

下歯槽神経切断モデルラットにおける  
三叉神経節非損傷神経の遺伝子発現動態解析  
— 感覚異常発生との関連 —

時崎 匡史<sup>1</sup>, 奥村 雅代<sup>1</sup>, 大木 絵美<sup>1</sup>, 岡藤 範正<sup>2</sup>, 栗原 三郎<sup>1</sup>,  
山田 一尋<sup>2,3</sup>, 宇都野 創<sup>4</sup>, 田所 治<sup>4</sup>, 金銅 英二<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 顎口腔機能制御学講座

<sup>2</sup>松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座

<sup>3</sup>松本歯科大学 歯科矯正学講座

<sup>4</sup>松本歯科大学 口腔解剖学第一講座

Analyses of gene expressions in uninjured trigeminal neurons  
after inferior alveolar nerve transection in rats

TADASHI TOKIZAKI<sup>1</sup>, MASAYO OKUMURA<sup>1</sup>, EMI OKI<sup>1</sup>, NORIMASA OKAFUJI<sup>2</sup>,  
SABURO KURIHARA<sup>1</sup>, KAZUHIRO YAMADA<sup>2,3</sup>, HAJIME UTSUNO<sup>4</sup>,  
OSAMU TADOKORO<sup>4</sup> and EIJI KONDO<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>*Department of Oral and Maxillofacial Biology, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

<sup>2</sup>*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University*

<sup>3</sup>*Department of Orthodontics, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

<sup>4</sup>*Department of Oral Anatomy I, School of Dentistry, Matsumoto Dental University*

### Summary

Allodynia can be induced by transection of the inferior alveolar nerve (IAN). However, even though the transected IAN is a component of the mandibular nerve in the trigeminal ganglion (TG), allodynia develops in the whisker pads, which are innervated by the uninjured infraorbital nerve (ION), a component of the maxillary nerve in the TG. Our microarray analyses have found that many gene expression levels not only in the injured IAN cell bodies, but also in the uninjured neurons were changed by IAN transection. To demonstrate the relationship between gene expression changes in ION neurons and allodynia, we investigated the expression of 22 genes that were up-regulated in the TG ION area containing ION cell bodies in IAN-transected rats. Real-time PCR, in situ hybridization and

quantitative PCR analyses indicated that the myelin basic protein (MBP) mRNA was localized to the trigeminal ganglion neurons and that the expression was significantly up-regulated in the ION area of TG after IAN transection. This finding suggests that MBP or myelin sheath in the uninjured neuron plays a role in allodynia onset following nerve injury.

## 緒 言

生体にとっての痛みとは、危険因子を回避するための警告シグナルとして重要なものであるが、痛みの伝導経路の活動は様々な要因によって著しく抑制もしくは促進される。異常に促進された疼痛伝達経路は、ときに病変を伴わない持続的な痛みを惹起することもあり、慢性疼痛と呼ばれる。この痛みは、危険因子に対する警告としては意味をなさないばかりか日常の行動をも阻害する有害なものであることが多い。慢性疼痛の原因は、炎症性、神経因性、心因性などいくつも挙げられているが、口腔内においては抜歯、抜髄や歯肉切除といった末梢組織に損傷を与える行為を伴うことが多い。歯科治療においては、神経損傷によって生じる神経因性疼痛は特に問題視される<sup>1-4)</sup>。

末梢神経線維の一部を損傷することで広範囲にわたる感覚過敏や痛覚過敏が生じる、という神経因性疼痛の特徴は動物モデルでもよく再現されており、発症メカニズムの解明と治療法開発のために、神経圧迫、神経絞扼、神経損傷薬投与、神経切断などを用いて様々なモデルラットが確立されている<sup>5-9)</sup>。これらのラットでは処置後すぐに疼痛刺激からの逃避閾値の低下が始まり、これが慢性疼痛同様に損傷治癒後も長期にわたり持続することが知られている<sup>1,10-14)</sup>。またそれに伴い炎症性物質の分泌、神経細胞の過興奮、グリア細胞の活性化等さまざまな現象が起きることが確認されており<sup>1)</sup>、神経細胞における遺伝子発現の変動もそのひとつである<sup>15,16)</sup>。

神経切断による神経因性疼痛モデルラットの多くは、坐骨神経と腰部後根神経節を用いたもので、これまでに後根神経節内神経細胞における多くの遺伝子発現変動がアロディニア発症に関連があると報告されてきた<sup>5-16)</sup>。しかし、坐骨神経周辺は神経叢を形成しているため、損傷神経の細胞体と非損傷神経の細胞体、損傷神経の支配領域と非損傷神経の支配領域が明確に分離できないという難点がある。これに対し、三叉神経の場合は、

ラット脳底部の三叉神経節は末梢側で第1・2枝と第3枝が分岐しており、この分岐部から中枢方向に向かいピンセット等を用いて、鈍的に第1・2枝と第3枝の領域を容易に分離することができる<sup>17)</sup>。この三叉神経系での神経因性疼痛モデルラットも確立されている<sup>17-22)</sup>。

本研究では三叉神経系の神経因性疼痛モデルの一つである下歯槽神経切断モデルラット<sup>18,19)</sup>を用いた。我々は、このモデルの三叉神経第1・2枝領域と第3枝領域が分離できることに着目し、神経損傷マーカーを用いた実験等で三叉神経節を領域別に分離できることを確認した上で第1・2枝と第3枝の領域別に解析することを試みた。このモデルでは、下歯槽神経切断1日後から30日後まで、切断側の口髭部へ von Frey フィラメントによる機械刺激からの逃避行動の閾値が低下することが知られている。我々の作成するモデル動物も、痛覚過敏やアロディニアを発症していることを von Frey フィラメントによる逃避行動テストにて確認し、他のグループと同様のデータを得た。この結果を踏まえ、下歯槽神経切断3日後の動物から三叉神経節を摘出し、第1・2枝と第3枝に分離し、cDNA マイクロアレイにて対照群（偽手術群）と比較し、網羅的な遺伝子発現の解析をしてきた。その解析の結果、第3枝領域つまり神経損傷領域において、対照群と比較し1.5倍以上の発現上昇の動態変化を認めたのは545種の遺伝子であった。また、非損傷領域にあたる第1・2枝領域の同様の変動遺伝子は41種であった。損傷領域である第3枝で発現上昇を認めた遺伝子の多くは、これまでに報告されている神経損傷により発現上昇が認められる分子であった。これに対し非損傷領域である三叉神経第1・2枝の遺伝子発現動態については、まだその詳細が明らかにされていない。

そこで本研究では、下歯槽神経切断モデルラットの cDNA マイクロアレイによる網羅的解析結果を基に三叉神経節第1・2枝領域（非損傷領域）での詳細な遺伝子発現動態を解析することを

目的とした。対象としたのは、発現動態が対照群と比較し約1.5倍以上の発現上昇率を示した遺伝子とし、さらに遺伝子名や機能などが明らかになっている上位22遺伝子とした。

対象の22種の遺伝子について神経組織特異的に発現するかどうかを確認するため末梢神経組織、中枢神経組織、血液を多く含む組織からそれぞれの total RNA を用いて定量 PCR をおこなった。また、対象遺伝子の三叉神経節における一次求心性神経細胞での発現局在、特に第1・2枝領域と第3枝領域の発現局在について *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) を用いて検討した。さらに神経損傷後における経時的変化についてリアルタイム PCR を行ない解析を行なった。

### 実験動物及び方法

#### (1) プライマーおよびプローブの作成

データベース (GenBank) から対象の22種の遺伝子の配列を検索し、遺伝子配列解析プログラム (BLAST) を用いて、他の遺伝子と相同性の低い領域を選び、プライマー設計プログラム (Primer 3) にてプライマーとプローブを設計した。

