

下歯槽神経損傷後に発症する顔面部異所性機械痛覚過敏に対する

Connexin 43 の関与

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

梶 佳 織

(指導:清水典佳教授, 岩田幸一教授, 篠田雅路准教授)

目次

	ページ
概要	2-4
緒言	5-6
材料および方法	7-11
成績	12-14
考察	15-17
結論	18
謝辞	19
引用文献	20-23
図	24-31

概要

下顎第三大臼歯の抜歯または顎変形症手術により下歯槽神経が損傷されると、損傷を受けていない三叉神経によって支配されている口腔顔面領域に異常疼痛が引き起こされることがある。これまでの研究から、下歯槽神経損傷により異所性機械痛覚過敏が発症することが知られ、そのメカニズムが徐々に解明されつつあるが、その発症機構に関しては不明な点が多く残されている。そのため、臨床の現場では姑息的な治療が行われ、原因療法を実施することができないのが現状である。最近、神経損傷による痛覚過敏の発症機構の一つとして、感覚神経節内における主要なギャップ結合タンパク質である Connexin 43 (Cx43) および衛星細胞の可塑的变化が一次ニューロンの興奮性調節に重要な役割を果たすことがわかってきた。本研究では、この点に注目し、行動薬理的、免疫組織化学的および生化学的手法を用いて下歯槽神経損傷によって誘発されるラットの口髭部皮膚における機械痛覚過敏発症に対して、三叉神経節 (TG) に発現する Cx43 がいかなる役割を有するかを解明し、下歯槽神経損傷に起因する異所性機械痛覚過敏の新たな治療法の開発に寄与する基礎的データを得ることを目的とした。

Sprague-Dawley 系雄性ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、左側咬筋上部顔面皮膚を切開し、歯槽骨表面を切削し下歯槽神経 (IAN) を露出させた。露出後 IAN を切断して切断面間に隙間のないように下顎管に再配置し、IAN 切断 (IANX) モデルを作製した。IANX 後、左側上眼瞼部皮膚あるいは口髭部皮膚へ機械刺激を与えた時の頭部の逃避反射閾値 (MHWT) を測定した。また、あらかじめ口髭部皮膚あるいは下口唇部皮膚に逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG) を注射し、口髭部皮膚を支配する TG 細胞を同定した。本研究では Grial Fibrillary Acid Protein (GFAP) 陽性 (-IR) 細胞または GFAP-IR かつ Cx43-IR (GFAP-IR/Cx43-IR) 細胞に周囲を 1/2 以上囲まれた FG 標識 TG 細胞数をカウントすることによって、発現を定量化した。IANX 後、あらかじめ TG 内に刺入したカニューレを介して選択的ギャップ結合阻害薬 (Gap27) あるいは衛星細胞活性阻害薬

(Fluorocitrate : FC) を持続投与し、MHWT 測定および GFAP あるいは Cx43 のタンパク量の定量解析を行った。

その結果、以下の結論を得た。

1. IANX 後 1 日目から 14 日目まで、Sham 群に比較して有意な MHWT の低下を示した。また、IANX 後 8 日目、TG 内の Cx43 と GFAP のタンパク量は、Sham 群に比較して有意に増加した。

2. IANX 後 8 日目、GFAP-IR 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞に周囲を 1/2 以上囲まれた FG 標識 TG 細胞数は、TG の三叉神経第二枝領域 (V2) および第三枝領域 (V3) で Sham 群と比較して有意に多かった。特に $199 \mu\text{m}^2$ 以下の小型 FG 標識 TG 細胞数が有意に増加した。

3. IANX 後 1, 2, 4, 6, 8 日目において上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚の MHWT の低下は、TG 内への Gap27 持続投与により有意に抑制された。また、IANX 後の上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚の MHWT の低下は IANX 後 4 日目における TG 内への Gap27 単回投与によっても有意に抑制された。

4. IANX 後 8 日目、Gap27 持続投与群の GFAP-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞数は生理食塩水 (vehicle) 投与群に比べて有意に少なかった。また IANX 群と Sham 群の間において全 FG 標識 TG 細胞数に有意な差はなかった。

5. IANX 後 8 日目、三叉神経第一枝・第二枝領域 (V1-V2) および V3 における Cx43 と GFAP のタンパク量増加は、Gap27 持続投与により有意に抑制された。さらに、FC の TG 内持続投与は、Cx43 のタンパク量増加を有意に抑制した。

これらの知見から、TG における Cx43 により構成されているギャップ結合を介した衛星細胞の活性化の伝播が、下歯槽神経損傷後の口髭部皮膚における異所性機械痛覚過敏の発症に重要な役割を果たしていることが示唆された。

なお, 本論文は **Molecular Pain** に掲載予定の **Kaji K, Shinoda M, Honda K, Unno S, Shimizu N, Iwata K., Connexin 43 contributes to ectopic orofacial pain following inferior alveolar nerve injury.**を基幹論文とし, 新たに**第8図:IANXに伴うTG内のCx43発現におけるFCのTG内持続投与の効果**を加えて総括したものである。

緒言

下顎第三大臼歯の抜歯や顎変形症手術により下歯槽神経が損傷を受けると、損傷されていない三叉神経によって支配されている隣接した口腔顔面領域に異所性の痛覚過敏が引き起こされることが知られている^{1,2)}。このような口腔顔面領域に発症する異所性痛覚過敏に対する効果的な治療法を開発するため、下歯槽神経切断 (IANX) モデルラットを作製し、口髭部皮膚における異所性痛覚過敏の発症機構について、行動薬理学的、免疫組織学および生化学的手法を用いて研究を行い、いくつかの重要な基礎データを得た^{3,4)}。

