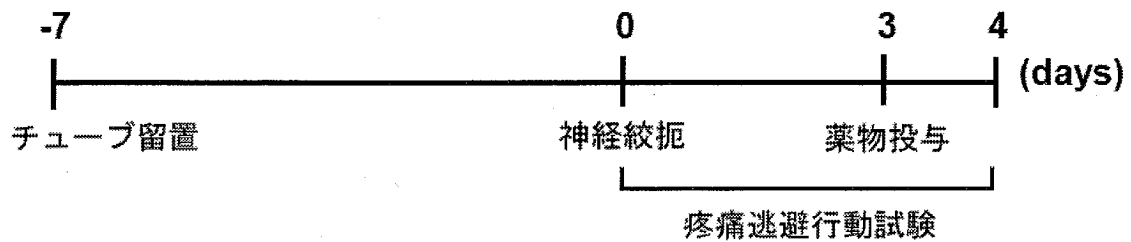


図1 機械的疼痛逃避行動試験のタイムコース

2) 眼窩下神経絞扼時の P2X₇ 受容体特異的拮抗薬および p38 MAPK リン酸化阻害薬投与

眼窩下神経絞扼処置と同時に、チューブを介してラット髄膜下に P2X₇ 受容体特異的拮抗薬である A438079 hydrochloride (3.5 mg/ml, TOCRIS Bioscience) または p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 (1 mg/ml, Calbiochem, La Jolla, CA, USA) を生理食塩水に溶解した溶液 10 μl を、対照群には同量の生理食塩水を投与した。その後、投与後 3 日目に機械的疼痛逃避行動試験を行った (図 2)。

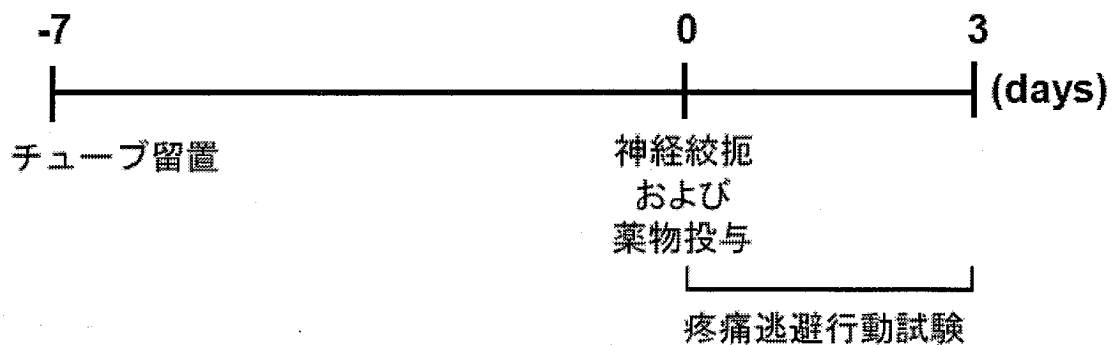


図2 機械的疼痛逃避行動試験のタイムコース

3) 各薬物の単独投与

P2X₇受容体作動薬である BzATP (5 µg/ml, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)を、チューブを介し 10 µl 髄膜下投与し、投与後 28 日目まで機械的疼痛逃避行動試験を行った。さらに、P2X₇受容体特異的拮抗薬である A438079 (TOCRIS Bioscience)、抗 P2X₇受容体抗体 (Alomone Labs Ltd., Jerusalem, Israel)、p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 (Calbiochem)、TNF-α 受容体リコンビナント製剤である Etanercept (10 µg/ml, 武田薬品, 大阪)を、それぞれ BzATP 投与 30 分前に髄膜下に 10 µl ずつ 投与し、投与後 1 日目まで機械的疼痛逃避行動試験を行った (図 3)。対照群には生理食塩水を投与した。

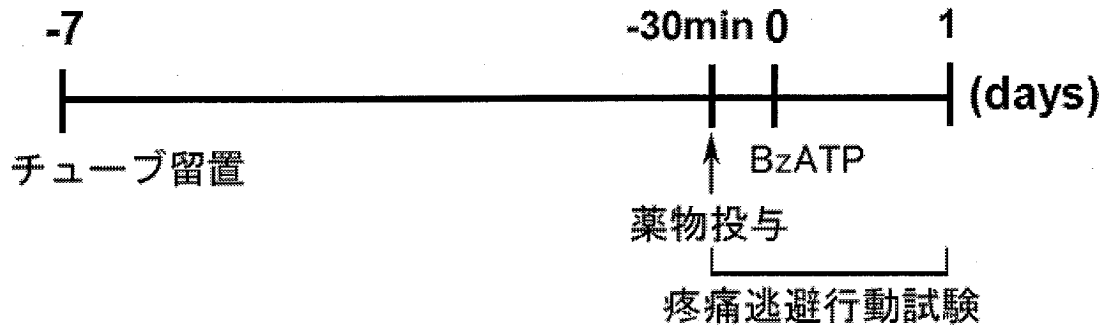


図 3 機械的疼痛逃避行動試験のタイムコース

5. 免疫組織化学染色

ネンブタール (大日本住友製薬) 腹腔内投与 (0.5 ml/kg) による深麻酔下で、4%パラホルムアルデヒド (メルク, 東京)、0.1 M リン酸緩衝液 (PB; pH 7.4 シグマアルドリッチ, 東京) を含む固定液を用いてラットの灌流固定を行った。

灌流固定後脳幹を摘出し、同固定液に 3 時間浸漬した。次に、4 °C で 30%スクロースを含む 0.01 M リン酸緩衝生理食塩液 (PBS; 三菱化学ヤトロン, 東京) に 3 日間浸漬した。その後、凍結マイクロトーム (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、厚さ 30 µm の連続凍結切片を作製した。

免疫組織化学染色は Avidin biotinylated horseradish peroxidase complex (ABC) 法または蛍光標識抗体法を用いた浮遊切片法により行った。ABC 法では、内因性ペルオキシダーゼを不活化させるため、1%過酸化水素水を含む PBS で 30 分間処理し、0.1%トリトン X-100 (シグマアルドリッチ) を含む PBS (PBST) による洗浄後、非特異的反応を抑制するために、室温で 3% Normal goat serum を含む PBST でブロッキングし、一次抗体に一晩浸漬した切片を、PBST で洗浄後、ビオチン化二次抗体に 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、50 倍希釈した ABC 溶液 (DAKO, Glostrup, Denmark) を 60 分間反応させた。PBS で洗浄後、DAB 溶液 (0.02% 3,3-ジアミノベンチジン四塩酸塩, DAKO) で発色させた。免疫組織化学染色後、エタノールによる脱水処理を施しエンテラン (和光純薬, 大阪) で封入し、光学顕微鏡 (BX-40; オリンパス光学工業, 東京) を用いて明視野照明下で観察と写真撮影を行った。蛍光標識抗体法については、一次抗体浸漬後 PBST で洗浄し、蛍光標識二次抗体を 120 分間反応させた。染色後、Vectorsield (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) で封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (Lsm5 Pascal; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) 下で Alexa Fluor 488 (適正励起波長 496 nm) および Alexa Fluor 568 (適正励起波長 578 nm) に対し、レーザーを照射し切片の観察および写真撮影を行った。

蛍光標識抗体法では、室温で 3% Normal goat serum を含む PBST でブロッキングし、一次抗体としてマウス抗ラット CD11b 抗体 (ABC 法; 1:1,000、蛍光標識抗体法; 1:400; AbD, Serotec, Raleigh, NC, USA)、ウサギ抗 TNF- α 抗体 (蛍光標識抗体法; 1:1,200; Alomone Labs Ltd)、ウサギ抗 P2X₇ 受容体抗体 (ABC 法; 1:12,000, 蛍光標識抗体法; 1:1,200 Alomone Labs Ltd)、マウス抗 NeuN 抗体 (蛍光標識抗体法; 1:3,000; Milipore Corporation Bedford, MA, USA) を用いた。また、二次抗体としてビオチン化抗ウサギ抗体 (1:400; Vector

Laboratories Inc.)、ビオチン化抗マウス抗体(1:400; Vector Laboratories Inc)、Alexa Fluor 488 標識抗ウサギ抗体、Alexa Fluor 568 標識抗マウス抗体 (1:400; Molecular Probes、Inc., Eugene, OR, USA) を用いた。

6. Real time RT-PCR 解析

エーテル深麻酔下でラットの脊髄および腹大動脈を切断し放血致死させた後、断頭し脳幹を含む脳を素早く摘出、ドライアイスで凍結させた。その後、脳幹から門を中心に厚さ 5 mm の脳をサンプルとして摘出した。このサンプルは三叉神経中位核尾側核移行部および尾側核を含む (Paxinos and Watson, 1982)。サンプルに Trizol reagent (1,000 μ l, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を添加し、ホモジェナイザーを用いて細胞を溶解した後、水中で 30 分放置した。その後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN, 東京) を用いて total RNA の抽出を行った。RNA 抽出後、Nanodrop (Terumo Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて定量し、ReverTraAce (東洋紡, 大阪) を用いて cDNA を合成した。その後、P2X₇ Primer、18s rRNA taqman probe (図 4, Applied Biosystems)、SYBR Green Real-time masterMix (Applied Biosystems) および TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を用いて、P2X₇ 受容体遺伝子の発現量を Applied Biosystems 7900 (Applied Biosystems) を用いて解析した。反応条件は 95°C、15 秒変性反応、60°C、60 秒のアニーリングおよび 72°C で 10 秒の伸長反応を 1 cycle とし、40 cycle 行った。尚、PCR で目的の領域が増幅されているか確認するため、アガロースゲルを用いて電気泳動を行った (214kbp)。

P2X₇ primer forward 5'-GCTTGGGAAAAGTCTGCAAG-3'
 reverse 5'-TAGTTGAGACGGGAGGCAGT-3'

図 4 primer の塩基配列

7. Western blot 解析

Real time RT-PCR 解析と同様の方法でサンプルを抽出した。あらかじめ Phosphatase Inhibitor Cocktail (ナカライテスク, 京都) を 100 倍希釈しておいた RIPA buffer 200 μ l (ナカライテスク) にサンプルを混ぜ、Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, CA, USA) により、タンパク濃度を測定した。20 μ g のタンパクを laemmli's sample buffer に混和し、12.5%アクリルアミドゲル上で電気泳動 (SDS-PAGE) により分離後、ニトロセルロースメンブレン (PROTRAN, WHATMAN, Dassel, Germany) 上に転写した。

一次抗体にはウサギ抗ラット P2X₇ 抗体 (1:500 Alomone Labs Ltd)、ウサギ抗リン酸化 p38 MAPK (p-p38 MAPK) 抗体 (1:1,000 Cell Signaling Technology, 東京)、マウス抗ラット CD11b 抗体 (1:1,000 AbD, Serotec)、二次抗体には HRP 標識抗ウサギ抗体 (1:2,000 Amersham Biosciences, Buckinghamshire, England)、HRP 標識抗マウス抗体 (1:1,000 Amersham Biosciences) を用いた。泳動と転写の蛋白量の再検証には β -actin を用いた。同一のメンブレンに β -actin 抗体 (1:1,000 シグマアルドリッチ) を反応させ、二次抗体には HRP 標識抗マウス抗体 (1:1,000 Amersham Biosciences) を用いた。メンブレンを ECL plus (GEヘルスケア, 東京) を用いて化学発光させ、X線フィルム (Hyperfilm ECL, GEヘルスケア) に露光したものを現像した。スキャナー (GT-X800; EPSON, 諏訪) を用いてフィルム像を取り込み、Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて数値化し、解析を行った。各サンプルの TNF- α 、p-p38 MAPK、P2X₇ 量は、対応した β -actin と比較して数値化し、処置前のサンプルの数値を 100% として、処置後の数値を求めた (各 n=4)。

算出した数値は Excel 2007 (Microsoft, 東京)を用いて分散分析(ANOVA)を行った後、Fisher's PLSD test により平均の有意差検定を行なった。

結果

1. 神経因性疼痛モデルとしてのラット眼窩下神経絞扼モデルの有用性

ラット眼窩下神経神経絞扼モデルの、顎顔面領域における神経因性疼痛モデルとしての有用性を検討した。絞扼群患側では、対照群健側と比較して、処置後1日、3日、7日、10日目にEF₅₀値が有意に小さな値を示した（図5）。また、対照群患側と比較して、処置後3日目および7日目にEF₅₀値が有意に小さかった。