なお、PCR のプライマーの設計条件は20~22塩基とし、PCR 産物が300~400塩基となるよう

設定した。また、*in situ* ハイブリダイゼーションについては、前述の PCR 産物と同領域を pGEM-T Easy ベクター (Promega, 東京) に組み込み digoxigenin (DIG) 標識 RNA プロブの鋳型として用いた。さらに、リアルタイム PCR については、前述の PCR 産物の検出領域内に納まるように、プライマーは19~21塩基、TaqMan プロブは24~26塩基、増幅領域は99~130塩基とした (表1)。

検出範囲設定およびプライマー、プローブの設計を行う際には、PCR 産物を電気泳動して確認し、非特異的増幅が検出されないプライマー、プローブのみを実験に使用した。

#### (2) 実験動物

全ての実験には、7~9週齢の Sprague Dawley 系 (SD) 雄性ラット (日本 SLC, 静岡; 200~250g) を用いた。実験動物の取り扱いについては、松本歯科大学動物実験委員会の承認 (第71号) を得て、『松本歯科大学動物実験取り扱い規程』、『松本歯科大学遺伝子組み換え生物等安全管理規程』ガイドラインに従って行った。

#### (3) 下歯槽神経切断モデルラットの作成及び組織の摘出

下歯槽神経切断時には、ラットに麻酔薬 (pentobarbital Na, 50mg/kg, 大日本住友製薬, 大

表1: 22種遺伝子に対応する各実験 (PCR, ISH, real-time PCR) の解析領域一覧を示す。

<i>GeneName</i>	<i>analysis area</i>	
	<i>PCR &amp; ISH</i>	<i>Real-time PCR</i>
1. S100 calcium binding protein A9 (S100A9)	[26-410bp]	[136-248bp]
2. S100 calcium binding protein A8 (S100A8)	[1-315bp]	[151-263bp]
3. Proteoglycan peptide core protein (PGSG)	[574-944bp]	[582-711bp]
4. Proteoglycan 2, bone marrow (PRG2)	[327-705bp]	[328-436bp]
5. Ficolin B (FCNB)	[501-875bp]	[502-611bp]
6. D site albumin promoter binding protein (DBP)	[1175-1571bp]	[1337-1464bp]
7. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C)	[307-664bp]	[482-581bp]
8. Nuclear factor, erythroid derived 2 (NFE2)	[542-908bp]	[592-701bp]
9. Roundabout homolog 1 (RoBo1)	[88-450bp]	[255-377bp]
10. High mobility group box 2 (HMGB2)	[412-772bp]	[415-518bp]
11. Annexin A1 (ANXA1)	[293-671bp]	[555-671bp]
12. Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)	[5385-5761bp]	[5385-5499bp]
13. NS5A transactivated protein 9 (NS5ATP9)	[3-313bp]	[166-268bp]
14. Erythroid associated factor (ERAF)	[36-376bp]	[246-375bp]
15. Hemogen (HEMGN)	[588-949bp]	[824-949bp]
16. Napsin A aspartic peptidase (NAPSA)	[929-1297bp]	[1163-1289bp]
17. Vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1)	[268-633bp]	[349-453bp]
18. Adducin 2 (ADD2)	[1631-1995bp]	[1631-1731bp]
19. Src-like adaptor (SLA)	[338-715bp]	[545-644bp]
20. Integrin alpha M (ITGAM)	[2152-2516bp]	[2367-2488bp]
21. Similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2)	[224-560bp]	[292-398bp]
22. Myelin basic protein (MBP)	[613-957bp]	[759-873bp]

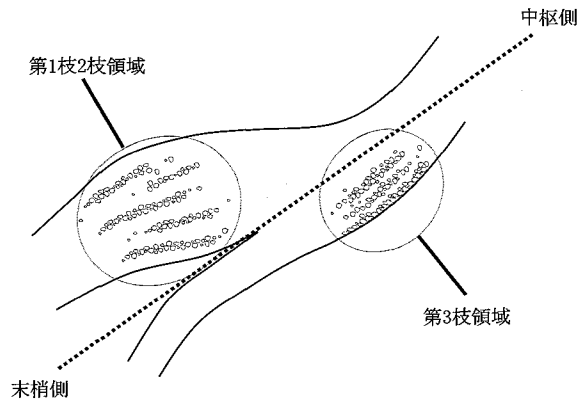


図1: ラットの三叉神経節の模式図を示す。左側が末梢側で右側が中枢側になる直線(点線)に沿って末梢側から中枢側に向けピンセット等で鈍的に第1・2枝領域と第3枝領域に分離することができる。

版)を腹腔内投与し, 深麻酔を行なった。切断群(cut)では, 左側顔面皮膚を剃毛し左側頬部皮膚を切開し, 咬筋を筋線維の走行方向に沿って鈍的に剥離し, 下顎骨下顎角部外側面を露出させた。同部で骨内を走行する下歯槽神経を確認し, その周辺の骨をラウンドバーを装着した歯科用エンジンにて除去後, 下歯槽神経を露出させ近遠心方向に約1mm幅で切断, 摘出した。その後咬筋剥離部と頬部皮膚を縫合し閉創した。比較対照として, 切断群(cut)と同様の手順で下歯槽神経を露出, 明示した後, 切断せずにそのまま閉創したラットを対照群(sham)として用いた。また, 麻酔や切開していないものを未処置群(native)とした。

組織摘出時には, ラットをジエチルエーテルにて深麻酔した後, 剪刀にて断頭し三叉神経節および大脳と脾臓を摘出した。三叉神経節については, 頭蓋腔から脳幹部などを除去して, 脳底部, 脳硬膜を丁寧に剥離して露出し, 分岐し頭蓋腔から骨を通過する手前で各枝を切断して摘出した。RNA抽出には, 組織を摘出後直ちに液体窒素にて凍結し, 保存した。三叉神経節は第3枝の分岐部から中枢側に向かいピンセットで鈍的に分離し, 第3枝領域と第1・2枝領域を分離し(図1), それぞれ凍結した。ISHの場合は, 組織摘出後直ちに粉末ドライアイスにて凍結し, 新鮮凍結切片を作製した。

#### (4) 逃避行動テスト

我々の下歯槽神経切断の手術手技で間違いなくアロディニアを発症しているのか確認するため,

von Frey フィラメントを用いて下歯槽神経切断側の第2枝領域(左側口髭部)における疼痛逃避閾値の経時的变化を観察した。ラットは, 手術の約1週間前より von Frey フィラメントによる実験, および環境や実験器材に慣らした。刺激は von Frey フィラメントを段階的に交換し10gから60gまで徐々に増加させ, 逃避行動を起こしたところでの刺激を閾値とした。測定は各測定につき3回行い, 平均値を閾値とした。実験群及び対照群共に7匹ずつ用い, 手術5日前から手術後30日目まで経日的な疼痛逃避閾値を測定した。

#### (5) 定量PCR

未処置のラットから摘出した組織を用いた。組織の total RNA は, TRIZOL (Invitrogen 社, California, USA) を用いて指定の方法により抽出・精製した。次に M-MLV 逆転写酵素 (Invitrogen 社) を用いて指定の方法により cDNA を合成した。PCR は Taq DNA Polymerase (BIORAD, 東京) を用いて, 熱変性 (95°C, 2分) し, 増幅は95°Cで1分, 50~58°Cで30秒, その後62~68°Cで1分, 30サイクルの反応条件を設定した。PCR産物の確認には1.5%アガロースゲルとTAEバッファー(40mM Tris-acetate (pH 8.0), 2mM EDTA)を用いた。電気泳動後, エチジウムブロマイド染色(アズワン, 東京)を行い Mupid-Scope WD (ADVANCE, 東京) で撮影した。