これまでに、著者の研究グループでは IANX 後、下顎の領域を支配する三叉神経節 (TG) ニューロンから一酸化窒素 (NO) が放出され、口髭部皮膚を支配する TG ニューロン興奮性が増強され、口髭部皮膚に異所性機械痛覚過敏が発症することを示した⁵⁾。IANX ラットでは、口髭部皮膚を支配する TG ニューロンにおける熱侵害受容体の一つである transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) の増加を引き起こし、口髭部皮膚へのカプサイシン注射後の疼痛関連行動を増強した⁶⁾。これらの研究は、TG 内のシグナル伝達が三叉神経侵害受容機構の変調に重要な役割を果たしていることを示している。

衛星細胞は TG や後根神経節 (DRG) などの一次感覚ニューロンの細胞体の周りを取り囲むように存在することが知られており、衛星細胞マーカーである Grial Fibrillary Acid Protein (GFAP) の存在によって活性化の有無を同定することができる^{7, 8)}。生理的条件下では衛星細胞における GFAP 陽性反応はほとんど認められないが、末梢神経損傷、炎症や癌などの病的条件下では、GFAP 陽性反応が著しく増強されることが報告されている⁹⁻¹¹⁾。このような理由から、衛星細胞の活性化のマーカーとして GFAP 陽性反応が頻用されている⁷⁾。

ギャップ結合チャネルは Connexon と呼ばれる 2 つのヘミチャネルにより構成され、細胞間の結合に関与している¹²⁾。イオンや小分子は、ギャップ結合を介して、隣接する細胞間を移動する¹³⁾。Connexin 43 (Cx43) は主要なギャップ結合タンパク質であり、末梢神経損

傷による活性型衛星細胞数の増加に伴って、衛星細胞間の Cx43 を発現するギャップ結合数（カップリング）も増加する¹⁴⁻¹⁶。さらに眼窩下神経損傷後、TG において Cx43 発現が増加し、RNA 干渉を用いた Cx43 の発現抑制により口髭部皮膚での機械的痛覚過敏が抑制された¹⁷。これらの結果は、TG における Cx43 を介した衛星細胞の活性化によって神経細胞の興奮性が変調を受け、このメカニズムによって末梢神経損傷後の異常疼痛が引き起こされる可能性があると考えられた。

そこで本研究では、IANX に伴う異所性痛覚過敏の発症機構を解明する目的で、IANX ラットの上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚へ機械刺激を与えた時の頭部の逃避反射閾値（MHWT）の変化、TG での Cx43 発現変化およびその局在について検討した。さらに、IANX 後、選択的ギャップ結合阻害薬である Gap27 および衛星細胞の活性化阻害薬である Fluorocitrate（FC, 100 fmol, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA）を TG 内に投与して口髭部皮膚への MHWT の変化を解析し、異所性機械痛覚過敏発症に対する Cx43 の機能的役割を検討した。

材料および方法

1. 実験動物

本研究は, Sprague-Dawley 系雄性ラット (n = 156, Japan SLC, Shizuoka, Japan, 160~270g) を使用した。ラットは透明なポリカーボネート製ケージに, 12 時間の明/暗 (点灯: 午前 7 時, 消灯: 午後 7 時) サイクルにて食物および水分摂取は制限されない環境下で飼育された。全ての実験は, 日本大学実験動物委員会 (AP15D011) の承認を受け, 実験動物の管理および処置はアメリカ国立衛生研究所および国際疼痛学会のガイドラインに従って行った¹⁸⁾。また本研究では, 統計分析のための最小限の動物数を使用した。

2. IANX モデルラットの作製

IANX を施行するために, ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p., Shering Plough, Whitehouse, NJ, USA) の腹腔内投与による深麻酔下で, 保温マット (37°C) 上に保った^{6, 19)}。咬筋上部の左側顔面皮膚を切開し, さらに咬筋を歯槽骨が露出するまで開創した。また, 左側 IAN を覆う歯槽骨の表面を, IAN を露出するために除去した。露出した IAN を持ち上げ切開し, 神経の切断面を隙間なく下顎管に戻した。Sham 群は IANX 以外の処置を上記に記載したものと同様に行った。術後は, いずれも切開部分を 6-0 絹縫合糸にて縫合した。

3. 口腔顔面部皮膚の機械的感受性

行動試験に先立って, ラットに機械刺激を与えている間, 前壁に小さな穴の開いたケージから鼻を突出したまま留まっているように約 1 週間毎日訓練した^{5, 20)}。また, ラットは刺激を与えている間, いつでも自由に逃避することが可能な状況下で行動実験を行った。訓練後, von Frey filament (Touch-Test, North Coast Medical, Morgan Hill, CA, USA) を用いて, IANX 群同側, 反対側と Sham 群同側の上眼瞼部皮膚 (三叉神経第一枝領域: V1) または口髭部皮膚 (三叉神経第二枝領域: V2) へ機械刺激を与え, MHWT を測定した。MHWT は

各刺激強度で5回ずつ（持続時間：1秒）測定し、3回以上逃避行動を誘発した時の最低強度として算出した。IANX または Sham 手術後 14 日間、上眼瞼部皮膚または口髭部皮膚の MHWT を計測した。全ての行動試験は盲検条件下で行った。また、今回のモデル動物においては運動障害は観察されなかった。