以上の結果より、ラット眼窩下神経絞扼モデルが顎顔面領域における神経因性疼痛モデルとして有用であることが確認された。

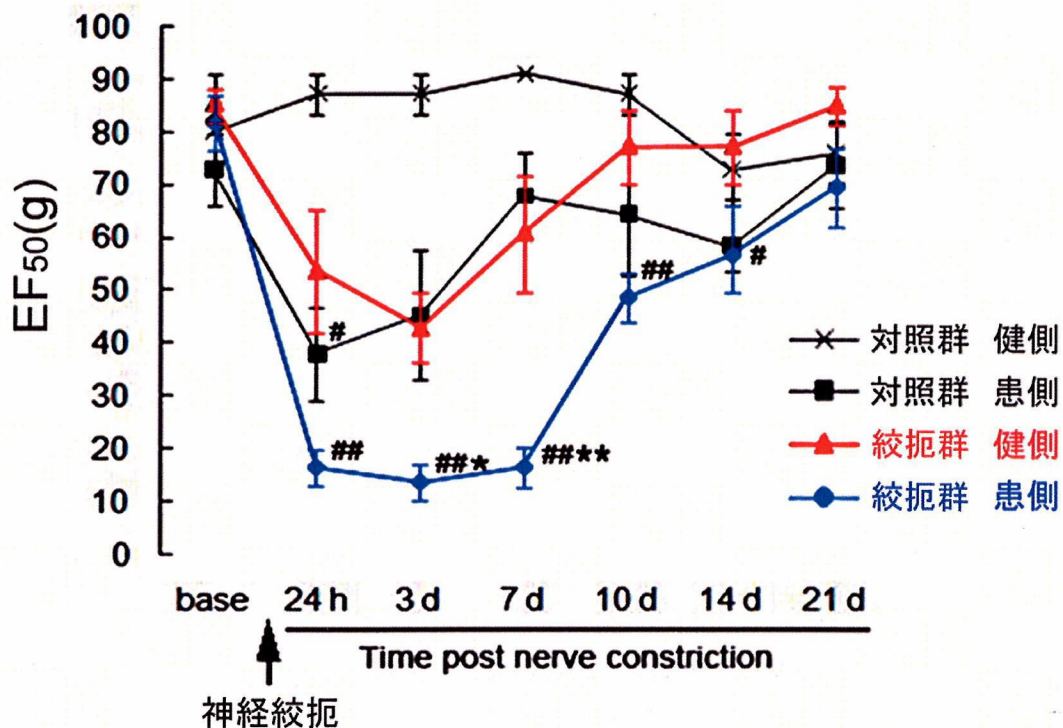


図5 ラット眼窩下神経絞扼モデルにおける EF₅₀ 値の変化

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$ 対照群患側との有意差あり

: $p < 0.05$, ## : $p < 0.01$ 対照群健側との有意差あり 各群 n=5.

2. 眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核における小膠細胞および

P2X₇ 受容体の局在と P2X₇ 受容体の発現動態

1) 三叉神経脊髄路核における P2X₇ 陽性細胞の変化

眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核における P2X₇ 受容体の局在を免疫組織化学染色により検索した。絞扼群では、尾側核において P2X₇ 陽性細胞が多数発現していたのに対し(図 6. A, C)、対照群では少数のみ認められた(図 6 B, D)。また、絞扼群、対照群ともに対照側における変化は認められなかった(図 6 A, B)。

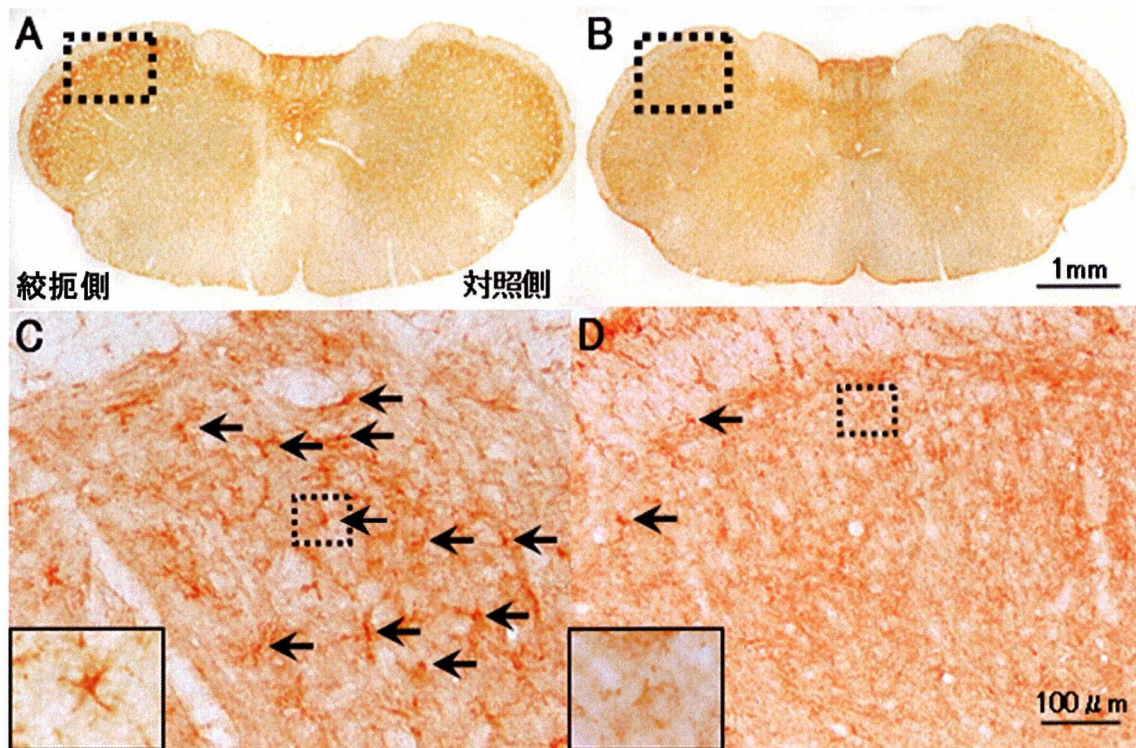


図6 三叉神経脊髄路核尾側核における P2X₇ 染色像

眼窩下神経絞扼後 3 日目の三叉神経脊髄路核尾側核における免疫染色像を示す。矢印は P2X₇ 陽性細胞。A、C；神経絞扼群 B、D；対照群 C、D；A、B 中の点線枠の拡大像。左下端実線枠は C、D 中の点線枠の強拡大像を示す。

2) 三叉神経脊髄路核における P2X₇ 受容体発現量

眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核における P2X₇ 受容体発現量を、Western blot 解析および Real time RT-PCR 解析を用いて検討を行った。絞扼群の P2X₇ 受容体は、無処置群と比較して、タンパクレベルにおいて神経絞扼後 3 日目をピークに発現が有意に亢進し（図 7 A, B）、mRNA レベルにおいても同様に発現亢進が有意に確認された（図 7 C）。

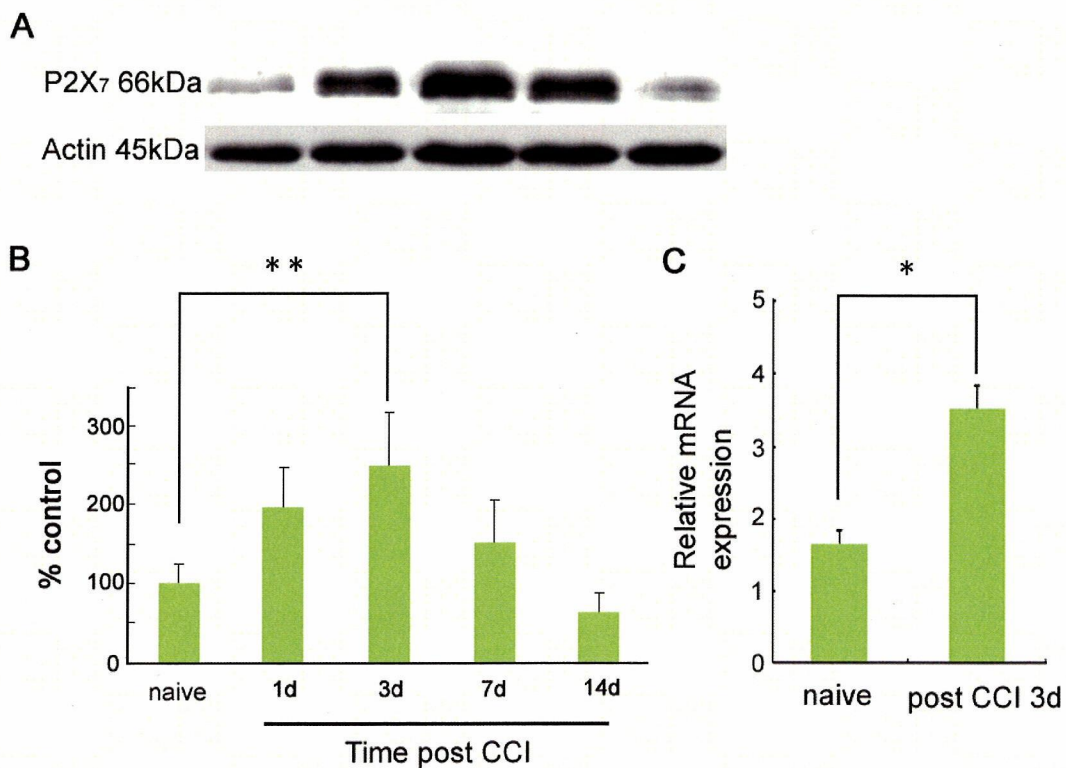


図 7 ラット眼窩下神経絞扼モデルにおける三叉神経脊髄路核の P2X₇ 受容体タンパク発現量および mRNA の変化

A, B ; 眼窩下神経絞扼後 1, 3, 7, 14 日目における三叉神経脊髄路核の P2X₇ 受容体タンパク発現量 C ; 眼窩下神経絞扼後 3 日目における三叉神経脊髄路核の P2X₇ 受容体 mRNA 発現量 * : $p < 0.05$ 、** : $p < 0.01$ 無処置群との有意差あり 各群 n=5

3) 三叉神経脊髄路核における CD11b 陽性細胞の変化

眼窩下神経絞扼後、三叉神経脊髄路核における小膠細胞の局在を CD11b 免疫組織化学染色により検索した。実験群では、CD11b 陽性細胞が多数発現していたのに対し、対照群では少数のみ認められた (図 8 C,D)。また、実験群において細胞体および細胞突起の肥大化が確認された (図 8 C)。絞扼群、対照群ともに対照側における変化は認められなかった (図 8 A, B)。

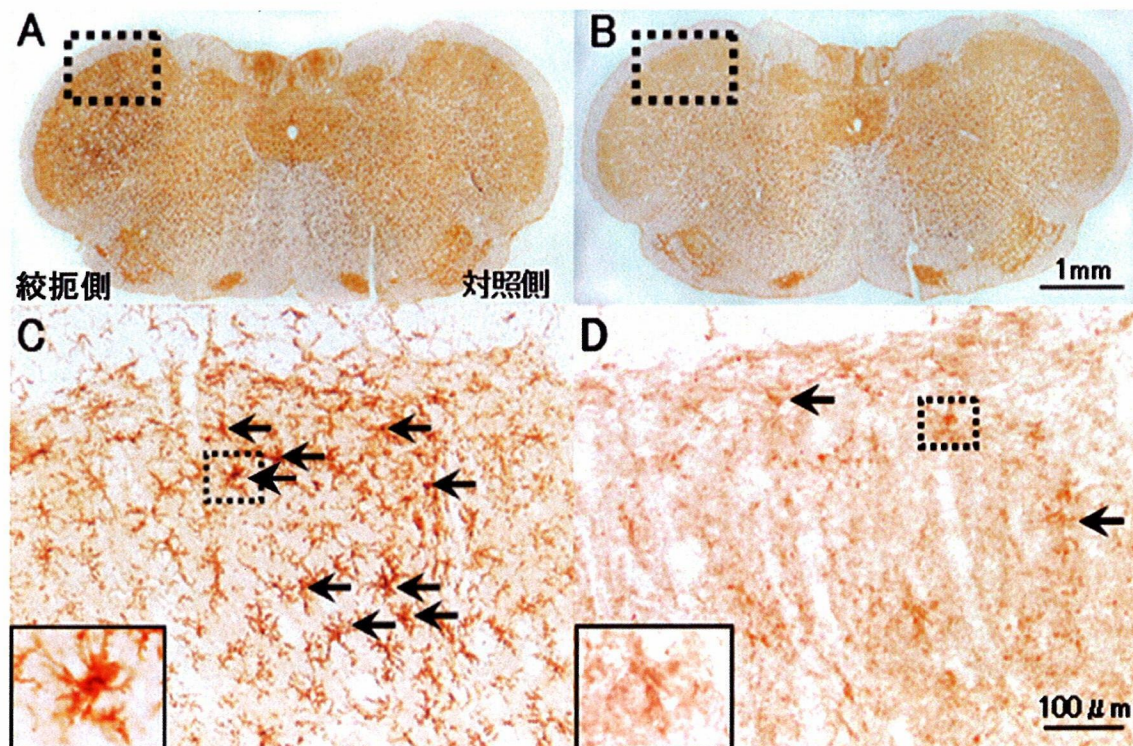


図 8 三叉神経脊髄路核尾側核における CD11b 染色像

眼窩下神経絞扼後3日目の三叉神経脊髄路核におけるCD11b染色像を示す。矢印はCD11b陽性細胞。A、C；実験群 B、D；対照群 C、D；A、B中の点線枠の拡大像。左下端実線枠はC、D中の点線枠の強拡大像を示す。