#### (6) in situ ハイブリダイゼーション

未処置のラットから摘出した三叉神経節を用いた。ドライアイスにて凍結した組織をクライオスタット (LEICA CM 1850, 東京) にて新鮮凍結切片 (10μm) を作製し, シランコーティングしたスライドガラスに順次貼付した。切片は, 4%ホルムアルデヒド燐酸緩衝液 (4% Formaldehyde (FA) in 0.1M Phosphate buffer (0.1M PB)) にて20分間固定を行い, 燐酸緩衝液 (0.1M PB) にて10分間の洗浄を2回した後, プロテアーゼ K 処理 (5μg/ml proteinase K, 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 5mM EDTA) を3分間行った。その後, 4% FA in 0.1M PB にて再度10分間固定を行い, 0.1M PB にて5分間の洗浄を2回した後, アセチル化処理 (0.1M Triethanolamine, 24mM Acetic anhydride) を10分間行い, 0.1M PB にて5分間洗浄を行う。次に, エタノール脱水系

列70%, 80%, 90%, 100%, 100%の順に3分間浸漬, クロロホルムに10分間, さらに100%エタノールに3分間浸漬して脱水した後, 乾燥した。次にハイブリダイゼーションバッファー (20mM Tris-HCl (pH7.5), 0.3M NaCl, 5 mM EDTA, 10% Dextran sulfate, 1×Denhart solution, 20 mM DTT) によるプレハイブリダイゼーションを行った (55°C, 1時間)。さらに Digoxigenin (DIG) 標識した RNA プローブを作製し, この RNA プローブ (0.25-1ng/μl) を含むハイブリダイゼーションバッファーにより, ハイブリダイゼーション反応を行った (55°C, 16-20時間)。RNA プローブは, cDNA を pGEM-T-Easy Vector (Promega, 東京) に組み込んだ鋳型を, RNA ポリメラーゼ SP 6 (Promega, 東京) または, RNA ポリメラーゼ T 7 (Promega, 東京) にて DIG RNA labeling Mix (Roche, 東京) 存在下で転写して作製した。

ハイブリダイゼーション反応を行った後, すぐに 5×SSC (0.75M NaCl, 75mM Sodium citrate; 65°C, 30分), High stringency buffer (50% Formamide, 75mM NaCl, 7.5mM Sodium citrate; 65°C, 30分), washing buffer (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 0.5M NaCl; 37°C, 10分, 3回) にて洗浄した。次に RNase 処理 (20μg/ml RNase in Wash buffer; 37°C, 30分) を行い, 再度洗浄した (High stringency buffer; 65°C, 30分)。さらに, 非特異的免疫反応を抑制する目的で, Blocking buffer (1% Blocking Reagent (Roche, 東京), 100 mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl; 室温, 60分) にてブロッキングを行った。その後, Blocking buffer にアルカリフォスファターゼ標識した抗 DIG 抗体 (Roche, ×800倍希釈) を加え抗体反応 (4°C, 12時間) を行った。次に, Tris buffer (100mM Tris-HCl (pH7.5), 150mM NaCl, 0.2% Tween 20; 室温, 15分, 4回) にて洗浄し, 発色反応 (0.45mg/ml nitro-blue tetrazolium chloride, 0.175mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphatase, 100mM Tris-HCl pH9.5, 0.1 M NaCl, 50mM MgCl<sub>2</sub>; 4°C, 1~2日間) を行った。発色後カバーガラスをかけ封入し, 光学顕微鏡 (OLYMPUS BX-51, 東京) にて観察した。

#### (7) リアルタイム PCR

未処置のラットと切断群・対照群それぞれ手術後1, 3, 5および7日目のラットから取り出した三叉神経節の第1・2枝領域を用いた。各タイムポイントにつき切断群は6匹, 対照群と未処置群は各4匹を用いた。

cDNA は定量 PCR 同様に TRIZOL, M-MLV 逆転写酵素を用いて合成した。また, cDNA は10倍に希釈したもの0.5ml 使用した。各遺伝子の検出領域は表1のとおりで, プライマー, TaqMan プローブ (5'-FAM 修飾, 3'-TAMRA 修飾, 日本バイオサービス, 埼玉) および Pre-mix Ex Taq (TaKaRa, 東京) を用いて行った。熱変性 (95°C, 2分), 増幅 (95°Cで15秒, その後58~62°Cで30秒, 80サイクル) の反応条件で行い, リアルタイム PCR 解析システム (DNA Engine Opticon™ System Bio-Rad, California, USA) にて測定および解析を行った。

なお, 値は naive を1.00として比を値とした。

#### (8) 統計処理

統計データの解析は, Dr.SPSS II for Windows (エス・ピー・エス・エス, 東京) を用いた。クラスカル・ウォリスの検定にて多重比較を行ない,  $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結 果

最初に, 下歯槽神経切断術が通法どおりに実施できているかどうかを確認するため, 切断群と対照群のラットの口髭部について機械刺激に対する疼痛逃避行動テストを行った。これまでの報告では, 下歯槽神経切断後1日目から1か月以上にわたり, 切断側の口髭部における機械刺激逃避閾値が低下するとされている<sup>17,19)</sup>。本実験でも切断群ラットの逃避閾値は, 術後1日目から有意に低下し, 30日目まで持続した。一方対照群は, 術後1日目で一時的な低下はみられたもののすぐに回復し, その後30日目まで変化はなかった (図2)。この結果は, これまでの報告と一致するものであり, これにより下歯槽神経切断術が通法どおりに実施できていることが確認できた。

表2には, 本研究で使用した遺伝子22種に関して, 切断群と対照群を比較したマイクロアレイ解析によって得られた下歯槽神経切断による発現上昇率と発現量を示す。S100 calcium binding pro-

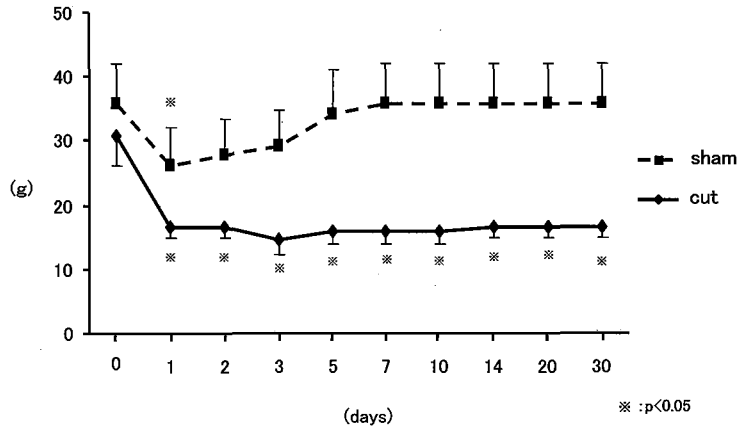


図2: 疼痛逃避行動テストの結果を示す。0日が手術日で手術前の値となる。手術後1~30日まで経的に逃避閾値 (g) を測定した。下歯槽神経切断群 (cut) では手術後1~30日まで逃避閾値が有意に低下し、アロディニアの発症を確認した。対照群 (sham) では、手術1日後のみ閾値の有意な低下をみたが、その後回復した。

tein A9 (S100 A9), S100 calcium binding protein A8 (S100 A8) といった細胞内カルシウム動態に関与するタンパク, Myelin basic protein (MBP) や Proteoglycan peptide core protein (PGSG) といった主にシュワン細胞で発現するタンパク, Erythroid associated factor (ERAF) や Hemogen (HEMGN), Integrin alpha M (ITGAM), D site albumin promoter binding protein (DBP), Nuclear factor, erythroid derived 2 (NFE2) といった血球細胞で発現していると思われるタンパク等, 様々なタンパク質をコード

する遺伝子が含まれている。

これらのうち最大の上昇率を示したのは S100 A9 遺伝子で, 下歯槽神経切断により4.92倍に発現が上昇した (表2の1)。しかし, この S100 A9 は, 定量 PCR において神経組織での発現が確認されず (図3D), さらに ISH でもセンス, アンチセンスどちらも反応が見られなかった (図3A, B) が, 脾臓を用いた定量 PCR では発現が確認された。また, リアルタイム PCR によっても発現上昇は確認できず, むしろ切断群, 対照群ともに未処置よりも減少していた (図3C)。