4. 選択的ギャップ結合阻害薬あるいは衛星細胞活性阻害薬の TG 内投与の機械痛覚過敏に対する影響

ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で麻酔し、脳定位固定装置にて頭部を固定した。頭蓋骨を露出させ、小穴（直径：1 mm）を TG における V1-V2 と三叉神経第三枝領域（V3）の分岐点直上の頭蓋骨（後部泉門から 2.8 mm 前方、矢状縫合横方向に 2.7 mm）に開けた。IANX または Sham 群に対して、処置と同側の TG 内に穴を介してガイドカニューレを刺入（頭蓋表面下方に 9 mm）し、ステンレス製の釘 3 本および歯科用セメントで頭蓋骨に固定した。少なくともカニューレ刺入完了後 7 日目以降に実験を行った。

Gap27 (3 mM, Tocris Bioscience, Bristol, UK) は生理食塩水 (vehicle) に溶解した。Gap27 あるいは vehicle の TG 内持続投与のために、ラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で深麻酔し、30 ゲージの注射針をガイドカニューレを介して頭蓋骨の表面から 9.5 mm 下の TG 内に刺入した。注射針はソフトマイクロシリコンチューブ（直径 0.8 mm）を介して Gap27 を充填した浸透圧ポンプ（ALZET ポンプモデル 2002, Durect, Cupertino, CA, USA, 総容量：200 μ l）と接続し、ポンプはラットの背部皮下に埋入した。浸透圧ポンプを用いて、9 日間（0.5 μ l/h, 0 日目～8 日目）Gap27 または vehicle を持続的に投与した。

TG における Gap27 単回投与のため、2%イソフルランの麻酔下においてガイドカニューレを介して頭蓋骨の表面から 9.5 mm 深部の TG 内に 10 μ l のハミルトンシリンジに接続された 30 ゲージの注射針を挿入した。その後、IANX または Sham 手術後 4 日目に、Gap27 または vehicle (1 μ l) を TG に投与した。

Gap27 の TG 内持続投与または単回投与を行ったラットに対して、IANX 後 1, 2, 4, 6 および 8 日目に MHWT を測定した。さらに、IANX 後 9 日目、TG の V1-V2 と V3 における Cx43 および GFAP 発現量を測定した。また、IANX 群において、0.01 M phosphate buffered saline (PBS) で溶解した FC, あるいは FC に対する vehicle として 0.01 M PBS を TG 内に持続投与 (9 日間) し、TG 内における Cx43 の発現量を測定した。

5. TG 細胞における Cx43 および GFAP 発現の免疫組織化学的検索

Sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 深麻酔下にて IANX または Sham 手術時に 30 ゲージの針を用いて、逆行性トレーサーであるフルオロゴールド (FG : hydroxystilbamidine, Fluorochrom, Denver, CO, USA) を生理食塩水に溶解して 4% 溶液としたもの 10 μ l をラット左側口髭部皮膚に注射した。Gap27 (3 mM) または vehicle を持続投与した IANX または Sham 手術後 8 日目のラットを sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) で深く麻酔し、生理食塩水にて脱血後、0.1 M リン酸緩衝液 (PB) で希釈した 4% パラホルムアルデヒド溶液 (pH 7.4) を用いて灌流した。灌流固定終了後 TG を摘出し、4°C で 4 時間以上にわたり同固定液で後固定した。20% スクロース含有 PBS 溶液に 12 時間浸漬した後、TG を Tissue Tek (Sakura Finetechnical, Tokyo, Japan) に包埋し、-20°C で保存した。その後クライオスタットにて TG を長軸に沿って 12 μ m の厚さで切片を作製した。120 μ m ごとに、MAS-GP マイクロスライドガラス (Matsunami, Osaka, Japan) 上にマウントし、室温で一晩乾燥した。切片を 0.01 M PBS で洗浄後、4% normal goat serum (NGS, Sigma-Aldrich) を含む 0.3% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) に溶解した rabbit anti-Cx43 polyclonal antibody (1 : 200, Sigma-Aldrich) および mouse anti-GFAP monoclonal antibody (1 : 1000, Merck Millipore, Billrica, MA, USA) に 4°C で一晩インキュベートした。その後切片を 0.01 M PBS で洗浄し、0.3% Triton X-100 を加えた 0.01 M PBS に溶解した anti-rabbit Alexa Fluor 568 IgG (1 : 200, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) および anti-mouse Alexa Fluor 488 IgG (1 : 200, Thermo Fisher

Scientific) に 2 時間, 室温で反応させた。0.01 M PBS で洗浄後, 切片を封入材 (Thermo Fisher Scientific) を用いて封入し, BZ-9000 システム (Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察した。

GFAP 陽性 (-IR) 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞によって周囲を 1/2 以上囲まれた FG 標識 TG 細胞数および細胞断面積を SensivMeasure (Mitani, Fukui, Japan) を用いて測定した。GFAP-IR 細胞によって周囲を囲まれた FG 標識 TG 細胞の割合および V2 または V3 における GFAP-IR 細胞, または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞に周囲を囲まれた FG 標識 TG 細胞の割合は以下の計算式: GFAP-IR 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞 / FG 標識 TG 細胞の総数 \times 100% で算出した。細胞断面積を計測することによって分類した細胞群について細胞のサイズに関する分析を実施した。また, 免疫陽性反応は, 一次抗体の非存在下では観察されなかった。