4) 三叉神経脊髄路核の小膠細胞におけるP2X₇受容体発現

小膠細胞におけるP2X₇受容体の発現を二重蛍光標識抗体法で検討した。絞扼側の三叉神経脊髄路核において、緑で染色されるP2X₇陽性細胞(図9A, D)と赤で染色されるCD11b陽性細胞(図9B, E)が重なることから、P2X₇受容体が小膠細胞に発現していることが確認された(図9C, F)。また、対照側における発現はほぼ認められなかった。

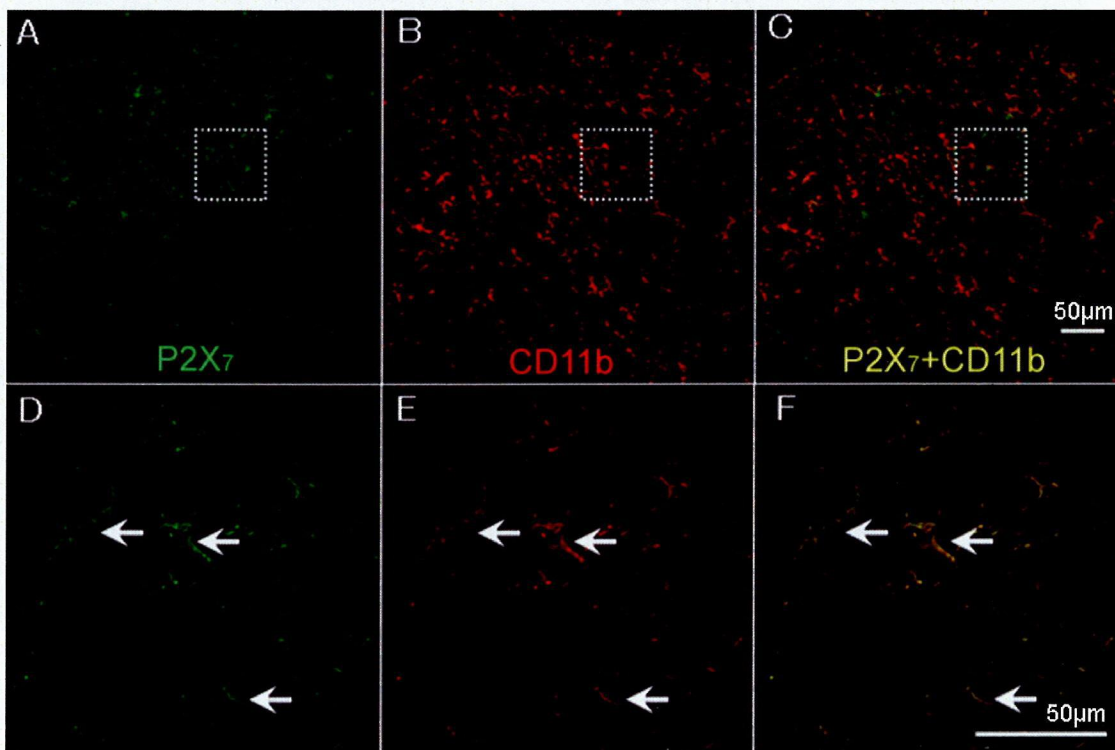


図9 三叉神経脊髄路核におけるP2X₇受容体とCD11bの二重免疫染色像

眼窩下神経絞扼後3日目の三叉神経脊髄路核におけるP2X₇およびCD11b染色像を示す。矢印は陽性細胞。A、D；P2X₇ B、E；CD11b C、F；P2X₇とCD11bの重ね合わせ D、E、F；点線枠の拡大像

3. 眼窩下神経絞扼モデルでの疼痛発現に対するP2X₇受容体特異的拮抗薬髄膜下投与による影響

P2X₇受容体拮抗薬投与により神経因性疼痛が制御されるか否か検索するため、P2X₇受容体特異的拮抗薬であるA438079を眼窩下神経絞扼後3日目に髄膜下投与し、機械的疼痛逃避行動試験を行った。生理食塩水投与群と比較して、P2X₇受容体拮抗薬投与群では投与後5分から24時間までEF₅₀値が有意に大きい値を示した。また、10倍希釈濃度投与群においても緩やかなEF₅₀値の増加が認められ、2時間から24時間にかけて対照群と比べ有意に大きい値を示した(図10)。

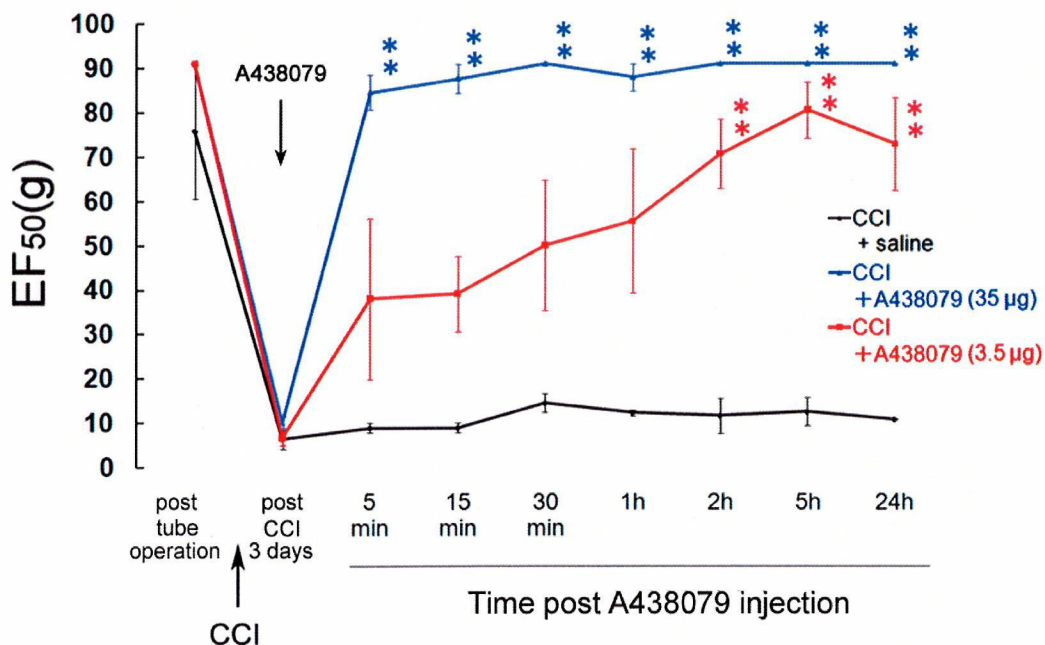


図10 眼窩下神経絞扼後のA438079髄膜下投与によるEF₅₀値の変化

眼窩下神経絞扼 (CCI)後3日目にチューブを介してP2X₇受容体特異的拮抗薬であるA438079を髄腔内投与し、機械的疼痛逃避行動試験を行った。*: $p < 0.01$ 生理食塩水投与群との有意差あり 各群 n=5

4. 眼窩下神経絞扼後のTNF- α の発現とP2X₇受容体拮抗薬の影響

1) 眼窩下神経絞扼後のTNF- α 発現

眼窩下神経絞扼後にTNF- α が発現亢進するか否か検討するためwestern blot解析を行った。眼窩下神経絞扼後3日目に、25 kDaの膜結合型TNF- α (mTNF- α)および17 kDaの分泌型TNF- α (sTNF- α)の発現が亢進した。さらにこの発現亢進に、P2X₇受容体が関係しているか検討するため、眼窩下神経絞扼と同時にP2X₇受容体拮抗薬であるA438079を髄膜下投与した結果、眼窩下神経絞扼によるmTNF- α およびsTNF- α の発現亢進は消失した(図11)。

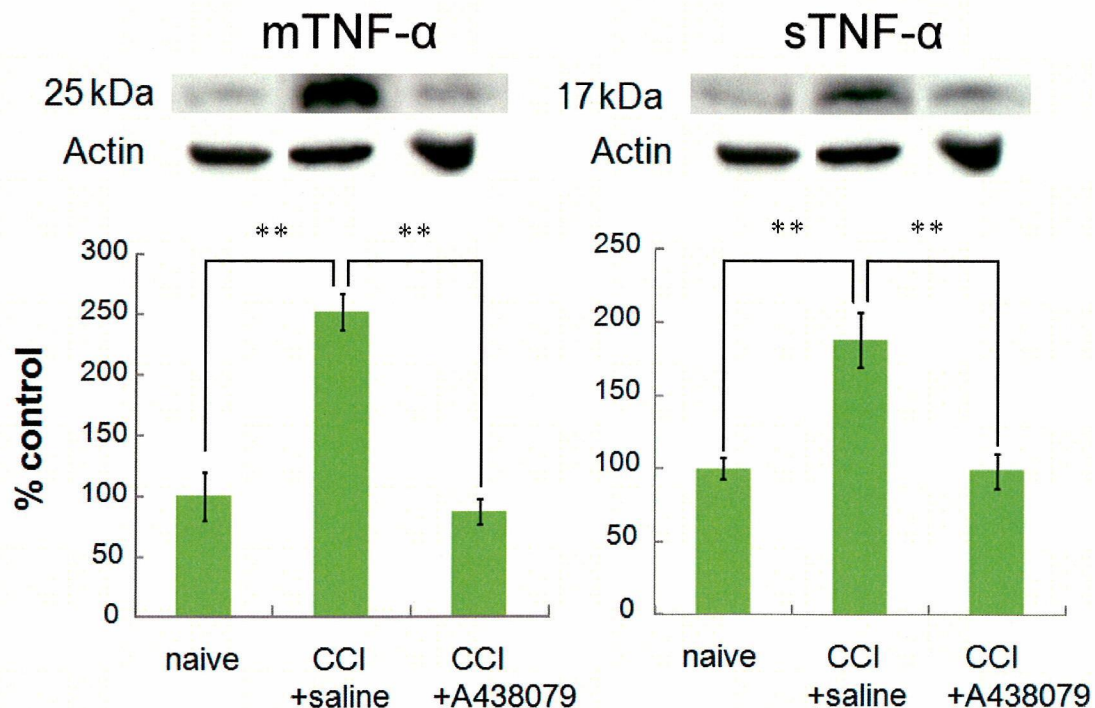


図 11 眼窩下神経絞扼後の TNF- α タンパク発現量の変化と P2X₇ 受容体拮抗薬前投与の影響

眼窩下神経絞扼後3日目における mTNF- α および sTNF- α のタンパク発現量。

** : $p < 0.01$, 各群 $n = 5$

2) A438079 髄膜下投与による神経因性疼痛への影響

眼窩下神経絞扼と同時に P2X₇ 受容体拮抗薬である A438079 を髄膜下投与した群において、眼窩下神経絞扼後3日目に確認される EF₅₀ 値の減少が有意に抑制された (図 12)。