表2: 実験対象に絞った22種遺伝子の cDNA マイクロアレイによる発現上昇率 (ratio: 切断群 (V3 cut) vs 対照群 (偽手術群: sham)) と発現量を示す。

GeneName	GenBank	ratio	volume	
			sham	V3 cut
1. S100 calcium binding protein A9 (S100A9)	NM_053587	4.92	3771.88	18574.65
2. S100 calcium binding protein A8 (S100A8)	NM_053822	4.84	132.42	640.75
3. Proteoglycan peptide core protein (PGSG)	NM_020074	2.64	287.13	757.52
4. Proteoglycan 2, bone marrow (PRG2)	NM_031619	2.22	1025.00	2270.90
5. Ficolin B (FCNB)	NM_053634	2.03	381.77	774.71
6. D site albumin promoter binding protein (DBP)	NM_012543	1.98	1237.24	2453.31
7. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C)	XM_215924	1.90	180.45	342.99
8. Nuclear factor, erythroid derived 2 (NFE2)	BC078925	1.80	189.91	341.55
9. Roundabout homolog 1 (Robo1)	NM_031537	1.80	279.09	501.79
10. High mobility group box 2 (HMGB2)	BC107455	1.74	419.58	729.28
11. Annexin A1 (ANXA1)	NM_012904	1.71	2457.85	4196.44
12. Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)	XM_225460	1.70	216.32	368.54
13. NS5A transactivated protein 9 (NS5ATP9)	NM_201418	1.65	548.48	906.24
14. Erythroid associated factor (ERAF)	XM_215059	1.63	1856.74	3024.84
15. Hemogen (HEMGN)	NM_133294	1.62	264.65	429.60
16. Napsin A aspartic peptidase (NAPSA)	NM_031670	1.59	195.73	312.18
17. Vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1)	XM_213421	1.59	217.05	344.11
18. Adducin 2 (ADD2)	NM_012491	1.55	112.30	173.52
19. Src-like adaptor (SLA)	NM_178097	1.54	178.32	274.81
20. Integrin alpha M (ITGAM)	NM_012711	1.53	37.70	57.65
21. Similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2)	XM_573992	1.48	112.06	165.90
22. Myelin basic protein (MBP)	NM_00102529	1.47	10440.28	15382.65

表3：各実験 (PCR, ISH, real-time PCR) の結果をまとめた一覧を示す。PCRは各組織 (三叉神経節, 大脳, 脾臓) で発現がバンドで確認できた遺伝子は○とした。ISHは神経細胞やサテライト細胞, その他局在が認められたら○とした。real-time PCRはshamと比較して発現上昇が認められたら↑, 発現が減少したら↓とした。また変化なしは-とした。

GeneName	PCR			ISH	real-time PCR
	trigeminal ganglion	cerebrum	spleen		
1. S100 calcium binding protein A9 (S100A9)	×	×	○	×	↓
2. S100 calcium binding protein A8 (S100A8)	×	×	×	×	↓
3. Proteoglycan peptide core protein (PGSG)	×	×	○	×	-
4. Proteoglycan 2, bone marrow (PRG2)	×	×	○	×	-
5. Ficolin B (FCNB)	×	×	○	×	↓
6. D site albumin promoter binding protein (DBP)	△	○	○	×	↓
7. Ubiquitin-conjugating enzyme E2C (UBE2C)	×	×	○	×	-
8. Nuclear factor, erythroid derived 2 (NFE2)	×	×	○	×	-
9. Roundabout homolog 1 (RoBo1)	×	×	○	×	-
10. High mobility group box 2 (HMGB2)	△	×	○	×	↓
11. Annexin A1 (ANXA1)	△	×	○	×	-
12. Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67 (MKI67)	×	×	○	×	-
13. NS5A transactivated protein 9 (NS5ATP9)	×	×	○	×	-
14. Erythroid associated factor (ERAF)	×	×	○	×	-
15. Hemogen (HEMGN)	×	×	○	×	↑
16. Napsin A aspartic peptidase (NAPSA)	×	×	○	×	-
17. Vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1)	×	○	○	×	↑
18. Adducin 2 (ADD2)	×	×	○	○	-
19. Src-like adaptor (SLA)	×	×	○	×	-
20. Integrin alpha M (ITGAM)	△	×	○	×	↓
21. Similar to Cyclin-dependent kinases regulatory subunit 2 (CKS-2)	×	×	○	×	↓
22. Myelin basic protein (MBP)	◎	○	×	○	↑↑

1 S100 calcium binding protein A9 (S100A9)

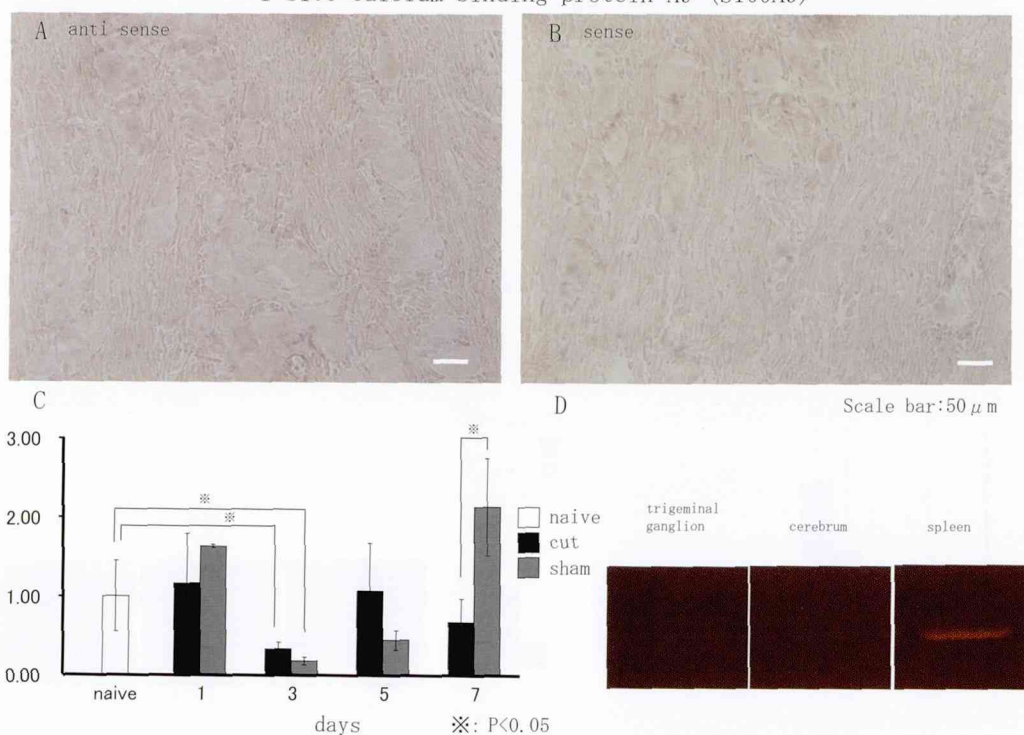


図3：S100A9における各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ, Bはセンスプローブの反応を示しており, 結果は共に陰性であった。CはリアルタイムPCRの結果で3日目に切断群, 対照群ともに発現は低下している。Dは, 三叉神経節 (trigeminal ganglion), 大脳 (cerebrum), 脾臓 (spleen) における定量PCRのバンド像で脾臓のみバンドが認められた。