6. ウェスタンブロッティング

IANX または Sham 手術後 1, 8, 14 日目, または Naive ラットにおいて, sodium pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) 深麻酔下にて, 生理食塩水を用い脱血後, TG を摘出した。摘出した TG は lysis buffer (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1% NP40, 10% glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 1 g/ml leupeptin, 0.5 mM sodium vanadate) 内で, 4°C に保った状態でホモジナイズした。同様に, IANX 群への Gap27 または vehicle の TG 内持続投与後 8 日目に, V1-V2 および V3 の TG を摘出しホモジナイズした。組織を 15,000 rpm, 4°C で 10 分間遠心分離した後, 上清を回収し, 総タンパク量を protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて測定した。タンパク量 30 μ g のサンプルを 10% SDS-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis (30 分, 200V) で電気泳動した後, Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, CA, USA) を用いて polyvinylidene difluoride membrane (Trans-Blot Turbo Transfer Pack, Bio-Rad) に転写した。

メンブレンは、0.1% Tween 20 を含む Tris Buffered Saline (TBST, Bio-Rad) で洗浄した後、3% Bovine Serum Albumin (BSA, Bovogen, Essendon, Australia) で 30 分間ブロッキングした。その後、5%BSA 含有 TBST を溶媒とした rabbit anti-Cx43 polyclonal antibody (1 : 2000, Sigma-Aldrich) または mouse anti-GFAP monoclonal antibody (1 : 1000, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) に 4°C で一晩反応させた。

TBST で洗浄後、horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit IgG-horseradish peroxidase (Cell Signaling, Beverly, MA, USA) または horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse antibody (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA) および Western Lightning ELC Pro (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) で、室温で一時間反応させ可視化した。バンド強度は ChemiDoc MP システム (Bio-Rad) を使用して解析し、コンピューター解析イメージング分析システム (Image J 1.37v, NIH) を用いて定量化した。

7. 統計学的解析

結果は平均 ± SEM として表した。統計学的解析は、one-way analysis of variance (ANOVA) を行った後 Newman-Keuls または Tukey の多重比較検定、あるいは two-way ANOVA 後 Bonferroni の多重比較検定を行った。有意水準は、 $P < 0.05$ とした。

成績

1. IANX 後の機械痛覚の変化

IANX ラットの同側上眼瞼部皮膚あるいは口髭部皮膚における MHWT は、IANX 群の対側あるいは Sham 群と比較して、IANX 後 1 日目に有意に低下し、この閾値の低下は 14 日目まで継続した (第 1 図 a, b)。さらに Sham 群と比較して IANX 群の反対側の MHWT は、上眼瞼部皮膚において IANX 後 12 日目、口髭部皮膚において IANX 後 14 日目に、有意に低下した。なお、実験期間中のラットの体重は正常に増加していた (データは示さず)。

2. IANX 後の TG における Cx43 と GFAP の発現

IANX 後 8 日目、IANX と同側の TG には Cx43 と GFAP が発現し、GFAP-IR 細胞は Cx43 免疫陽性を示した (第 2 図 a, b, c)。IANX と同側の TG における Cx43 タンパクの発現量は、Sham 群あるいは Naive 群と比較し IANX 後 8 日目に有意に増加した (Naive: 4.8 ± 0.9 , Sham: 5.5 ± 0.9 , IANX: 12.4 ± 2.2) (第 2 図 d)。IANX と同側の TG における GFAP タンパクの発現量は、処置後 8 日目の Sham 群, 1, 8 および 14 日目の Naive 群と比較して有意に増加していた (Naive: 10.8 ± 1.7 , IANX on day 1: 26.2 ± 4.1 , IANX on day 8: 28.2 ± 1.2 , IANX on day 14: 25.0 ± 3.1) (第 2 図 e)。

IANX 群および Sham 群では、処置後 8 日を経過すると、TG 内の V2 および V3 共に、FG 標識 TG 細胞の周囲を取り囲む GFAP-IR 細胞および Cx43-IR 細胞の発現が認められた (第 3 図 a)。IANX 後 8 日目において、GFAP-IR 細胞または GFAP-IR/Cx43-IR 細胞に周囲を囲まれた FG 標識細胞数は、V2 および V3 共に Sham 群と比較して有意に増加していた (GFAP-IR, V2: $41.2 \pm 3.7\%$, V3: $47.5 \pm 2.2\%$, GFAP-IR and Cx43-IR, V2: $31.4 \pm 1.7\%$, V3: $37.3 \pm 1.7\%$) (第 3 図 b)。

3. IANX 後の機械痛覚過敏に対する TG 内 Gap27 投与の効果

IANX 同側における上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚の機械痛覚過敏に対する Gap27 の TG 内持続投与の効果をも、IANX 後 1, 2, 4, 6 および 8 日目で検討した。TG 内 Gap27 持続投与開始 1 日目から 8 日目まで、IANX と同側に発症する機械痛覚過敏は有意に抑制された（第 4 図 a, b）。さらに、IANX 後 4 日目に TG 内へ Gap27 を単回投与したときの IANX と同側における上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚に生じた機械痛覚過敏の変化をも、IANX 後 1, 2, 4, 5, 6 および 8 日目で検討した。IANX 後 4 日目における TG への Gap27 単回投与により、機械痛覚過敏は有意に抑制された（第 5 図 a, b）。なお、実験期間中に実験動物に運動障害は観察されなかった（データは示さず）。