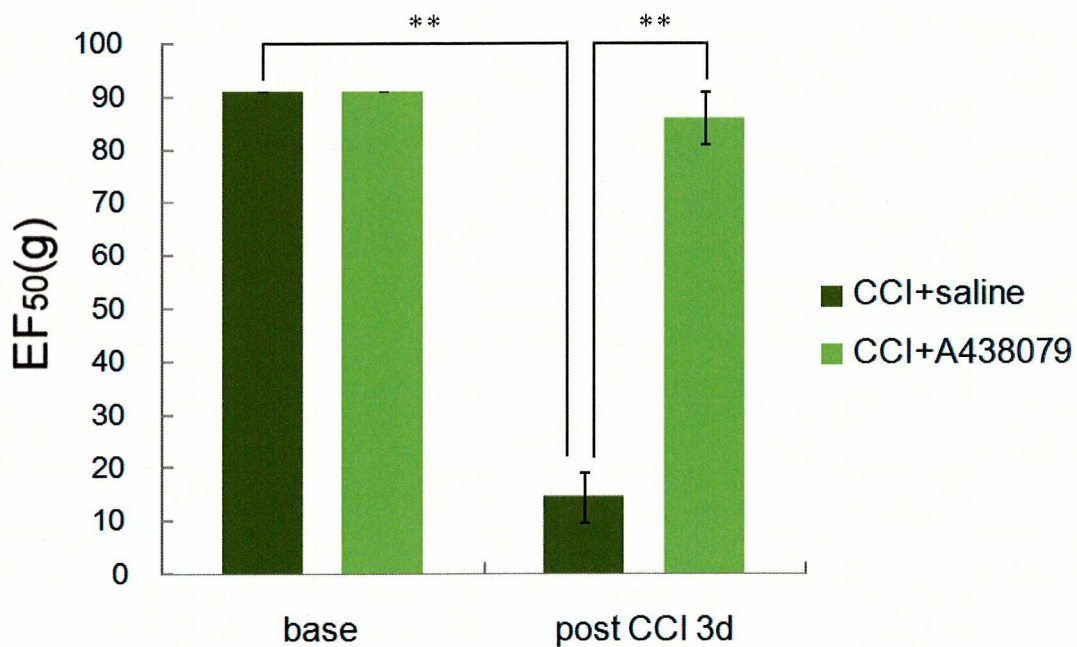


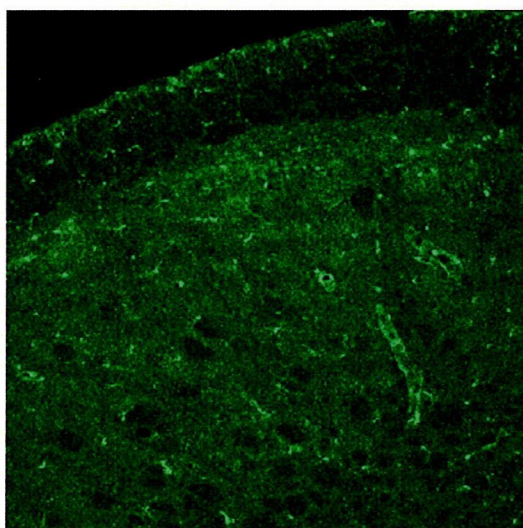
図 12 眼窩下神経絞扼後の EF₅₀ 値の変化

** : $p < 0.01$, 各群 $n = 5$

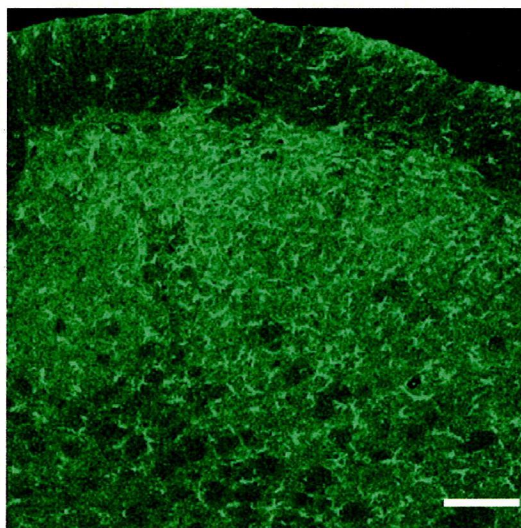
5. 眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核での p38 MAPK のリン酸化

眼窩下神経絞扼後に三叉神経脊髄路核において p38 MAPK のリン酸化が亢進するか否か免疫組織化学染色を用いて検索した。実験群健側と比較して、実験群患側では p-p38 MAPK 陽性細胞が多数確認された（図 13）。

実験群 健側



実験群 患側



Scale bar 20 μ m

図 13 神経絞扼後の三叉神経脊髄路核での p-p38 MAPK 免疫組織化学染色像

6. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係

1) 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現亢進に対する p38 MAPK リン酸化阻害薬の影響

眼窩下神経絞扼後に発現亢進する TNF- α に対し、p38 MAPK のリン酸化阻害が影響を及ぼすか否かを検討した。神経絞扼後に発現亢進した mTNF- α は、p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 髄膜下投与群において減少した。また、mTNF- α については、SB203580 投与群と生理食塩水投与群との間に有意な差が認められた (図 14)。

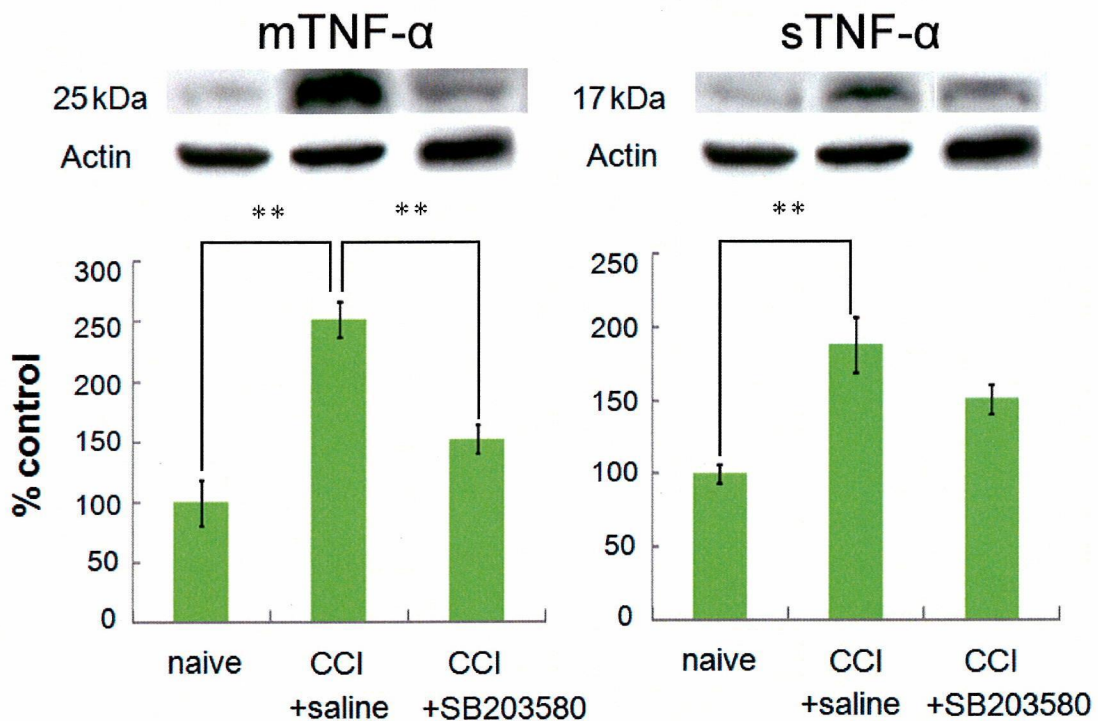


図 14 p38 MAPK リン酸化阻害薬の前投与による眼窩下神経絞扼後の TNF- α タンパク発現量の変化

** : $p < 0.01$, 各群 $n = 5$

2) SB203580 髄膜下投与による神経因性疼痛への影響

さらに眼窩下神経絞扼と同時に p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 を髄膜下投与した群において、EF₅₀ 値は生理食塩水投与群と比べて有意に大きな値を示した (図 15)。

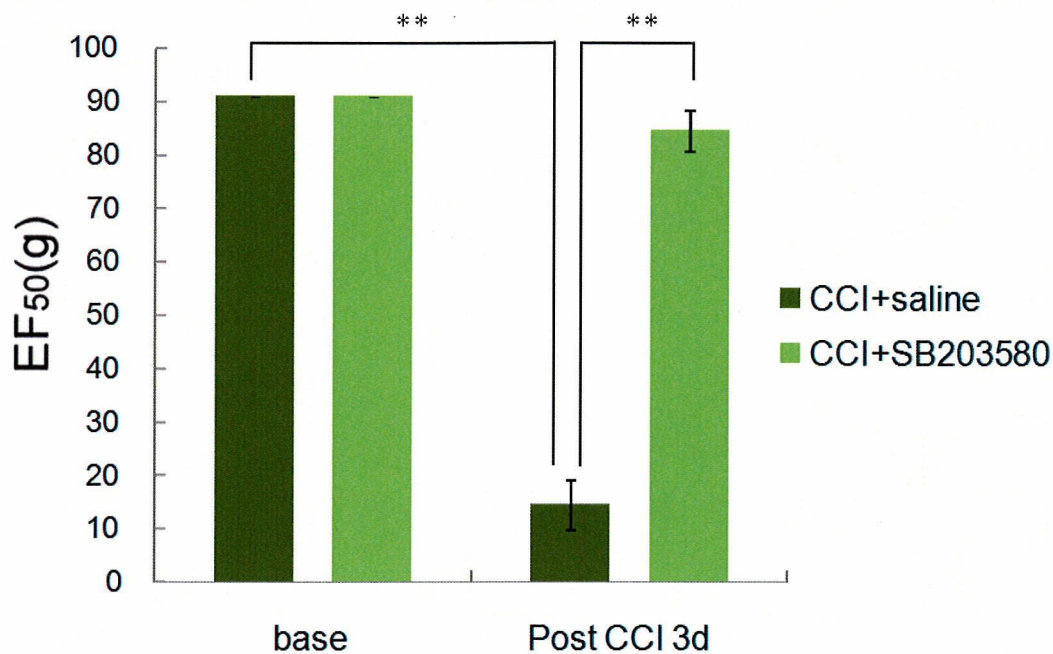


図 15 p38 MAPK リン酸化阻害薬の前投与による眼窩下神経絞扼後の EF₅₀ 値の変化

** : $p < 0.01$, 各群 $n = 5$

7. P2X₇ 受容体作動薬髄膜下投与後の疼痛発現とその特異性

眼窩下神経絞扼後には、様々な受容体および細胞内情報伝達経路が活性化され、神経因性疼痛を引き起こすことが報告されている。このため P2X₇ 受容体のみを賦活化した場合においても、眼窩下神経絞扼後の疼痛発現や TNF- α の発現亢進、および p38 MAPK のリン酸化亢進が確認されるか否か検討した。

1) P2X₇ 受容体作動薬髄膜下投与後の疼痛発現

P2X₇ 受容体特異的作動薬である BzATP の髄膜下投与により、疼痛が惹起されるのか否か検討した。生理食塩水投与群と比較して BzATP(0.5 ng)投与群では、投与後 5 分から 21 日まで EF₅₀ 値が有意に小さな値を示した。また、その 100

分の1用量投与群においても、投与後5分から14日までEF₅₀値の減少が確認された(図16)。

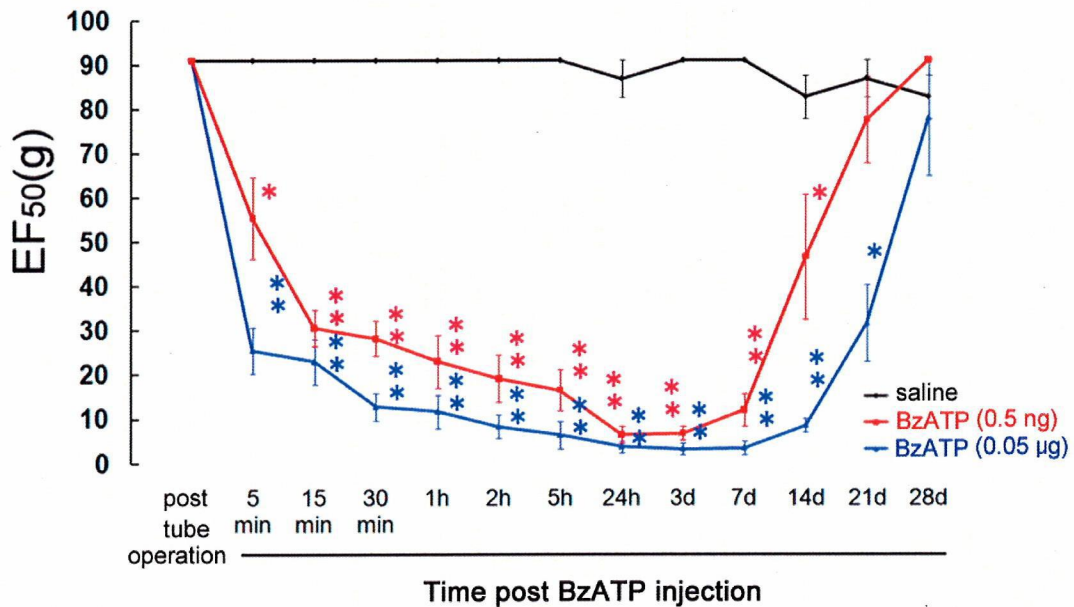


図16 P2X₇受容体作動薬であるBzATP投与後のEF₅₀値の変化

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, 生理食塩水投与群との有意差あり 各群 $n=5$

2) P2X₇受容体作動薬のP2X₇受容体との関係性

BzATPはP2X₇受容体の特異的リガンドとされているが、その特異性を疑う報告もある。このためP2X₇受容体特異的拮抗薬であるA438079または抗P2X₇受容体抗体を前投与し、P2X₇受容体との関係性を検討した。