11 Annexin A1 (ANXA1)

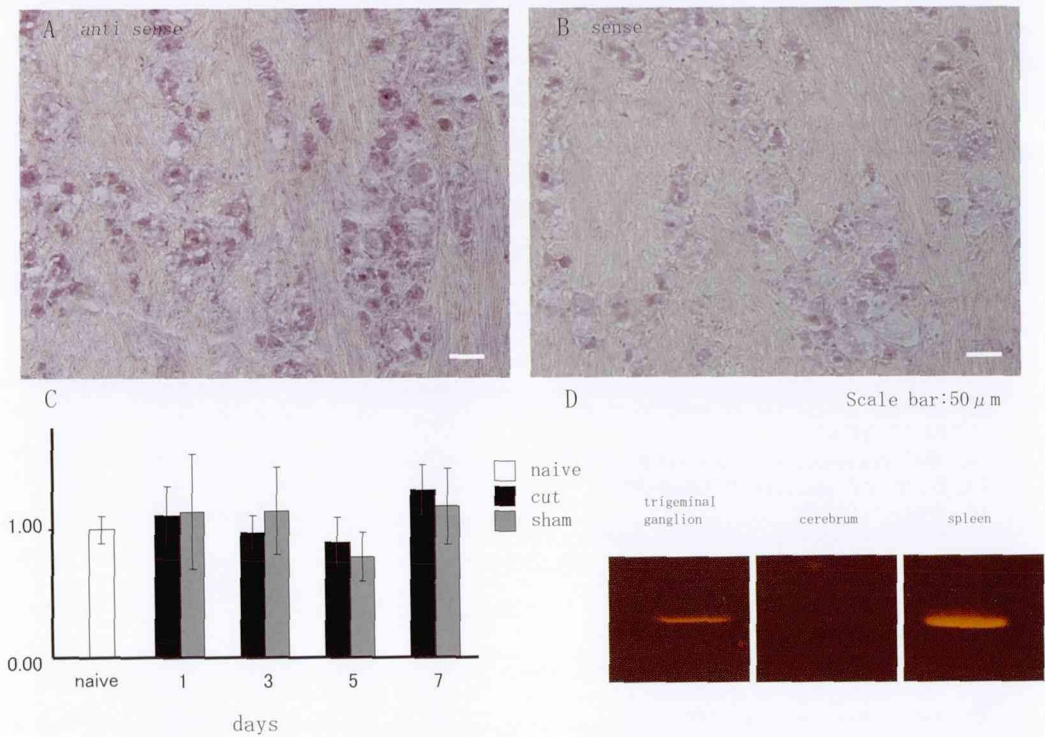


図4: ANXA1における各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ, Bはセンスプローブの反応を示しており, 結果は共に陰性であった。CはリアルタイムPCRの結果で切断群, 対照群ともに発現変動を認めなかった。Dは, 三叉神経節 (trigeminal ganglion), 大脳 (cerebrum), 脾臓 (spleen) における定量PCRのバンド像で脾臓でバンドが認められた。また, 三叉神経節においてもわずかにバンドが確認できた。

6 D site albumin promoter binding protein (DBP)

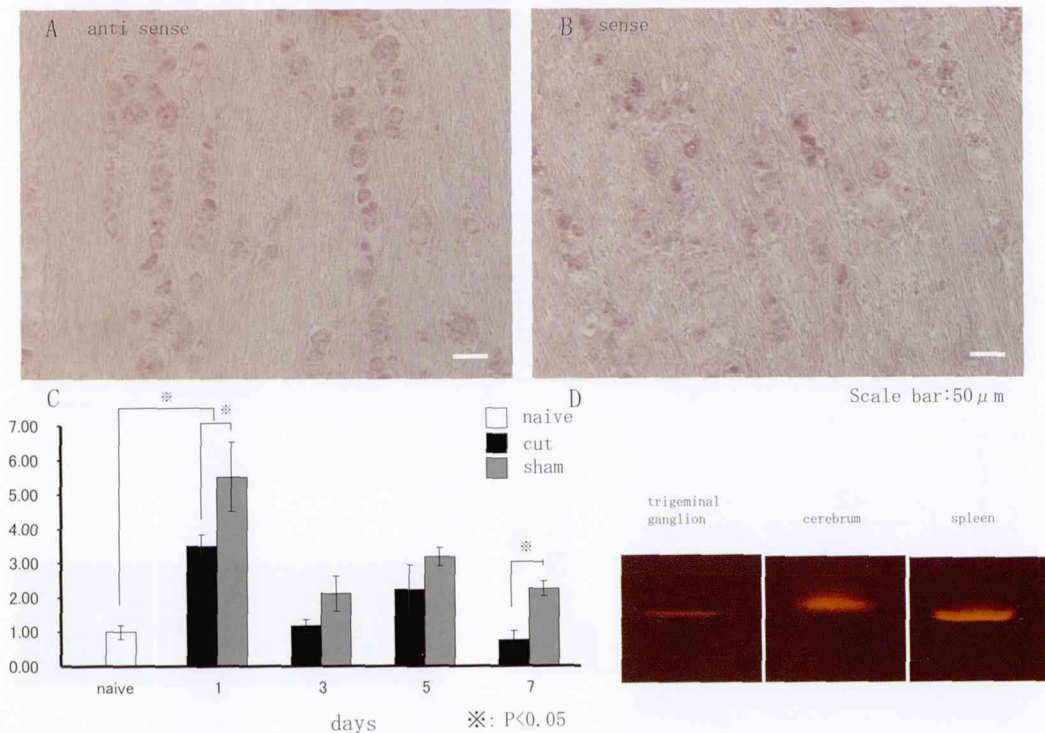


図5: DBPにおける各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ, Bはセンスプローブの反応を示しており, 結果は共に陰性であった。CはリアルタイムPCRの結果で切断群, 対照群ともに1日後に有意な発現の上昇を認めた。また対照群の上昇率が顕著であった。Dは, 三叉神経節 (trigeminal ganglion), 大脳 (cerebrum), 脾臓 (spleen) における定量PCRのバンド像で大脳と脾臓でバンドが認められた。また, 三叉神経節においてもわずかにバンドが確認できた。



22 Myelin basic protein (MBP)

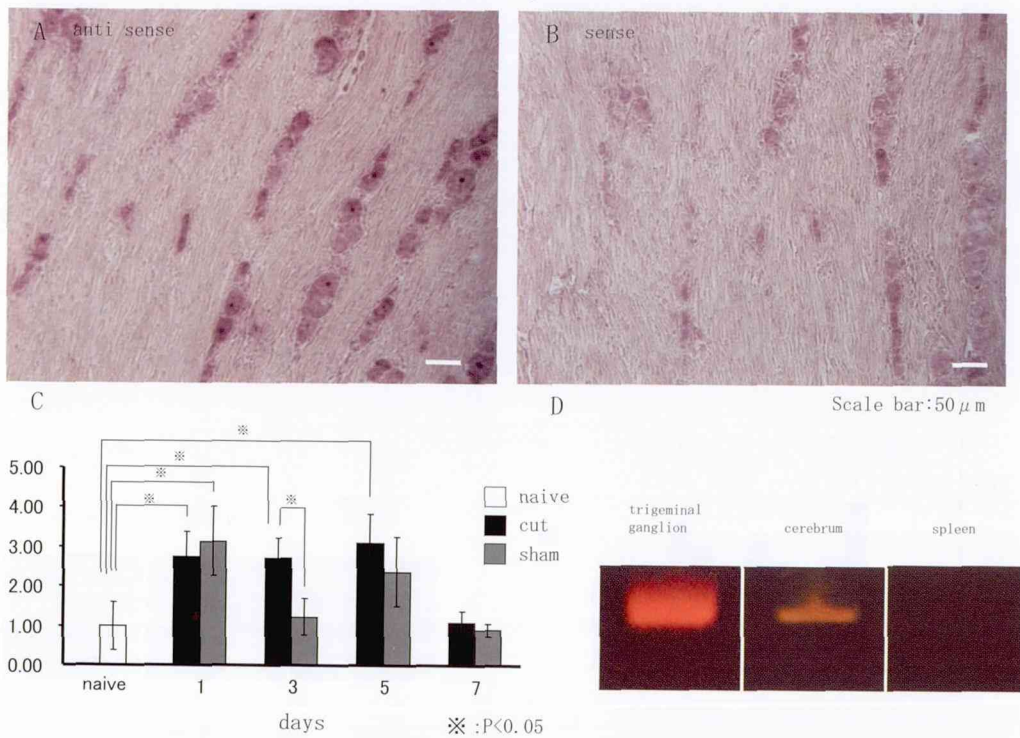


図6：MBPにおける各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ、Bはセンスプローブの反応を示しており、結果はアンチセンスプローブで陽性反応を認めた。全ての神経細胞で発現を認めた。CはリアルタイムPCRの結果で切断群は1～5日後まで有意な発現上昇を認めた。対照群は1日後のみ有意な発現上昇を認めた。Dは、三叉神経節 (trigeminal ganglion)、大脳 (cerebrum)、脾臓 (spleen) における定量PCRのバンド像で三叉神経節で強いバンド発現を確認した。大脳もバンドを認め、脾臓ではバンドはみられなかった。