4. Gap27 投与後の TG における Cx43 と GFAP 発現変化

Naive 群において、GFAP-IR 細胞かつ Cx43-IR 細胞に周囲を囲まれた FG 標識 TG 細胞が少数ではあるが観察された（第 6 図 a）。また、IANX または Sham 手術後 8 日目においては、GFAP-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞が観察された（第 6 図 b, c）。IANX 後 8 日目においては、Gap27 投与群の方が vehicle 投与群に比較して GFAP-IR 細胞で囲まれた FG 標識 TG 細胞数は有意に少なかった（Naive : $21.2 \pm 2.6\%$, IANX/vehicle : $48.6 \pm 2.6\%$, IANX/Gap27 : $26.4 \pm 5.1\%$ ）（第 6 図 d）。さらに、Gap27 投与群において、細胞断面積 $199 \mu\text{m}^2$ 以下の小型 TG 細胞群の GFAP-IR 細胞に周囲を囲まれた FG 標識 TG 細胞数が有意に減少した（vehicle : $9.8 \pm 3.1\%$, Gap27 : $3.1 \pm 1.6\%$ ）（第 6 図 e）。一方、IANX 群および Sham 群の FG 標識 TG 細胞数には有意差は認められなかった（データは示さず）。

さらに、本研究では IANX 群において TG 内に Gap27 を持続投与したラットについて、TG の V1-2 および V3 の Cx43 と GFAP 発現を、ウエスタンブロッティング法にて定量解析した。Gap27 持続投与により、V1-2 および V3 において Cx43 発現は有意に低下した（vehicle : $6.7 \pm 1.6\%$ in V1-V2, Gap27 : 4.4 ± 0.1 in V1-V2, vehicle : 2.8 ± 0.2 in V3, Gap27 : 2.4 ± 0.1 in V3）（第 7 図 a, b）。同様に、V1-2 および V3 において GFAP 発現は有意に減少した（vehicle :

4.0 ± 0.3 in V1-V2, Gap27 : 2.4 ± 0.4 in V1-V2, vehicle : 1.1 ± 0.1 in V3, Gap27 : 0.7 ± 0.1 in V3)

(第 7 図 c, d)。

5. FC 投与による Cx43 発現の変化

IANX 後 8 日目の群においては, Cx43 発現は FC 投与群の方が vehicle 投与群に比べ有意に減少した (Naive : 2.8 ± 0.3 , IANX/vehicle : 4.6 ± 0.4 , IANX/FC : 3.4 ± 0.2) (第 8 図)。

考察

著者の研究グループにおいて、IANXにより同側の第二枝非損傷神経支配領域において痛覚過敏が引き起こされることを報告した^{5,6)}。本研究では、さらにIANX後、同側の口髭部皮膚だけでなく上眼瞼部皮膚においても機械痛覚過敏が誘導されることを示した。また、IANXの反対側の上眼瞼部皮膚と口髭部皮膚においても機械痛覚過敏が観察された。最近、眼窩下神経が損傷されると、延髄の吻側腹内側部からのセロトニン放出が増加し、同側の三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)における一次求心性神経中枢末端においてTRPV1の合成が促進し、口腔顔面領域に異所性顔面疼痛が発症することが報告された²¹⁾。末梢神経損傷に関するヒトおよび実験動物モデルを用いた研究から、脊髄レベルでの疼痛伝達機構の可塑的变化が反対側の痛覚過敏発症に関与していることが明らかにされているが²²⁻²⁵⁾、この現象の一つとして、末梢神経損傷後、傷害側のDRGで産生された神経成長因子が血行性に反対側のDRGに運ばれ、このDRGにおける新たな神経突起の発芽および異所性シナプス形成が関与すると考えられている²⁶⁾。また一方で、三叉神経損傷に伴い、口腔顔面領域からの侵害情報が入力するVcにおいてミクログリアが活性化され^{27,28)}、この活性化型ミクログリアが腫瘍壊死因子(TNF) α 、インターロイキン-1 β (IL-1 β) および脳由来神経栄養因子(BDNF)などの分子を放出し、二次ニューロンの興奮性を変調させ、痛覚過敏が発症するという報告もある²⁹⁾。しかし、三叉神経損傷後のミクログリアの活性化は、両側のVcに誘導されるが、反対側のミクログリアの活性化はやや弱いといわれている^{30,31)}。これらの報告から、IANXによって口腔顔面領域全体に誘導される機械痛覚過敏には、両側のVcにおけるミクログリアの活性化が関与している可能性が考えられる。また、両側のVcにおけるミクログリアの活性化強度の差が、IANXの反対側に誘導される機械痛覚過敏の程度の差を反映しているのかもしれない。しかしながら、三叉神経損傷に起因する活性化ミクログリアの二次ニューロン興奮性調節メカニズムにはいまだ不明な点が多く、さらなる研究が必要である。

グリア細胞に発現するギャップ結合の主要な構成要素である Cx43 は、末梢神経損傷後に発現が亢進し、細胞間コミュニケーションの変調に関与することが分かっている^{13, 32, 33)}。細胞外シグナル調節プロテインキナーゼ (ERK) および p38 のリン酸化は、坐骨神経損傷後の衛星細胞において誘導される³⁴⁾。さらに、虚血動物モデルにおいて DRG の衛星細胞での Janus kinase 2 (JAK2) のリン酸化が亢進する³⁵⁾。また、アストロサイトにおける JAK/STAT シグナル伝達系 (JAK/STAT) の活性化は、Cx43 を介したアストロサイト間のシグナル伝達を促進する³⁶⁾。Cx43 の発現およびギャップ結合に応じた細胞間コミュニケーションの活性もまた、プロテインキナーゼ C (PKC) -ERK シグナル伝達カスケードを介して増強される³⁷⁾。本研究において、Cx43 は同側 TG の活性型衛星細胞に発現し、さらに IANX 後 8 日目においては Cx43 のタンパク発現も有意に増加した。以上の結果から、IANX 後の活性型衛星細胞における Cx43 の発現増強は、JAK/STAT または PKC-ERK シグナル伝達経路を介して誘導された可能性がある。