A438079または抗P2X₇受容体抗体を前投与した両群において、BzATP投与後に確認されたEF₅₀値の減少が、有意に抑制された(図17)。

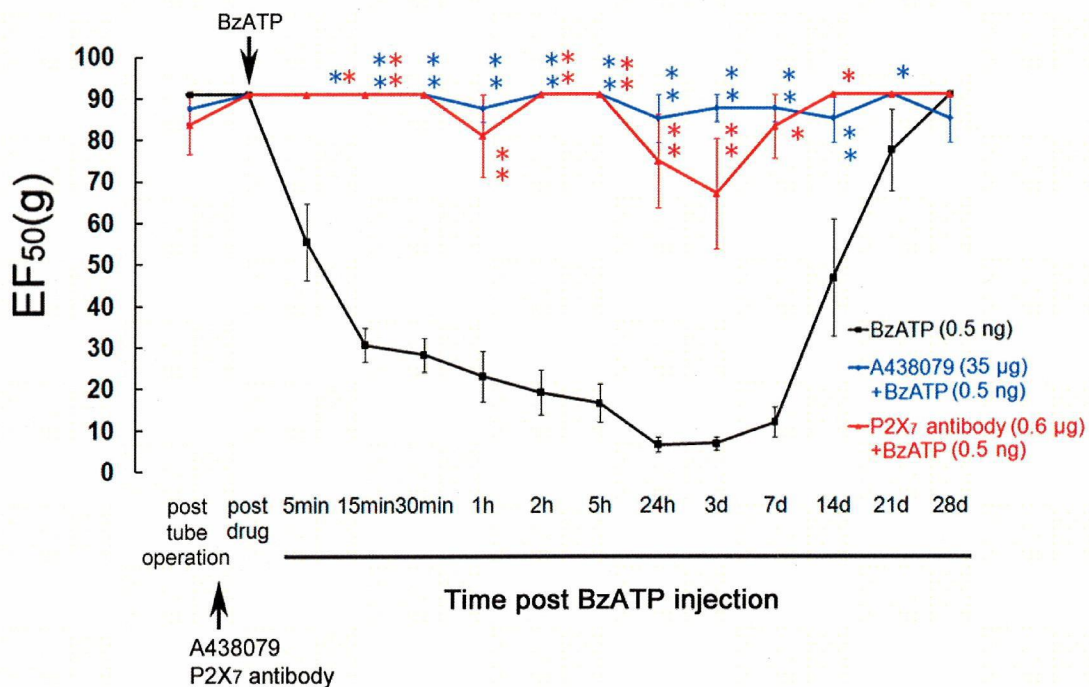


図 17 P2X₇ 受容体拮抗薬または P2X₇ 受容体抗体前投与による BzATP 投与後の EF₅₀ 値の変化

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, BzATP 投与群との有意差あり 各群 n=5

8. P2X₇ 受容体作動薬投与後の TNF- α 発現と p38 MAPK のリン酸化との関係

1) P2X₇ 受容体作動薬投与後の TNF- α 発現

P2X₇ 受容体作動薬である BzATP の投与後に、TNF- α が発現亢進するか検討した。BzATP 投与群では、無処置群と比べ、sTNF- α の発現亢進が確認された。さらに、その発現亢進は P2X₇ 受容体拮抗薬である A438079 の前投与により有意に抑制された (図 18)。

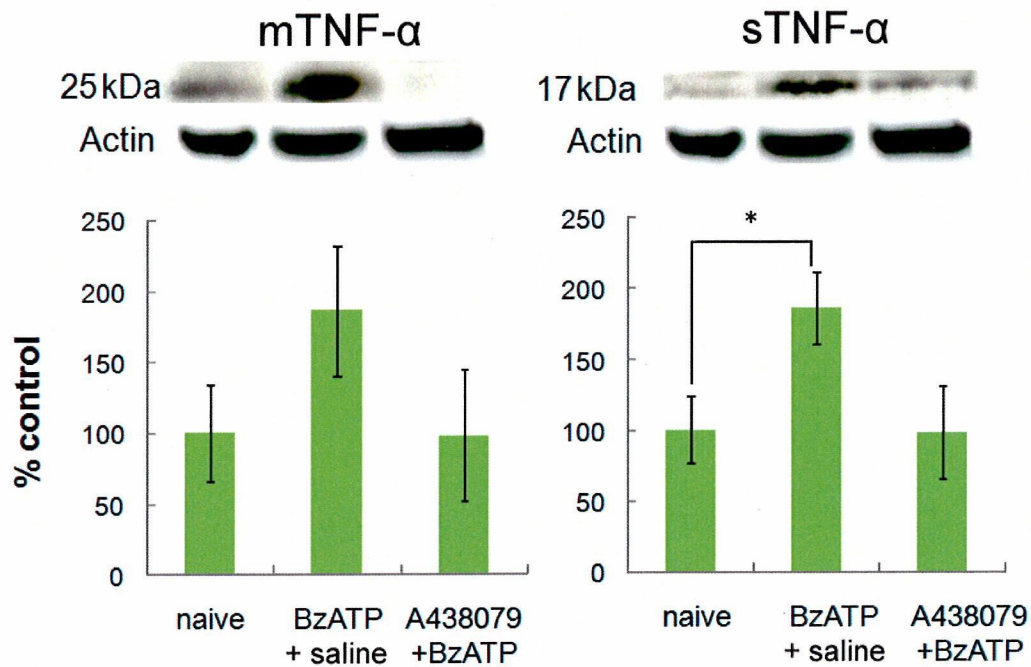


図 18 BzATP 投与後の TNF- α タンパク発現量の変化と P2X₇ 受容体拮抗薬前投与の影響

* : $p < 0.05$ 各群 $n=5$

2) P2X₇ 受容体作動薬投与後の p38 MAPK のリン酸化について

P2X₇ 受容体作動薬である BzATP の投与後に、p38 MAPK のリン酸化が亢進するか否かを検討した。BzATP 投与群では、無処置群と比べ、p38 MAPK のリン酸化が有意に亢進していた。また、その亢進は p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 の前投与により有意に抑制された (図 19)。

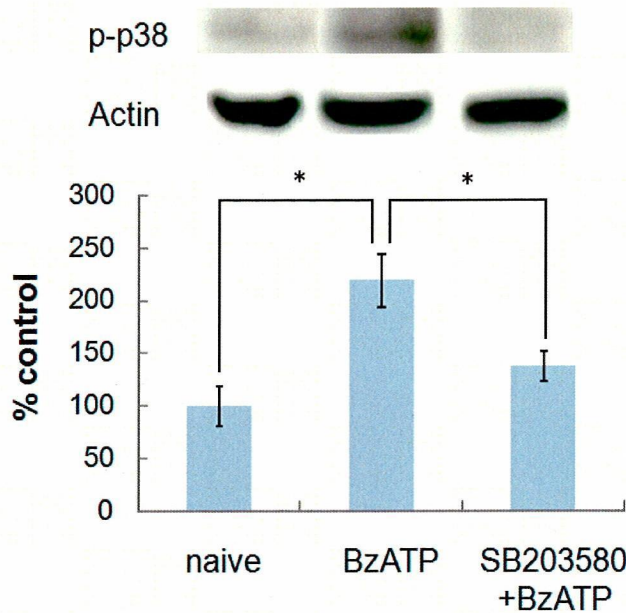


図 19 BzATP 投与後の p-p38 MAPK タンパク発現量の変化と p38 MAPK リン酸化阻害薬前投与の影響

* : $p < 0.05$ 各群 $n=5$

3) P2X₇ 受容体作動薬投与後に発現亢進する TNF- α と p38 MAPK のリン酸化

P2X₇ 受容体作動薬投与後に発現亢進する TNF- α が、p38 MAPK のリン酸化と関係しているのか否か検討した。p38 MAPK リン酸化阻害薬である SB203580 前投与群では、BzATP 投与群と比較し、mTNF- α および sTNF- α の発現が有意に減少していた (図 20)。

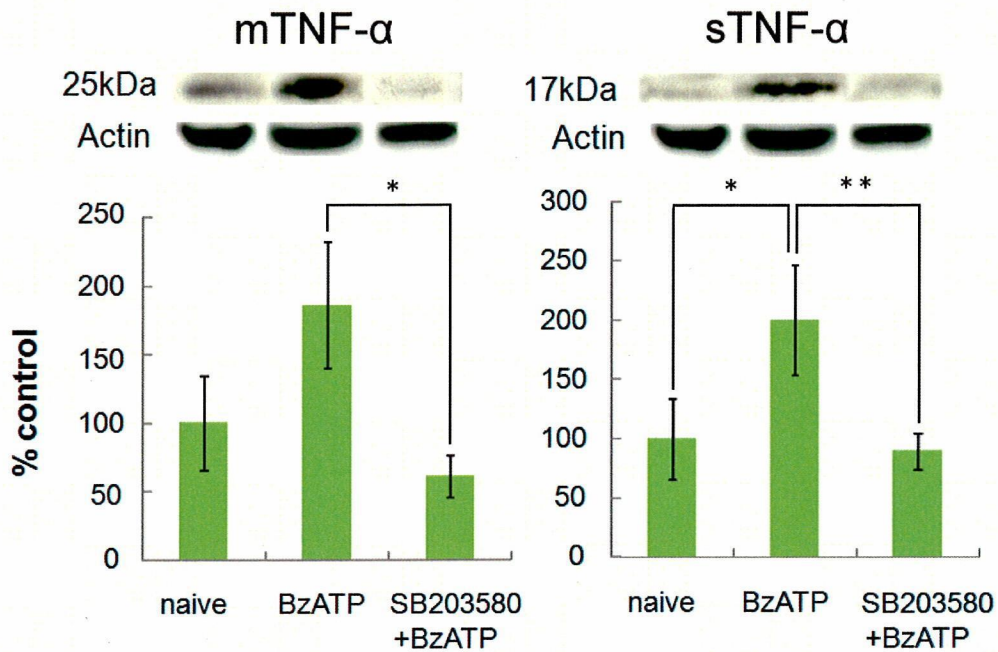


図 20 p38 MAPK リン酸化阻害薬前投与による BzATP 誘発性の TNF- α タンパクの発現変化

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, 各群 $n=5$

4) P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛と p38 MAPK のリン酸化について

P2X₇ 受容体作動薬投与後に発現する疼痛が、p38 MAPK のリン酸化と関係しているのか否かを、p38 MAPK リン酸化阻害薬を用いて検討した。SB203580 (10 ng)前投与群において、BZATP 単独投与群と比較し、投与後 5 分からの EF₅₀ 値の低下が有意に抑制された。さらに 10 分の 1 用量である SB203580 (1 ng)前投与群においても、EF₅₀ 値の緩やかな増加が認められた (図 21)。

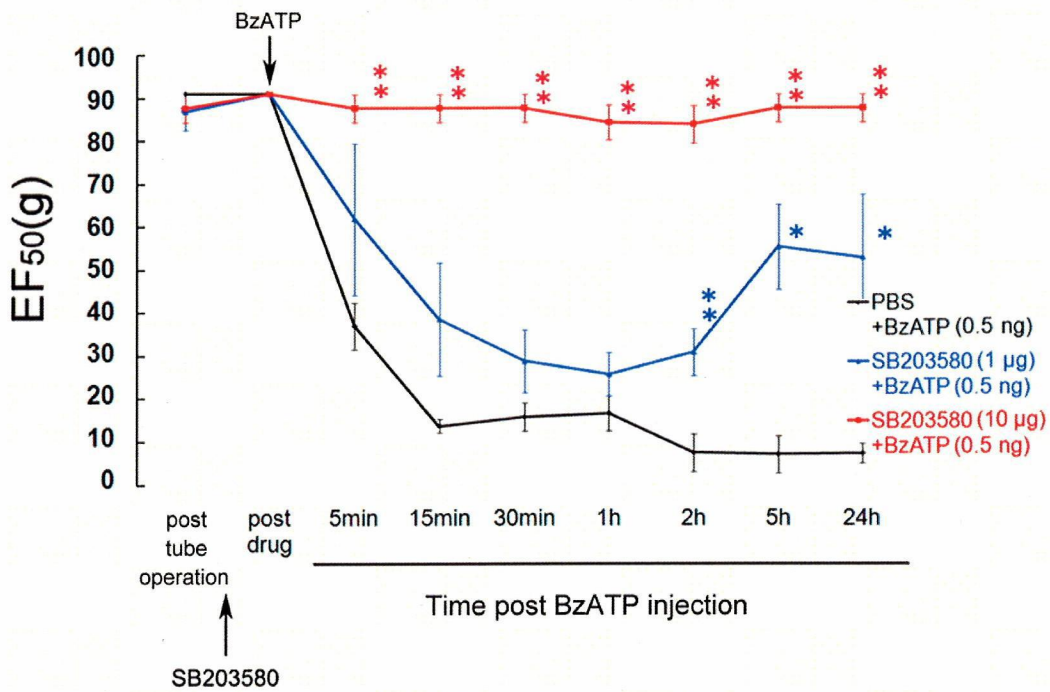


図 21 p38 MAPK リン酸化阻害薬前投与による BzATP 投与後の EF₅₀ 値の変化

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, BzATP 投与群との有意差あり 各群 n=5

9. P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛および TNF- α 発現に対する

TNF- α 受容体リコンビナント製剤の影響

1) P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛に対する TNF- α 受容体リコンビナント製剤の影響

P2X₇ 受容体作動薬投与後の疼痛に対し、TNF- α 受容体リコンビナント製剤である Etanercept が影響するのか否かを検討した。BzATP 投与後に確認された EF₅₀ 値の低下は、Etanercept 前投与により有意に抑制された（図 22）。