15 Hemogen (HEMGN)

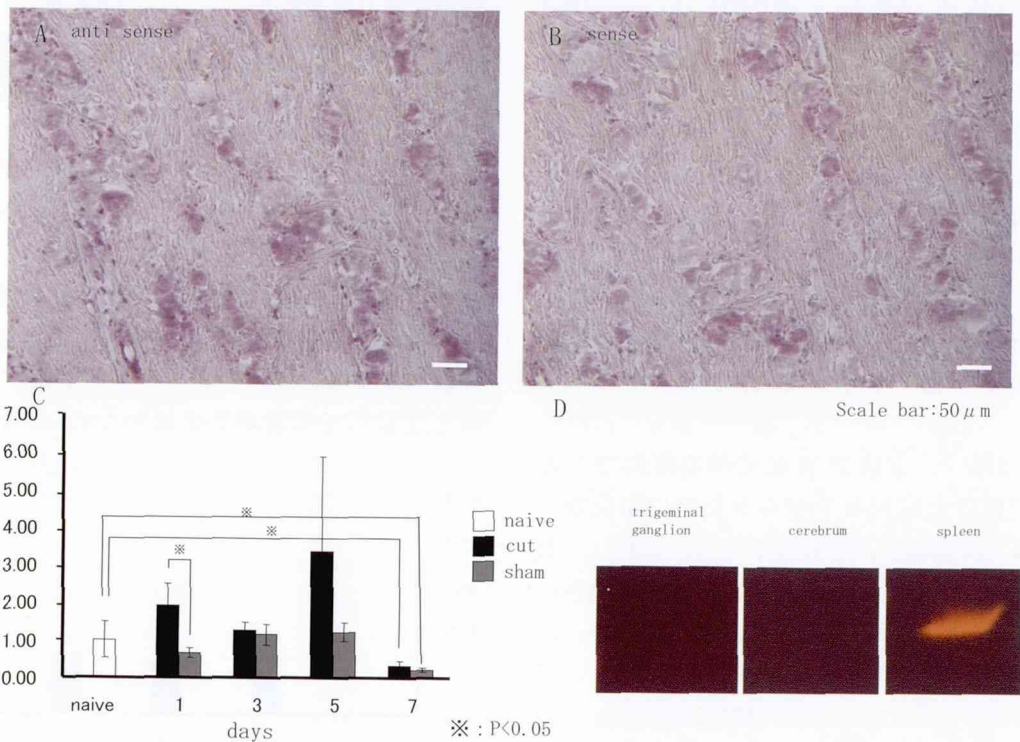


図7：HEMGNの各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ、Bはセンスプローブの反応を示しており、結果は共に陰性であった。CはリアルタイムPCRの結果で切断群、対照群ともに7日後に有意な発現低下を認めた。また1日後は対照群より有意な発現上昇を認めた。Dは、三叉神経節 (trigeminal ganglion)、大脳 (cerebrum)、脾臓 (spleen) における定量PCRのバンド像で脾臓でのみバンドが認められた。

17 Vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1)

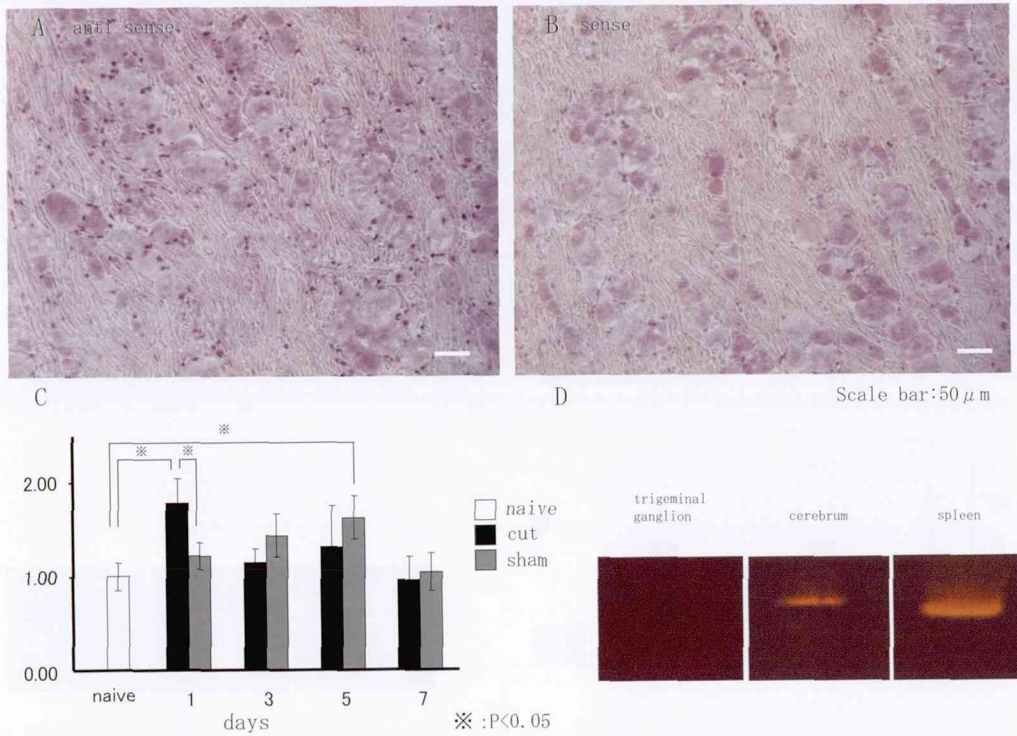


図8: VEZF1の各実験の結果を示す。AはISHのアンチセンスプローブ, Bはセンスプローブの反応を示しており, 結果は共に陰性であった。CはリアルタイムPCRの結果は1日後で対照群より有意な発現上昇を認めた。Dは, 三叉神経節 (trigeminal ganglion), 大脳 (cerebrum), 脾臓 (spleen) における定量PCRは, 脾臓および大脳でバンドが認められた。

定量PCRの結果より, わずかでも三叉神経節で発現を認めた遺伝子はDBP, Annexin A1 (ANXA1), High mobility group box 2 (HMGB2), ITGAMとMBPの5種であった(表3)。これらのうちMBP以外の4種類の遺伝子については, ISHで発現が検出できず, またリアルタイムPCRでも対照群に対して有意な上昇は検出されなかった(表3, ANXA1については図4A-C, 他のデータは示していない)。DBPについては対照群の方がnaiveや切断群と比較して切断1日後や7日後で上昇が顕著であった(図5C)。

MBPは唯一, 定量PCRにて神経組織である三叉神経節と大脳両方で明らかな発現が確認でき, 脾臓では発現がみられなかった。これは, 表2に示したマイクロアレイ解析において検出された三叉神経節における発現量が, 他の遺伝子に比べて高いという結果と一致する。ISHにおいても強い反応が見られ, 三叉神経節における全ての神経細胞が染色されており, 細胞体のサイズによる発現量の違いは検出されなかった。リアルタイムPCRにおいては, 術後1日目から切断群, 対