本研究では、TG の V2 および V3 における GFAP 発現および活性型衛星細胞に存在する Cx43 発現が増加したことから、IANX 後の衛星細胞に発現する Cx43 活性化が衛星細胞活性化の伝播に関与している可能性がある。V1-V2 および V3 における衛星細胞の活性化と Cx43 発現は TG 内 Gap27 持続投与によって有意に抑制された。衛星細胞活性化阻害薬である FC の持続投与もまた TG 内の Cx43 発現量を減少させた。さらに、Gap27 の TG 内持続投与は、口髭部皮膚における機械痛覚過敏を抑制した。ギャップ結合は、隣接するグリア細胞を連結し、隣接するグリア細胞間における小さな分子の通過を可能にしている³⁸⁻⁴¹⁾。これらのうち、カルシウムイオン (Ca^{2+}) はグリア細胞間のギャップ結合を介して通過することにより細胞間カルシウムウェーブ (ICWs) を引き起こす^{42, 43)}。衛星細胞において、ICWs はグルタミン酸の放出を誘導するとともに、内向き整流カリウムチャネル 4.1 (Kir4.1) の発現減少および低コンダクタンスカルシウム活性型カリウムチャネル 3 (SK3) を活性化し、細胞内 Ca^{2+} 上昇を引き起こす^{39, 44, 45)}。TG 細胞において、代謝型グルタミン酸受容体 5 (mGluR5)

を介したグルタミン酸シグナルは、TG 細胞の興奮性を増大させて口腔顔面領域に機械痛覚過敏をもたらす⁴⁶⁾。これらの報告と本研究結果とを合わせて考察すると、IANX 後、TG において Cx43 で構成されるギャップ結合を介した衛星細胞の活性化伝播が、TG 細胞の興奮性を増大させ、口髭部皮膚における異所性機械痛覚過敏を発症させることが推察された。

これまでに、中枢神経系の活性型アストロサイトで認められる Cx43 も、三叉神経損傷または炎症に起因した口腔顔面領域の痛覚異常に関与していることが報告されている^{3, 47-49)}。Cx43 はアストロサイトで発現し、末梢神経損傷後に発現量が増加する^{14, 50)}。ギャップ結合阻害薬の髄腔内投与は、眼窩下神経損傷や歯髄炎により引き起こされる延髄後角侵害受容ニューロンの興奮性増大を減弱し、顔面部皮膚の機械痛覚過敏を抑制した^{51, 52)}。これらの結果は、延髄後角における Cx43 で構成されるアストロサイトのギャップ結合が口腔顔面領域における疼痛過敏において重要な役割を果たしていることを示している。

一般的に、DRG または TG における侵害受容に関係する小径ニューロンは、無髄 (C) または細径有髄 (A δ) 軸索をもつことが知られている⁵³⁾。興味深いことに、mGluR5 はラットの小型 DRG ニューロンにおいて多く発現しており、TG 細胞における mGluR5 を介したグルタミン酸シグナルは TG 細胞の興奮性増大と口髭部皮膚の機械痛覚過敏に深く関与することが報告されている⁵⁴⁾。また、本研究では、IANX 後 4 日目における Gap27 の TG 内単回投与により、一過性に口髭部皮膚における機械痛覚過敏が抑制された。この結果は、IANX 後における活性型衛星細胞の持続的なグルタミン酸の放出が TG 細胞の興奮性増大に関与することを示唆していると考えられる。

結論

IANX 後に発症する口髭部皮膚および上眼瞼部皮膚における異所性機械痛覚過敏には、Cx43 から構成されているギャップ結合を介した TG での衛星細胞活性化の伝播が関与していることが明らかになった。このことから、感覚神経節におけるギャップ結合を介した衛星細胞活性化の抑制が、末梢神経損傷に起因した異所性疼痛を改善するための有望な治療法となりうるかもしれない。

謝辞

稿を終えるあたりに、本研究遂行に格別たるご指導ご鞭撻を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座の清水典佳教授，生理学講座の岩田幸一教授，篠田雅路准教授に謹んで心より感謝申し上げます。

また、本研究を通じ多大なるご協力とご助言を賜りました，生理学講座，歯科矯正学講座の皆様に深く感謝いたします。

なお、本研究は、日本大学歯学部総合歯学研究所研究費，日本大学大学院歯学研究科研究費（学生研究費），日本大学歯学部佐藤研究費，日本大学歯学部上村安男・治子研究費，日本大学学術研究助成金総合研究費および私立大学戦略的研究基盤形成支援事業研究費の一部の援助によってなされました。