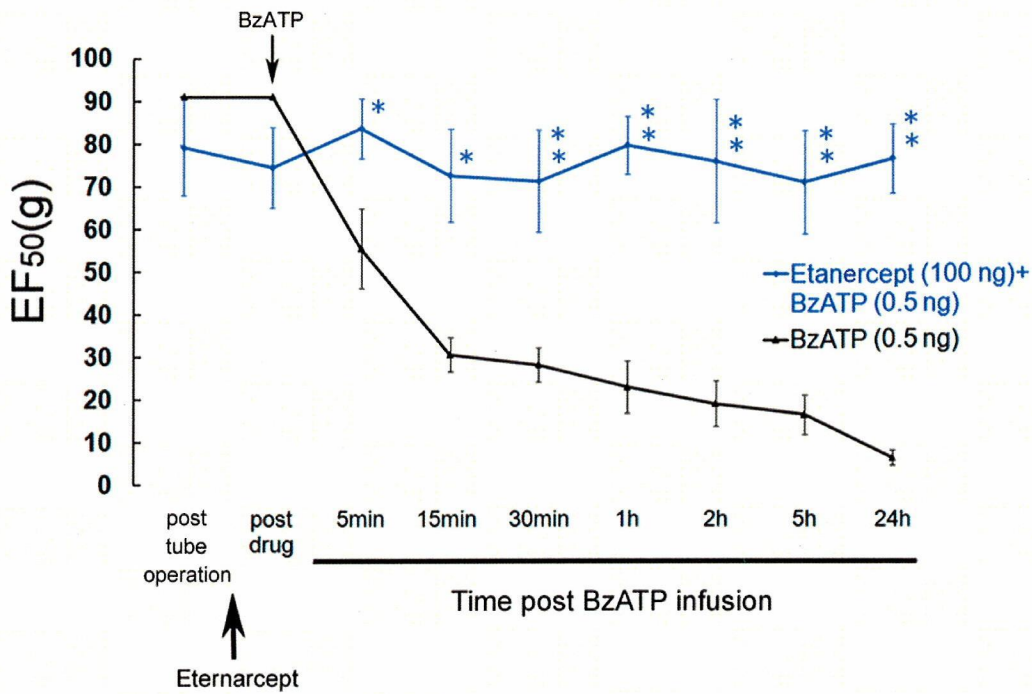


図 22 Etanercept 前投与による BzATP 投与後の EF₅₀ 値への影響

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, BzATP 投与群との有意差あり 各群 n=5

2) P2X₇ 受容体作動薬投与後に発現亢進する TNF- α に対する TNF- α リコンビナント製剤の影響

BzATP 投与後に発現亢進する TNF- α に対し、Etanercept がどのように影響するか検討した。Etanercept 前投与群において、BzATP 単独投与群と比較し、sTNF- α の発現が有意に低下した (図 23)。

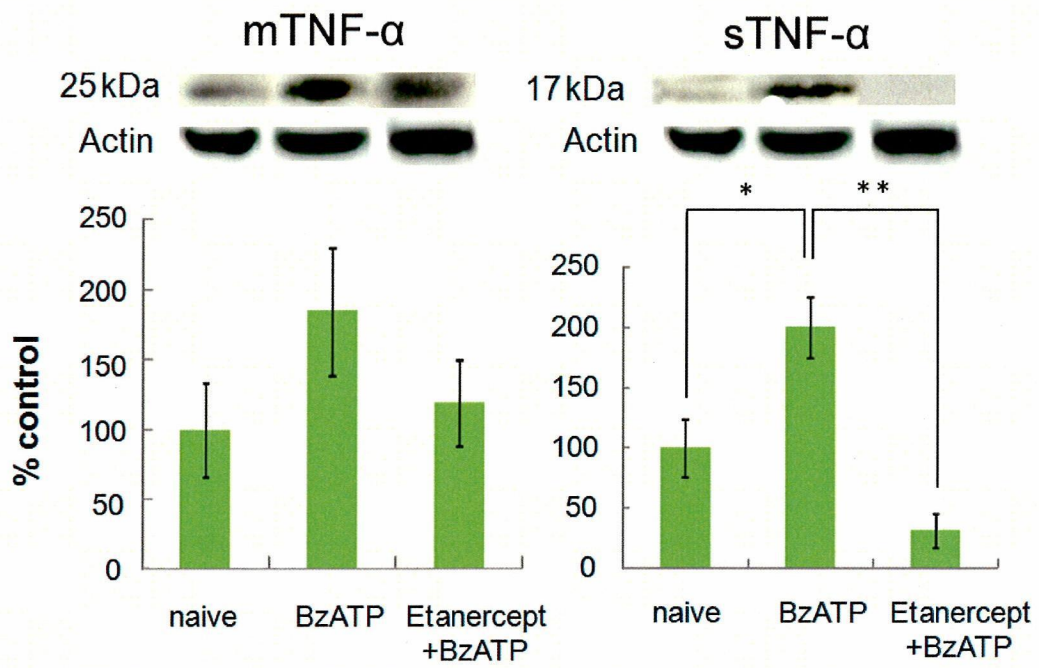


図 23 Etanercept 前投与による BzATP 誘発性の TNF- α タンパク発現の変化

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, 各群 $n=5$

考察

1. 神経因性疼痛モデルの有用性について

これまでの神経因性疼痛に関する研究の中で、口腔顎顔面領域を対象とした報告は比較的少ない。したがって、口腔顎顔面領域に特化した神経因性疼痛モデルを用いて、その発生機序を解明することは極めて重要と考えられる。

本研究では、眼窩下神経絞扼による神経傷害モデルを作製し、三叉神経第2枝の枝である眼窩下神経支配の whisker pad(平沢ら, 1992)について検討した。実験群患側の EF_{50} 値は、術後1日目から10日目まで低下し、術後14日目には回復していた。一方、対照群患側の EF_{50} 値は、術後1日目に、処置前と比較して低下していた。さらに、実験群患側と対照群患側の EF_{50} 値を比較すると、術後3、7日目において、実験群患側の方が低下していた。すなわち、実験群患側において、眼窩下神経絞扼後3、7日目で疼痛が発現したことになる。このように、神経傷害に起因する疼痛が発現したことから、本研究で作製したラット眼窩下神経絞扼モデルは口腔顎顔面領域を対象とした神経因性疼痛モデルとして有用であることが実証された。

一方、実験群健側の EF_{50} 値は、処置前および対照群健側と比較して、術後3日目で低下した。これは、左側眼窩下神経を絞扼したにも拘らず、健側である右側眼窩下神経にも痛覚が発現したことを示す。坐骨神経を片側傷害した場合、傷害側とともに健常側にも痛覚過敏が発現するという報告がある(Chacur et al., 2001; Milligan et al., 2001; Milligan et al., 2003; Spataro et al., 2004)。このような健常側にも痛覚過敏が発現する現象は、mirror image pain と呼ばれており

(Chacur et al., 2001; Milligan et al., 2001; Milligan et al., 2003; Spataro et al., 2004)、中枢感作が原因とされている。よって、本研究の眼窩下神経絞扼モデルにおける非傷害側での疼痛発現には、この mirror image pain が関係していると考えられる。

2. 眼窩下神経絞扼後の小膠細胞について

眼窩下神経絞扼後、三叉神経脊髄路核における活性化した小膠細胞の数は増加し、また陽性細胞は脊髄路核の浅層と深層に発現した。また、活性化した小膠細胞は細胞体が肥大化することが報告されているが(Colburn and DeLeo, 1999)、本研究においても同様に、眼窩下神経絞扼後に小膠細胞の細胞体は肥大化し、突起の伸展が認められた。さらに、本研究では眼窩下神経絞扼後の疼痛発現のピークである3日目のラットを免疫組織化学染色に用いたが、対照群と比較して小膠細胞が活性化し、その発現数が増加した。この結果は坐骨神経絞扼モデルにおいて脊髄後角に発現する小膠細胞が疼痛発現に関与するという報告と一致し(Detloff et al., 2008; Inoue et al., 2009; 津田ら, 2006)、末梢神経の絞扼によって三叉神経脊髄路核においても、脊髄後角と同様の反応が起こることが初めて明らかになった。

3. 眼窩下神経絞扼後の P2X₇ 受容体について

P2X₇ 受容体の免疫染色を行った結果、眼窩下神経絞扼後3日目に三叉神経脊髄路核での P2X₇ 受容体の発現が著しく亢進した。また、Western blot 解析による P2X₇ タンパクの経時的発現変化を検索したところ、眼窩下神経絞扼後3日目

にピークを迎え、 EF_{50} 値の経時的変化とよく一致していた。さらに、本研究では眼窩下神経絞扼後に誘発される疼痛が $P2X_7$ 受容体拮抗薬により抑制されることが確認された。この結果は $P2X_7$ 受容体ノックアウトマウスにおいて坐骨神経傷害による神経因性疼痛が発現しない(Chessell et al., 2005)、 $P2X_7$ 受容体特異的拮抗薬を髄膜下投与すると坐骨神経傷害後の神経因性疼痛が抑制される(Honore et al., 2006; McGaraughty et al., 2007)とした過去の報告と一致し、顎顔面領域においても $P2X_7$ 受容体が関係していることが初めて明らかになった。

4. 眼窩下神経絞扼後の小膠細胞と $P2X_7$ 受容体の関係性について

眼窩下神経絞扼後3日目に二重免疫染色を行った結果、三叉神経脊髓路核において小膠細胞に $P2X_7$ 受容体が著しく誘導されることが明らかとなった。一方、 $P2X_7$ 受容体は末梢神経傷害後、脊髄後根神経節の衛星細胞に発現亢進することが報告されている(Chen et al., 2008; Chessell et al., 2005)。末梢神経節には星状膠細胞や小膠細胞は発現せず、衛星細胞が末梢神経節細胞に随伴し、その支持・栄養などの機能を担っている。さらに、衛星細胞に発現する $P2X_7$ 受容体を賦活化すると慢性疼痛が抑制されること(Chen et al., 2008)から、発現する部位により、 $P2X_7$ 受容体の機能は異なることが推察される。

本研究は三叉神経脊髓路核のみを研究対象としており、三叉神経節における $P2X_7$ 受容体の発現は検討していない。しかし、眼窩下神経絞扼によって三叉神経節の衛星細胞も $P2X_7$ 受容体を発現し、慢性疼痛に衛星細胞が関係している可能性がある。このため、神経因性疼痛発生における衛星細胞の関与については、今後さらなる検討が必要である。

5. 眼窩下神経絞扼後の TNF- α 発現と P2X₇ 受容体の関係について

TNF- α は、分子量 25 kDa の前駆体タンパク質である膜結合型 TNF- α (mTNF- α)として産生される。次いで、TNF- α 変換酵素 (TACE)により細胞外に存在するカルボキシル基側末端ドメインが切断されて 17 kDa の可溶性 TNF- α (sTNF- α)タンパク質 (157 アミノ酸残基) となり、細胞間隙に放出されて機能を発揮すると考えられている(Mullberg et al., 2000)。また、mTNF- α は、培養小膠細胞に LPS あるいは ATP の添加により発現することが報告されている(Hide, 2003; Suzuki et al., 2004; Wood, 1994)。

本研究では、mTNF- α および sTNF- α の両者と反応する抗 TNF- α 抗体を用いて三叉神経脊髄路核の免疫組織化学染色を試みたが、特異的な反応は認められなかった。しかし、Western blot 解析を行った結果、眼窩下神経絞扼後に mTNF- α および sTNF- α の発現亢進が確認された。すなわち眼窩下神経絞扼後、活性化した小膠細胞において mTNF- α の発現が亢進し、この結果 sTNF- α の発現量も増加したと推察される。これまでの慢性疼痛の研究により、中枢神経系における TNF- α タンパクの発現亢進が報告されているものの、mTNF- α についての検索のみで(Peng et al., 2006; Xu et al., 2007)、sTNF- α は検索されていない。また、末梢神経傷害後、TNF- α 受容体リコンビナント製剤である Etanercept を髄腔内投与すると慢性疼痛が抑制された(Schafers et al., 2003b; Sommer et al., 2001; Svensson et al., 2005)ことから、神経絞扼後に三叉神経脊髄路核において発現亢進した TNF- α が、疼痛閾値の低下に関与していることは明白であり、特に mTNF- α から形成された sTNF- α が重要である可能性が示唆された。