照群ともに発現量が上昇した。ただし, 切断群と対照群間で有意差が見られたのは術後3日目のみであった。術後7日目, 対照群では未処置レベルまで減少したが, 切断群では発現の上昇が維持されていた(図6C)。

定量PCRにおいて三叉神経節で発現が認められなかった遺伝子についても, 定量PCRに比べ高い検出感度が期待できるリアルタイムPCRでは, 微量な遺伝子発現量の変動を検出できる可能性がある。定量PCRにおいて三叉神経節で発現を認めなかったが, リアルタイムPCRでは対照群と比較して発現増加を認めたのは, HEMGN

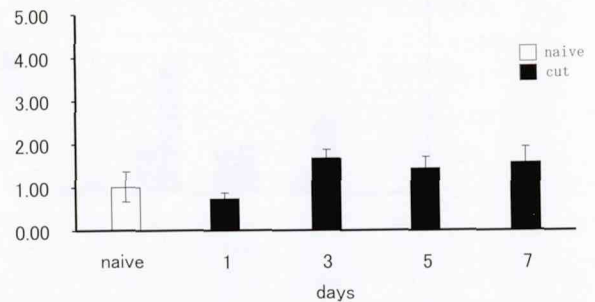


図9:  $\beta$ アクトチンのリアルタイムPCRの結果を示す。経時的な変化は認められなかった。

(表3の15, 図7C), Vascular endothelial zinc finger 1 (VEZF1) (表3の17, 図8C)の2種の遺伝子であった。これら遺伝子はいずれもISHでは検出できなかった(図7A, 図8A)。

ISHでは, 全ての遺伝子について, ネガティブコントロールであるセンスプローブではシグナルが得られないことを確認した。またリアルタイムPCRでは $\beta$ アクチンについては発現変動がないことを確認し, 標準遺伝子とした(図9)。

## 考 察

神経切断による神経因性疼痛に関しては多くのモデルラットが作成されているが, その中の一つである下歯槽神経切断モデルラットでは, 第3枝の一部である下歯槽神経を切断したにも関わらず, 第2枝の一部である眼窩下神経が支配する口髭部にアロディニアが発症する。この症状は, 神経損傷後に損傷領域を超えて感覚異常が発現するという臨床例をよく再現しており, 数多く存在する神経因性疼痛モデルラットの中でも特徴的であると言える。また, 三叉神経節はその形態的特徴から, 第3枝に軸索を伸ばす神経細胞の細胞体と, 第1・2枝に軸索を伸ばす神経細胞の細胞体を容易に分離することができる<sup>18)</sup>(図1)。我々も, 神経損傷のマーカーとなる物質を用いた実験等を行い第3枝と第1・2枝領域が分離できることも確認している(データ未公表)。

これまでに下歯槽神経切断モデルのこの特徴を活かして, 損傷神経を含む第3枝領域と, アロディニア発症部位を支配する神経を含む第1・2枝領域について別々に遺伝子発現変化を解析してきた。このうち第3枝領域の神経細胞で発現上昇をみた遺伝子についてはリアルタイムPCR法などで経時的な発現上昇についても明らかにしている(論文投稿中)。

これに対し, 下歯槽神経切断後3日目の切断群と処置後3日目の対照群のラットの三叉神経節を用いたマイクロアレイ解析からは, 非損傷神経を含む第1・2枝領域では41種の遺伝子の発現上昇が検出された。これは, 損傷神経である下歯槽神経の細胞体を含む第3枝領域において545種の遺伝子が検出された結果と比較すると検出遺伝子数, 上昇率共に非常に小規模で, 直接損傷を受けた神経細胞に比べ, アロディニアが起きている領

域を支配する神経細胞における遺伝子発現レベルでの変化は限定的なものであると予想できる。しかし, 坐骨神経と後根神経節を用いた研究では, 神経損傷後に神経節で発現が上昇することが知られている遺伝子が数多く報告されている<sup>15,16)</sup>が, これらの遺伝子は全て第3枝領域の解析により検出されていた。第1・2枝領域の解析で検出された41種の遺伝子は神経損傷との関連は, 報告されていないものばかりであり, これらの中にアロディニアの発症に直接的に関与する遺伝子が含まれている可能性は十分存在すると考えた。

今回の実験において, 切断3日後のサンプルを用いたマイクロアレイの結果と一致して切断後3日目に発現上昇が観察されたのはMBPのみであり, 三叉神経節神経細胞においてもMBPの発現が確認できた。このタンパク質のノックアウトマウスでは中枢神経細胞のミエリン化の阻害や痙攣を引き起こすことが知られている<sup>23,24)</sup>。また, 坐骨神経を用いた神経因性疼痛モデルでは, 神経損傷後にMBPの分解とそれに伴う髄鞘構造の破壊が起こることが知られている<sup>25)</sup>。さらに, 脱髄が神経の異常興奮とつながることは動物モデルでも臨床例でも知られており<sup>24)</sup>, MBPが本研究で用いた下歯槽神経切断モデルにおいても重要な役割を果たしている可能性は十分考えられ, 末梢神経細胞についてもその興奮性に影響を与えている可能性が考えられる。切断群と対照群間ではっきりとした有意差が認められたのは術後3日目のみであったが, このMBP遺伝子発現上昇に引き続き髄鞘構造に変化が起き30日以上続くアロディニアの症状を惹起しているのではないかと考える。三叉神経節はサイズ, 性質など異なる神経細胞の集合体であるが, MBPの発現は特定の細胞ではなく全神経細胞に認められたため痛覚以外の刺激の伝達にも関与している可能性もある。ヒトの皮膚のマイスネル小体にもMBP陽性線維が認められる報告<sup>23)</sup>もあり, MBPが感覚情報の伝達に何らかの影響を与える可能性は考えられる。

損傷領域を超える範囲に広がる神経因性疼痛の発生機序については, 従来の研究から末梢神経が損傷を受けると末梢神経系だけでなく三叉神経脊髄路核等の上位中枢においても神経回路網に組織学および生理学的変化がおこることが明らかになっており<sup>17-19,26)</sup>, 損傷を受けた神経が支配して

いる領域だけでなく, その周辺領域にも広く痛覚過敏が発現し影響を波及する<sup>11, 17, 19, 20, 26)</sup>.

特に三叉神経脊髄路核において下歯槽神経切断後の経時的な神経細胞活動電位の記録実験では, 切断後2日~14日で Low threshold mechanoreceptive neuron (LTM) や wide dynamic range neuron (WDR) などの割合が増加することを示しており, この変化により非侵害刺激に対する応答も増強され, 機械刺激に対するアロディニアの発症と関連していることが述べられている<sup>26)</sup>. この LTM や WDR の増加には, 一次求心性神経からの過剰な入力の影響している可能性が大きく, 過剰な入力の原因として MBP 遺伝子発現上昇が関与している可能性も示唆される.

次にリアルタイム PCR で一過性の上昇を認めた HEMGN と VEZF 1 については, 定量 PCR の結果から血球系細胞由来の mRNA を検出していることが予想され, これらの遺伝子が血管内皮や血球で多く発現しているという報告と一致する. しかし, 他の血球系細胞由来 mRNA と異なり, リアルタイム PCR で術後1日目に一過性の上昇が検出されていることから, アロディニア発症初期において第1・2枝領域における血球細胞の状態, もしくは血流等に変化が起きている可能性が考えられる.