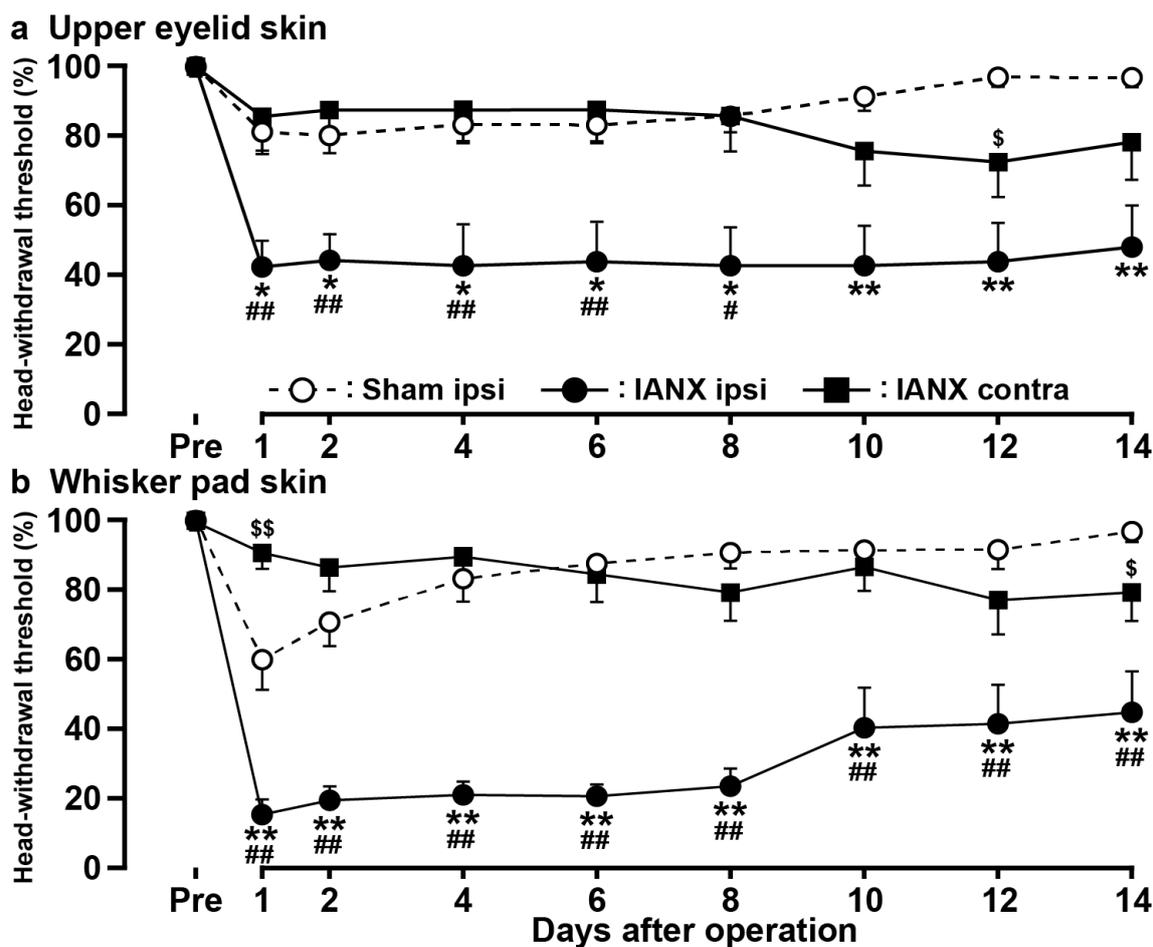
引用文献

- 1) Renton T, Yilmaz Z and Gaballah K (2012) Evaluation of trigeminal nerve injuries in relation to third molar surgery in a prospective patient cohort. Recommendations for prevention. *Int J Oral Maxillofac Surg* 41, 1509-1518.
- 2) Khawaja N and Renton T (2009) Case studies on implant removal influencing the resolution of inferior alveolar nerve injury. *Br Dent J* 206, 365-370.
- 3) Okada-Ogawa A, Suzuki I, Sessle B J, Chiang C Y, Salter M W, Dostrovsky J O, Tsuboi Y, Kondo M, Kitagawa J, Kobayashi A, Noma N, Imamura Y and Iwata K (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci* 29, 11161-11171.
- 4) Okada-Ogawa A, Nakaya Y, Imamura Y, Kobayashi M, Shinoda M, Kita K, Sessle B J and Iwata K (2015) Involvement of medullary GABAergic system in extraterritorial neuropathic pain mechanisms associated with inferior alveolar nerve transection. *Exp Neurol* 267, 42-52.
- 5) Sugiyama T, Shinoda M, Watase T, Honda K, Ito R, Kaji K, Urata K, Lee J, Ohara K, Takahashi O, Echizenya S and Iwata K (2013) Nitric oxide signaling contributes to ectopic orofacial neuropathic pain. *J Dent Res* 92, 1113-1117.
- 6) Hitomi S, Shinoda M, Suzuki I and Iwata K (2012) Involvement of transient receptor potential vanilloid 1 in ectopic pain following inferior alveolar nerve transection in rats. *Neurosci Lett* 513, 95-99.
- 7) Hanani M (2005) Satellite glial cells in sensory ganglia: from form to function. *Brain Res Brain Res Rev* 48, 457-476.
- 8) Woodham P, Anderson P N, Nadim W and Turmaine M (1989) Satellite cells surrounding axotomised rat dorsal root ganglion cells increase expression of a GFAP-like protein. *Neurosci Lett* 98, 8-12.
- 9) Hironaka K, Ozaki N, Hattori H, Nagamine K, Nakashima H, Ueda M and Sugiura Y (2014) Involvement of glial activation in trigeminal ganglion in a rat model of lower gingival cancer pain. *Nagoya J Med Sci* 76, 323-332.
- 10) Liu F Y, Sun Y N, Wang F T, Li Q, Su L, Zhao Z F, Meng X L, Zhao H, Wu X, Sun Q, Xing G G and Wan Y (2012) Activation of satellite glial cells in lumbar dorsal root ganglia contributes to neuropathic pain after spinal nerve ligation. *Brain Res* 1427, 65-77.
- 11) Matsuura S, Shimizu K, Shinoda M, Ohara K, Ogiso B, Honda K, Katagiri A, Sessle B J, Urata K and Iwata K (2013) Mechanisms underlying ectopic persistent tooth-pulp pain following pulpal inflammation. *PLoS One* 8, e52840.
- 12) Hansson E and Skjoldebrand E (2015) Coupled cell networks are target cells of inflammation, which can spread between different body organs and develop into systemic chronic inflammation. *J Inflamm (Lond)* 12, 44.
- 13) Bennett M V, Garre J M, Orellana J A, Bukauskas F F, Nedergaard M and Saez J C (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487, 3-15.
- 14) Chen M J, Kress B, Han X, Moll K, Peng W, Ji R R and Nedergaard M (2012) Astrocytic CX43 hemichannels and gap junctions play a crucial role in development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Glia* 60, 1660-1670.
- 15) Vit J P, Jasmin L, Bhargava A and Ohara P T (2006) Satellite glial cells in the trigeminal ganglion as a determinant of orofacial neuropathic pain. *Neuron Glia Biol* 2, 247-257.
- 16) Pannese E, Ledda M, Cherkas P S, Huang T Y and Hanani M (2003) Satellite cell reactions to axon injury of sensory ganglion neurons: increase in number of gap junctions and formation of bridges connecting previously separate perineuronal sheaths. *Anat Embryol (Berl)* 206, 337-347.