慢性疼痛発現時に小膠細胞を活性化し、TNF- α を誘導する分子にはいくつか候補が挙げられている。例えば、種々の病原体を感知して自然免疫 (獲得免疫

と異なり一般の病原体を排除する非特異的な免疫作用) を作動させる受容体である Toll-like receptor (TLR) は、星状膠細胞および小膠細胞に発現することが知られている(Carpentier et al., 2008; Olson and Miller, 2004)。この TLR の拮抗薬投与または siRNA を用いた TLR4 のノックダウンにより慢性疼痛が抑制され、TNF- α の発現が抑制されることが報告されている(Obata et al., 2008a; Wu et al., 2010)。また、神経傷害により活性化した小膠細胞に P2X₄ 及び P2Y 受容体が高濃度に発現し、P2X₄ 及び P2Y 受容体ノックアウトマウスでは神経因性疼痛が著しく抑制される(Tozaki-Saitoh et al., 2008; Tsuda et al., 2003) ことから、神経因性疼痛に対する P2X₄ 及び P2Y 受容体の関与が示唆されている。さらに、培養小膠細胞に ATP を添加すると TNF- α が発現亢進することが報告されている(Hide et al., 2000)。したがって、小膠細胞に発現し慢性疼痛発生時に TNF- α の産生に関与すると考えられる受容体は P2X₇ 受容体以外にも存在する。そこで本実験では、P2X₇ 受容体作動薬を用いて P2X₇ 受容体を単独で賦活化し、慢性疼痛と TNF- α の発現が惹起されるか否かを検討した。P2X₇ 受容体の作動薬は ATP など多数知られているが、そのうち BzATP は最も親和性が高いことが知られている(Fields and Burnstock, 2006; Surprenant et al., 1996)。このため、本研究では P2X₇ 受容体作動薬として BzATP を用いた。BzATP 髄膜下投与後、whisker pad において投与後 21 日まで疼痛が発現した。しかし、BzATP はその特異性を疑う報告もある(Bianchi et al., 1999; Teixeira et al., 2010)ことから、P2X₇ 受容体の特異的拮抗薬である A438079 および抗 P2X₇ 受容体抗体を前投与することで、BzATP 投与後の疼痛発現に P2X₇ 受容体が関与しているか否かを検討した。その結果、BzATP によって誘発される慢性疼痛は、A438079 および抗 P2X₇ 受容体抗体によって抑制され、さらに sTNF- α の発現亢進も抑制された。したがって、

BzATP が P2X₇ 受容体を賦活化し、sTNF- α を発現亢進することで慢性疼痛を誘発したと考えられる。

一方、ATP を脊髄腔内投与すると慢性疼痛を惹起すると報告されている (Nakagawa et al., 2007; Nakagawa et al., 2008)。しかし、ATP は P2X₇ 受容体のみならず、疼痛発現に関与するとされる P2X_s と P2Y_s 受容体の作動薬でもあることから、疼痛発現における P2X₇ 受容体の関与は不明であった。本研究において、P2X₇ 受容体の活性化により疼痛が惹起されることが初めて明らかにされた。

TNF- α 受容体 (TNFR) には2つのタイプがあり、それぞれ TNFR1 (p55) および TNFR2 (p75) と呼ばれている。このうち、TNFR2 は脊髄後角のニューロンに発現して慢性疼痛に関与していると考えられている。Etanercept は、両受容体のうち、p75 のリコンビナント製剤であり、慢性関節リウマチ患者に皮下注射すると関節痛や関節腫脹が減少することや (Moreland et al., 1997)、扁平上皮癌患者に皮下注射するとその進行が遅延したことが報告されている (Smith and Skelton, 2001)。BzATP 誘発性疼痛は Etanercept の前投与により抑制され、mTNF- α の発現亢進は抑制されなかったものの、sTNF- α の発現亢進は抑制された。すなわち、BzATP の作用により細胞間隙に放出された sTNF- α は、Etanercept と結合することによりその活性を失い、BzATP 誘発性疼痛が抑制されたと考えられる。この結果から、前述したように BzATP が P2X₇ 受容体を賦活化し、sTNF- α を発現亢進することで慢性疼痛を誘発することが示唆される。

P2X₇ 受容体は他の ATP 受容体と比較して、ATP に対する親和性が低いことが知られている (Gudipaty et al., 2001)。また、小膠細胞に存在し慢性疼痛発生時に TNF- α の産生に関与すると考えられる受容体は、P2X₇ 受容体以外にも、TLR3、TLR4、P2X₄ 及び P2Y 受容体などがある。しかし、本実験では P2X₇ 受容体拮

抗薬の術前投与によって神経絞扼後に発現亢進する mTNF- α および sTNF- α は著しく抑制された。したがって、眼窩下神経絞扼後に神経膠細胞やシナプス終末から ATP が放出されるが、P2X₇ 受容体はその拮抗薬によって活性が阻害されたため mTNF- α の産生が亢進せず、この結果 sTNF- α の発現量も増加しなかったと考えられる。すなわち、神経絞扼後の P2X₇ 受容体の活性化を介した TNF- α の発現亢進が慢性疼痛の発現に関与していることが実証された。

6. TNF- α 産生に関する細胞内情報伝達経路について

末梢神経傷害後、脊髄後角の小膠細胞において p38 MAPK のリン酸化が亢進し、p38 MAPK リン酸化阻害薬を投与すると神経因性疼痛が抑制された(Inoue et al., 2003; Jin et al., 2003; Milligan et al., 2003; Tsuda et al., 2004)ことから、p38 MAPK は疼痛発現および維持に関与していると考えられてきた。さらに培養小膠細胞において、p38 MAPK リン酸化阻害薬により ATP 誘発性の TNF- α の発現が低下する(Suzuki et al., 2004)ことや、BzATP および ATP による P2X₇ 受容体賦活化後に p38 MAPK/ERK 経路が活性化し、TNF- α の発現が亢進すること(Hide et al., 2000; Inoue et al., 2003)が知られており、p38 MAPK は TNF- α 産生において重要な細胞内情報伝達経路の一つである。本研究では、免疫染色を用いて眼窩下神経絞扼後の三叉神経脊髄路核において p38 MAPK リン酸化が亢進するか否かを検討した結果、非傷害側と比較して p38 MAPK のリン酸化が亢進した。さらに神経絞扼後に認められた mTNF- α の発現亢進と神経因性疼痛は、p38 MAPK リン酸化阻害薬の投与により抑制された。すなわち神経絞扼後に三叉神経脊髄路核において確認された p38 MAPK のリン酸化は、TNF- α の発現亢進と疼痛発現に関係していることは明らかである。

一方、TLR3 アンチセンスオリゴヌクレオチドを投与すると、末梢神経傷害後に脊髄後角に惹起される p38 MAPK のリン酸化が抑制されることや(Obata et al., 2008b)、CX3CR1 ノックアウトマウスで末梢神経傷害によるリン酸化 p38 MAPK の発現亢進が認められないこと(Staniland et al., 2010)から、p38 MAPK のリン酸化に関係すると考えられる受容体は P2X₇ 受容体以外にも存在する。そこで、本研究では BzATP 髄膜下投与後に p38 MAPK のリン酸化を Western blot 解析にて検討した。その結果、p38 MAPK のリン酸化は亢進し、その亢進は p38 MAPK リン酸化阻害薬の前投与により抑制された。さらに BzATP 誘発性の sTNF- α の発現亢進は、p38 MAPK リン酸化阻害薬の前投与により抑制された。

したがって、p38 MAPK が神経絞扼後の疼痛発現に重要な細胞内伝達経路であるとともに、P2X₇ 受容体の活性化後、p38 MAPK のリン酸化を介して sTNF- α が放出され疼痛を惹起していることが示された。

総括

本研究では、三叉神経脊髄路核小膠細胞に発現する P2X₇ 受容体に着目して、顎顔面領域における神経因性慢性疼痛の発現機序を明らかにすることを目的とした。その結果、以下の所見が得られた。

- 1) 眼窩下神経絞扼後に三叉神経脊髄路核において活性化した小膠細胞に P2X₇ 受容体が発現した。
- 2) 眼窩下神経絞扼後に誘発される神経因性疼痛は、P2X₇ 受容体、p38 MAPK のリン酸化を阻害することで抑制された。
- 3) 眼窩下神経絞扼後に mTNF- α および sTNF- α は発現亢進し、その発現亢進は P2X₇ 受容体、p38 MAPK のリン酸化を阻害することで抑制された。
- 4) P2X₇ 受容体の賦活化により慢性疼痛が発現し、この慢性疼痛は P2X₇ 受容体、p38 MAPK のリン酸化を阻害することで抑制された。
- 5) P2X₇ 受容体の賦活化後に sTNF- α は発現亢進し、その発現亢進は P2X₇ 受容体、p38 MAPK のリン酸化を阻害することで抑制された。

以上の結果より、三叉神経脊髄路核において、小膠細胞に発現する P2X₇ 受容体に ATP などのリガンドが結合することにより p38 MAPK がリン酸化し、mTNF- α の産生を亢進させ、その結果起こる mTNF- α から形成された sTNF- α の放出量の増加が顎顔面領域における神経因性疼痛に関与していることが明らかとなった。

参考文献

Bennett GJ, Xie YK (1988). A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33(1):87-107.

Bianchi BR, Lynch KJ, Touma E, Niforatos W, Burgard EC, Alexander KM, et al. (1999). Pharmacological characterization of recombinant human and rat P2X receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* 376(1-2):127-38.

Carpentier PA, Duncan DS, Miller SD (2008). Glial toll-like receptor signaling in central nervous system infection and autoimmunity. *Brain Behav Immun* 22(2):140-7.

Chacur M, Milligan ED, Gazda LS, Armstrong C, Wang H, Tracey KJ, et al. (2001). A new model of sciatic inflammatory neuritis (SIN): induction of unilateral and bilateral mechanical allodynia following acute unilateral peri-sciatic immune activation in rats. *Pain* 94(3):231-44.

Chen Y, Zhang X, Wang C, Li G, Gu Y, Huang LY (2008). Activation of P2X7 receptors in glial satellite cells reduces pain through downregulation of P2X3 receptors in nociceptive neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(43):16773-8.

Chessell IP, Hatcher JP, Bountra C, Michel AD, Hughes JP, Green P, et al. (2005). Disruption of the P2X7 purinoceptor gene abolishes chronic inflammatory and neuropathic pain. *Pain* 114(3):386-96.

Clark AK, D'Aquisto F, Gentry C, Marchand F, McMahon SB, Malcangio M (2006). Rapid co-release of interleukin 1beta and caspase 1 in spinal cord inflammation. *J Neurochem* 99(3):868-80.

Colburn RW, DeLeo JA (1999). The effect of perineural colchicine on nerve injury-induced spinal glial activation and neuropathic pain behavior. *Brain Res Bull* 49(6):419-27.

Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. (2005). BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature* 438(7070):1017-21.

Dai Y, Iwata K, Kondo E, Morimoto T, Noguchi K (2001). A selective increase in Fos expression in spinal dorsal horn neurons following graded thermal stimulation in rats with experimental mononeuropathy. *Pain* 90(3):287-96.

Detloff MR, Fisher LC, McGaughy V, Longbrake EE, Popovich PG, Basso DM (2008). Remote activation of microglia and pro-inflammatory cytokines predict the onset and severity of below-level neuropathic pain after spinal cord injury in rats. *Exp Neurol* 212(2):337-47.

Fields RD, Burnstock G (2006). Purinergic signalling in neuron-glia interactions. *Nat Rev Neurosci* 7(6):423-36.

Garrison CJ, Dougherty PM, Carlton SM (1994). GFAP expression in lumbar spinal cord of naive and neuropathic rats treated with MK-801. *Exp Neurol* 129(2):237-43.

Gudipaty L, Humphreys BD, Buell G, Dubyak GR (2001). Regulation of P2X(7) nucleotide receptor function in human monocytes by extracellular ions and receptor density. *Am J Physiol Cell Physiol* 280(4):C943-53.

Guo W, Zou S, Guan Y, Ikeda T, Tal M, Dubner R, et al. (2002). Tyrosine phosphorylation of the NR2B subunit of the NMDA receptor in the spinal cord during the development and maintenance of inflammatory hyperalgesia. *J Neurosci* 22(14):6208-17.

Guo W, Wang H, Watanabe M, Shimizu K, Zou S, LaGraize SC, et al. (2007). Glial-cytokine-neuronal interactions underlying the mechanisms of persistent pain. *J Neurosci* 27(22):6006-18.

Hide I, Tanaka M, Inoue A, Nakajima K, Kohsaka S, Inoue K, et al. (2000). Extracellular ATP triggers tumor necrosis factor-alpha release from rat microglia. *J Neurochem* 75(3):965-72.

Hide I (2003). [Mechanism of production and release of tumor necrosis factor implicated in inflammatory diseases]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 121(3):163-73.

Honore P, Donnelly-Roberts D, Namovic MT, Hsieh G, Zhu CZ, Mikusa JP, et al. (2006). A-740003 [N-(1-[(cyanoimino)(5-quinolinylamino)methyl]amino)-2,2-dimethylpropyl)-2-(3,4-dimethoxyphenyl)acetamide], a novel and selective P2X7 receptor antagonist, dose-dependently reduces neuropathic pain in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 319(3):1376-85.

Inoue K, Koizumi S, Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y (2003). Signaling of ATP receptors in glia-neuron interaction and pain. *Life Sci* 74(2-3):189-97.

Inoue K, Koizumi S, Tsuda M (2007). The role of nucleotides in the neuron--glia communication responsible for the brain functions. *J Neurochem* 102(5):1447-58.

Inoue K, Tsuda M (2009). Microglia and neuropathic pain. *Glia* 57(14):1469-79.