しかし, 解析の結果は MBP 以外, ほとんどの遺伝子について神経における発現も神経切断後の発現上昇も確認できず, 多くは脾臓における発現が強く検出された. これは, マイクロアレイの結果において三叉神経節摘出時に混入していた血球系細胞由来の遺伝子発現を検出している可能性があることを示唆している. これらが血球系細胞由来である場合, それらの血球系細胞は三叉神経節摘出時に血液が混入したのか, あるいは神経損傷や炎症によって三叉神経節内部に遊走した血球系細胞に由来するのか, そのどちらなのかについては現時点で不明である. また, 非損傷領域である第1・2枝領域の神経細胞において, 多くの遺伝子についてはリアルタイム PCR でも神経損傷後の発現上昇は検出されず, さらにいくつかの遺伝子については, むしろ発現の低下が見られた. これらの結果の真偽については各実験の検出感度の向上等, さらに解析が必要であると考え. しかし, マイクロアレイで解析された全20,500遺伝子

配列の発現量がそれぞれ2~300,000まで大きく異なっている中, 本研究で解析を行った22種の遺伝子の発現量は, 数百に過ぎないものがほとんどであり, この発現量の少なさも解析を困難にしていると思われる.

別の原因として, 各実験 (cDNA マイクロアレイ, 定量 PCR, ISH, リアルタイム PCR) それぞれに使用したプライマー, プローブの検出領域の差が挙げられる. 検出領域が異なっている, もしくは領域が重複していても完全に一致するものではないため, 選択的スプライシングなどの影響により結果そのものや検出効率が変化する可能性もある. しかし, それを踏まえても, なお今回の結果は, 損傷を受けた神経細胞を含む第3枝領域を解析したもの比べて, 予想以上に発現増加している遺伝子は少なく, たとえ同一神経節内であっても損傷神経が非損傷神経に与える影響は限定的なものであり, 少なくとも遺伝子発現変動というレベルでは非常に小さなものであることを示している.

本研究で, ごく少数の遺伝子発現変化しか検出されなかった結果の内, MBP が何らかのアロディニアの発生機序に関与している可能性が示唆された. さらにアロディニア発症領域を支配する一次ニューロンの変調だけではなく, 損傷神経の過興奮もしくは延髄もしくは三叉神経脊髄路核といった上位中枢の変調によるところが大きいことも示唆された.

## 結 論

今回の研究で三叉神経節内では, MBP は各実験 (cDNA マイクロアレイ, 定量 PCR, ISH, リアルタイム PCR) の結果より, アロディニア発症時に何らかの役割を担っている可能性が示唆された.

しかし, MBP のみの発現変動でアロディニア発症が惹起されるとは考えにくく, MBP の変化に加え, 第3枝神経細胞 (損傷神経) の変調や三叉神経脊髄路核での過興奮, 上位中枢神経細胞の変化などと協調してアロディニア発症が引き起こされるのではないかと思われた. また, これらの遺伝子の発現変動が直接アロディニアに関連するものであるかどうかについても, 今後さらに確認を進める必要があるといえる.

## 文 献

- 1) Eliav E and Max MB (2008) Orofacial pain—from basic to clinical management—second edition, 195–202, Quintessence publishing, Chicago.
- 2) Ikawa M, Yamada K and Ikeguchi S (2006) Efficacy of amitriptyline for treatment of somatoform pain disorder in the orofacial region : A case series. *J Orofac Pain* **20** : 234–40.
- 3) 金銅英二, 井川雅子, 正司喜信 (2006) 口腔歯科領域の痛みの鑑別と治療—非定形顔面痛と非定形歯痛を中心に—, *痛みと臨床* **6** : 23–9.
- 4) Petes RA, Bailey DR and Milone AS (1995) Atypical odontalgia : a nondental toothache. *JNJ Dent Assoc* **66** : 29–31.
- 5) Kim KJ, Yoon YW and Chung JM (1997) Comparison of three rodent neuropathic pain models. *Exp Brain Res* **113** : 200–6.
- 6) Coderre TJ, Grimes RW and Melzack R (1986) Defferentiation and chronic pain in animals : an evaluation of evidence suggesting autotomy is related to pain. *Pain* **26** : 61–84.
- 7) Bennett GJ and Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* **33** : 87–107.
- 8) Seltzer Z, Dubner R and Shir Y (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* **43** : 205–18.
- 9) Kim SHa and Chung JM (1992) An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain* **50** : 355–63.
- 10) Woolf CJ and Mannion RJ (1999) Neuroathic pain : a etiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet* **353** : 1959–64.
- 11) Tal M and Bennett GJ (1992) Extra-territorial pain in rats with a peripheral mononeuropathy : mechano-hyperalgesia and mechano-allodynia in the territory of an uninjured nerve. *Pain* **57** : 375–82.
- 12) Koltzenburg M, Lundberg LER and Torebiork HE (1992) Dynamic and static components of mechanical hyperalgesia in human hairy skin. *Pain* **51** : 207–19.
- 13) Woolf CJ, Shortland P and Coggeshall RE (1992) Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* **355** : 75–8.
- 14) Woolf CJ, Shortland P, Reynolds M, Ridings JL, Doubell, T and Coggeshall RE (1995) Reorganization of central terminals of myelinated primary afferents in the rat dorsal horn following peripheral axotomy. *J Comp Neurol* **360** : 121–34.
- 15) Zhang X, Dagerlind A, Elde RP, Castel MN and Broberger C (1993) Marked increase in Cholecystokinin B receptor messenger RNA levels in rat dorsal root ganglia after peripheral axotomy. *Neuroscience* **57** : 227–33.
- 16) Zhang X, Wiesenfeld-Hallin Z and Hokfelt T (1994) Effect of peripheral axotomy on expression of neuropeptide Y receptor mRNA in rat lumbar dorsal root ganglia. *Eur J Neurosci* **6** : 43–57.
- 17) Waite PM and Tracy DJ (1995) *The Rat Nervous System*, second edition. 705–24, Academic Press, California.
- 18) Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu JW and Iwata K (2002) Induction of Fos protein-like immunoreactivity in the trigeminal spinal nucleus caudalis and upper cervical cord following noxious and non-noxious mechanical stimulation of the whisker pad of the rat with an inferior alveolar nerve transaction. *Pain* **95** : 225–38.
- 19) Ogawa A, Suzuki I, Shima A, Honda K, Yamamoto M, Shiga Y, Hanzawa N and Iwata K (2007) Involvement of glia in orofacial abnormal pain following trigeminal nerve transaction in rats. *Pain Res* **22** : 115–21.
- 20) 田島 彰 (2002) ラット下歯槽神経への vinblastine 貼付により口髭部に発症した機械的痛覚過敏現象の検討. *日大歯学* **76** : 53–60.
- 21) 吉田充広 (2003) ラット下歯槽神経における神経因性疼痛に関する神経病理組織学的研究. *九州歯会誌* **57** : 14–24.
- 22) Imamura Y, Kawamoto H and Nakanishi O (1997) Characterization of heat hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res* **116** : 97–103.
- 23) Garcia-Suarez O, Montano JA, Esteban I, Gonzalez-Martinez T, Alvarez-Abad C, Lopez-Arranz E, Cobo J and Vega JA (2009) Myelin basic protein positive nerve fibers in human Meissner corpuscles. *J Anat* **214** : 888–93.
- 24) Kandel E, Schwartz JH and Jessel TM (1995) *Essentials of neural science and behavior*. 51–5. Prentice hall international inc, Connecticut.
- 25) Kobayashi H, Chattopadhyay S, Kato K, Dolkas J, Kikuchi S, Myers RR and Shubayev VI

- (2008) MMPs inhibit Schwann cell-mediated MBP degradation and mechanical nociception after nerve damage. *Mol Cell Neurosci* **39**: 619-27.
- 26) Iwata K, Imai T, Tsuboi A, Tashiro A, Morimoto T, Masuda Y, Tachibana Y and Hu J (2001) Alteration of medullary dorsal horn neuronal activity following inferior alveolar nerve transection in rats. *J Neurophysiol* **86**: 2868-77.