Jin SX, Zhuang ZY, Woolf CJ, Ji RR (2003). p38 mitogen-activated protein kinase is activated after a spinal nerve ligation in spinal cord microglia and dorsal root ganglion neurons and contributes to the generation of neuropathic pain. *J Neurosci* 23(10):4017-22.

Kim D, Kim MA, Cho IH, Kim MS, Lee S, Jo EK, et al. (2007). A critical role of toll-like receptor 2 in nerve injury-induced spinal cord glial cell activation and pain hypersensitivity. *J Biol Chem* 282(20):14975-83.

Kobayashi K, Yamanaka H, Fukuoka T, Dai Y, Obata K, Noguchi K (2008). P2Y12 receptor upregulation in activated microglia is a gateway of p38 signaling and neuropathic pain. *J Neurosci* 28(11):2892-902.

Koyess E, Fares M (2006). Referred pain: a confusing case of differential diagnosis between two teeth presenting with endo-perio problems. *Int Endod J* 39(9):724-9.

Marchand F, Perretti M, McMahon SB (2005). Role of the immune system in chronic pain. *Nat Rev Neurosci* 6(7):521-32.

McGaraughty S, Chu KL, Namovic MT, Donnelly-Roberts DL, Harris RR, Zhang XF, et al. (2007). P2X7-related modulation of pathological nociception in rats. *Neuroscience* 146(4):1817-28.

Meller ST, Dykstra C, Grzybycki D, Murphy S, Gebhart GF (1994). The possible role of glia in nociceptive processing and hyperalgesia in the spinal cord of the rat. *Neuropharmacology* 33(11):1471-8.

Milligan ED, Mehmert KK, Hinde JL, Harvey LO, Martin D, Tracey KJ, et al. (2000). Thermal hyperalgesia and mechanical allodynia produced by intrathecal administration of the human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) envelope glycoprotein, gp120. *Brain Res* 861(1):105-16.

Milligan ED, O'Connor KA, Nguyen KT, Armstrong CB, Twining C, Gaykema RP, et al. (2001). Intrathecal HIV-1 envelope glycoprotein gp120 induces enhanced pain states mediated by spinal cord proinflammatory cytokines. *J Neurosci* 21(8):2808-19.

Milligan ED, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, et al. (2003). Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats. *J Neurosci* 23(3):1026-40.

Moreland LW, Baumgartner SW, Schiff MH, Tindall EA, Fleischmann RM, Weaver AL, et al. (1997). Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* 337(3):141-7.

Mullberg J, Althoff K, Jostock T, Rose-John S (2000). The importance of shedding of membrane proteins for cytokine biology. *Eur Cytokine Netw* 11(1):27-38.

Nakagawa T, Wakamatsu K, Zhang N, Maeda S, Minami M, Satoh M, et al. (2007). Intrathecal administration of ATP produces long-lasting allodynia in rats:

differential mechanisms in the phase of the induction and maintenance. *Neuroscience* 147(2):445-55.

Nakagawa T, Wakamatsu K, Maeda S, Shirakawa H, Kaneko S (2008). Differential contribution of spinal mitogen-activated protein kinases to the phase of long-lasting allodynia evoked by intrathecal administration of ATP in rats. *Biol Pharm Bull* 31(6):1164-8.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. (2008a). Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem*.

Obata K, Katsura H, Miyoshi K, Kondo T, Yamanaka H, Kobayashi K, et al. (2008b). Toll-like receptor 3 contributes to spinal glial activation and tactile allodynia after nerve injury. *J Neurochem* 105(6):2249-59.

Olson JK, Miller SD (2004). Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173(6):3916-24.

Peng XM, Zhou ZG, Glorioso JC, Fink DJ, Mata M (2006). Tumor necrosis factor-alpha contributes to below-level neuropathic pain after spinal cord injury. *Ann Neurol* 59(5):843-51.

Piao ZG, Cho IH, Park CK, Hong JP, Choi SY, Lee SJ, et al. (2006). Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121(3):219-31.

Qin M, Wang JJ, Cao R, Zhang H, Duan L, Gao B, et al. (2006). The lumbar spinal cord glial cells actively modulate subcutaneous formalin induced hyperalgesia in the rat. *Neurosci Res* 55(4):442-50.

Ren K, Dubner R (2008). Neuron-glia crosstalk gets serious: role in pain hypersensitivity. *Curr Opin Anaesthesiol* 21(5):570-9.

Schafers M, Lee DH, Brors D, Yaksh TL, Sorkin LS (2003a). Increased sensitivity of injured and adjacent uninjured rat primary sensory neurons to

exogenous tumor necrosis factor-alpha after spinal nerve ligation. *J Neurosci* 23(7):3028-38.

Schafers M, Svensson CI, Sommer C, Sorkin LS (2003b). Tumor necrosis factor-alpha induces mechanical allodynia after spinal nerve ligation by activation of p38 MAPK in primary sensory neurons. *J Neurosci* 23(7):2517-21.

Shiratori M, Tozaki-Saitoh H, Yoshitake M, Tsuda M, Inoue K (2010). P2X7 receptor activation induces CXCL2 production in microglia through NFAT and PKC/MAPK pathways. *J Neurochem* 114(3):810-9.

Smith KJ, Skelton HG (2001). Rapid onset of cutaneous squamous cell carcinoma in patients with rheumatoid arthritis after starting tumor necrosis factor alpha receptor IgG1-Fc fusion complex therapy. *J Am Acad Dermatol* 45(6):953-6.

Sommer C, Schmidt C, George A (1998). Hyperalgesia in experimental neuropathy is dependent on the TNF receptor 1. *Experimental Neurology* 151(1):138-42.

Sommer C, Lindenlaub T, Teuteberg P, Schafers M, Hartung T, Toyka KV (2001). Anti-TNF-neutralizing antibodies reduce pain-related behavior in two different mouse models of painful mononeuropathy. *Brain Res* 913(1):86-9.

Spataro LE, Sloane EM, Milligan ED, Wieseler-Frank J, Schoeniger D, Jekich BM, et al. (2004). Spinal gap junctions: potential involvement in pain facilitation. *J Pain* 5(7):392-405.

Staniland AA, Clark AK, Wodarski R, Sasso O, Maione F, D'Acquisto F, et al. (2010). Reduced inflammatory and neuropathic pain and decreased spinal microglial response in fractalkine receptor (CX3CR1) knockout mice. *J Neurochem* 114(4):1143-57.

Strassman AM, Vos BP (1993). Somatotopic and laminar organization of fos-like immunoreactivity in the medullary and upper cervical dorsal horn induced by noxious facial stimulation in the rat. *J Comp Neurol* 331(4):495-516.

- Strassman AM, Vos BP, Mineta Y, Naderi S, Borsook D, Burstein R (1993). Fos-like immunoreactivity in the superficial medullary dorsal horn induced by noxious and innocuous thermal stimulation of facial skin in the rat. *J Neurophysiol* 70(5):1811-21.
- Surprenant A, Rassendren F, Kawashima E, North RA, Buell G (1996). The cytolytic P2Z receptor for extracellular ATP identified as a P2X receptor (P2X7). *Science* 272(5262):735-8.
- Suzuki T, Hide I, Ido K, Kohsaka S, Inoue K, Nakata Y (2004). Production and release of neuroprotective tumor necrosis factor by P2X7 receptor-activated microglia. *J Neurosci* 24(1):1-7.
- Svensson CI, Schafers M, Jones TL, Powell H, Sorkin LS (2005). Spinal blockade of TNF blocks spinal nerve ligation-induced increases in spinal P-p38. *Neurosci Lett* 379(3):209-13.
- Sweet WH (1984). Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb, and herpes zoster. *Neurosurgery* 15(6):928-32.
- Takahashi K, Watanabe M, Suekawa Y, Ito G, Inubushi T, Hirose N, et al. (2010). IL-1beta in the trigeminal subnucleus caudalis contributes to extra-territorial allodynia/hyperalgesia following a trigeminal nerve injury. *Eur J Pain* Article in Press(
- Takenouchi T, Sugama S, Iwamaru Y, Hashimoto M, Kitani H (2009). Modulation of the ATP-Induced release and processing of IL-1beta in microglial cells. *Crit Rev Immunol* 29(4):335-45.
- Teixeira JM, Oliveira MC, Nociti FH, Jr., Clemente-Napimoga JT, Pelegrini-da-Silva A, Parada CA, et al. (2010). Involvement of temporomandibular joint P2X3 and P2X2/3 receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol* 645(1-3):79-85.

Tozaki-Saitoh H, Tsuda M, Miyata H, Ueda K, Kohsaka S, Inoue K (2008). P2Y12 receptors in spinal microglia are required for neuropathic pain after peripheral nerve injury. *J Neurosci* 28(19):4949-56.

Tsuda M, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Mizokoshi A, Kohsaka S, Salter MW, et al. (2003). P2X4 receptors induced in spinal microglia gate tactile allodynia after nerve injury. *Nature* 424(6950):778-83.

Tsuda M, Mizokoshi A, Shigemoto-Mogami Y, Koizumi S, Inoue K (2004). Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal hyperactive microglia contributes to pain hypersensitivity following peripheral nerve injury. *Glia* 45(1):89-95.

Vallejo R, Tilley DM, Vogel L, Benyamin R (2010). The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. *Pain Pract* 10(3):167-84.

Watanabe M, Tanaka E, Suemune S, Satoda T, Maeda N, Uchida T, et al. (2003). Expression of c-Fos protein in the trigeminal nuclear complex resulting from quantified force application to the rat molar. *J Oral Rehabil* 30(11):1128-37.

Watkins LR, Hutchinson MR, Milligan ED, Maier SF (2007). "Listening" and "talking" to neurons: implications of immune activation for pain control and increasing the efficacy of opioids. *Brain Res Rev* 56(1):148-69.

Werry EL, Liu GJ, Bennett MR (2006). Glutamate-stimulated ATP release from spinal cord astrocytes is potentiated by substance P. *J Neurochem* 99(3):924-36.

Wood PL (1994). Differential regulation of IL-1 alpha and TNF alpha release from immortalized murine microglia (BV-2). *Life Sci* 55(9):661-8.

Wu FX, Bian JJ, Miao XR, Huang SD, Xu XW, Gong DJ, et al. (2010). Intrathecal siRNA against Toll-like receptor 4 reduces nociception in a rat model of neuropathic pain. *Int J Med Sci* 7(5):251-9.

Xu L, Huang Y, Yu X, Yue J, Yang N, Zuo P (2007). The influence of p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor on synthesis of inflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha in spinal cord of rats with chronic constriction injury. *Anesth Analg* 105(6):1838-44, table of contents.

Ying B, Lu N, Zhang YQ, Zhao ZQ (2006). Involvement of spinal glia in tetanically sciatic stimulation-induced bilateral mechanical allodynia in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 340(4):1264-72.

Zimmermann M (1983). Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16(2):109-10.

Zhao P, Waxman SG, Hains BC (2007). Extracellular signal-regulated kinase-regulated microglia-neuron signaling by prostaglandin E2 contributes to pain after spinal cord injury. *J Neurosci* 27(9):2357-68.

井上和秀 (2008a). 痛みの病態生理学 最近の知見から 痛みとグリアの働き. *理学療法* 25(6):959-966.

井上和秀 (2008b). ミクログリアと神経因性疼痛 エコファーマへの挑戦. *福岡医学雑誌* 99(12):239-245.

津田誠, 井上和秀 (2006). 脊髄ミクログリア細胞の痛みへの役割. *Pain Research*, pp. 1-4.

津田誠 井 (2007). 神経因性疼痛と脊髄ミクログリアの Atp 受容体. *BRAIN and NERVE: 神経研究の進歩* 59(9):953-959.

福田謙一, 笠原正貴, 一戸達也, 金子譲 (2003). 痛みのメカニズムとその対応 口腔顔面痛の実態と歯科臨床における問題点. *歯界展望* 101(6):1303-1309.

平沢 興, 岡本道雄 (1992). 分担解剖学 2. 金原出版株式会社 第 11 版 (402-404).

別部智司 (2001). 【難治性疼痛】 歯科における難治性疼痛. *痛みと臨床* 1(3):279-287.

謝辞

本研究に際して、終始ご懇篤なるご指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）丹根一夫教授に心から感謝の意を表します。

また、本論文の作成にあたり、ご教示、御校閲を賜りました医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態制御医科学講座（歯科麻酔学）入船正浩教授、医歯薬学総合研究科展開医科学専攻病態制御医科学講座（口腔成長・発達生物学）前田憲彦教授、医歯薬学総合研究科創生医科学専攻病態探究医科学講座（歯科薬理学）森田克也准教授に深甚なる謝意を表します。

さらに、本研究の遂行及び論文作成にあたり、多大なご指導、ご協力をいただきました探索医科学講座（口腔細胞生物学）渡邊峰朗助教、ならびに顎口腔頸部医科学講座（歯科矯正学）の教室員各位に深謝いたします。

最後に、勉学、研究の機会を与えるとともに、常に私を支えてくれた家族と友人に心から感謝いたします。