- 17) Ohara P T, Vit J P, Bhargava A and Jasmin L (2008) Evidence for a role of connexin 43 in trigeminal pain using RNA interference in vivo. *J Neurophysiol* 100, 3064-3073.
- 18) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 19) Saito K, Hitomi S, Suzuki I, Masuda Y, Kitagawa J, Tsuboi Y, Kondo M, Sessle B J and Iwata K (2008) Modulation of trigeminal spinal subnucleus caudalis neuronal activity following regeneration of transected inferior alveolar nerve in rats. *J Neurophysiol* 99, 2251-2263.
- 20) Kitagawa J, Takeda M, Suzuki I, Kadoi J, Tsuboi Y, Honda K, Matsumoto S, Nakagawa H, Tanabe A and Iwata K (2006) Mechanisms involved in modulation of trigeminal primary afferent activity in rats with peripheral mononeuropathy. *Eur J Neurosci* 24, 1976-1986.
- 21) Kim Y S, Chu Y, Han L, Li M, Li Z, Lavinka P C, Sun S, Tang Z, Park K, Caterina M J, Ren K, Dubner R, Wei F and Dong X (2014) Central terminal sensitization of TRPV1 by descending serotonergic facilitation modulates chronic pain. *Neuron* 81, 873-887.
- 22) Arguis M J, Perez J, Martinez G, Ubre M and Gomar C (2008) Contralateral neuropathic pain following a surgical model of unilateral nerve injury in rats. *Reg Anesth Pain Med* 33, 211-216.
- 23) Wasner G, Naleschinski D, Binder A, Schattschneider J, McLachlan E M and Baron R (2008) The effect of menthol on cold allodynia in patients with neuropathic pain. *Pain Med* 9, 354-358.
- 24) Hatashita S, Sekiguchi M, Kobayashi H, Konno S and Kikuchi S (2008) Contralateral neuropathic pain and neuropathology in dorsal root ganglion and spinal cord following hemilateral nerve injury in rats. *Spine (Phila Pa 1976)* 33, 1344-1351.
- 25) Nomura H, Ogawa A, Tashiro A, Morimoto T, Hu J W 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 transection. *Pain* 95, 225-238.
- 26) Cheng C F, Cheng J K, Chen C Y, Rau R H, Chang Y C and Tsaor M L (2015) Nerve growth factor-induced synapse-like structures in contralateral sensory ganglia contribute to chronic mirror-image pain. *Pain* 156, 2295-2309.
- 27) Shibuta K, Suzuki I, Shinoda M, Tsuboi Y, Honda K, Shimizu N, Sessle B J and Iwata K (2012) Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Res* 1451, 74-86.
- 28) Terayama R, Fujisawa N, Yamaguchi D, Omura S, Ichikawa H and Sugimoto T (2011) Differential activation of mitogen-activated protein kinases and glial cells in the trigeminal sensory nuclear complex following lingual nerve injury. *Neurosci Res* 69, 100-110.
- 29) Taves S, Berta T, Chen G and Ji R R (2013) Microglia and spinal cord synaptic plasticity in persistent pain. *Neural Plast* 2013, 753656.
- 30) Ma F, Zhang L, Oz H S, Mashni M and Westlund K N (2015) Dysregulated TNFalpha promotes cytokine proteome profile increases and bilateral orofacial hypersensitivity. *Neuroscience* 300, 493-507.
- 31) Piao Z G, Cho I H, Park C K, Hong J P, Choi S Y, Lee S J, Lee S, Park K, Kim J S and Oh S B (2006) Activation of glia and microglial p38 MAPK in medullary dorsal horn contributes to tactile hypersensitivity following trigeminal sensory nerve injury. *Pain* 121, 219-231.
- 32) Chew S S, Johnson C S, Green C R and Danesh-Meyer H V (2010) Role of connexin43 in central nervous system injury. *Exp Neurol* 225, 250-261.
- 33) Neumann E, Hermanns H, Barthel F, Werdehausen R and Brandenburger T (2015) Expression changes of microRNA-1 and its targets Connexin 43 and brain-derived neurotrophic factor in the peripheral nervous system of chronic neuropathic rats. *Mol Pain* 11, 39.
- 34) Obata K, Yamanaka H, Dai Y, Mizushima T, Fukuoka T, Tokunaga A and Noguchi K (2004) Differential activation of MAPK in injured and uninjured DRG neurons following chronic constriction injury of the sciatic nerve in rats. *Eur J Neurosci* 20, 2881-2895.

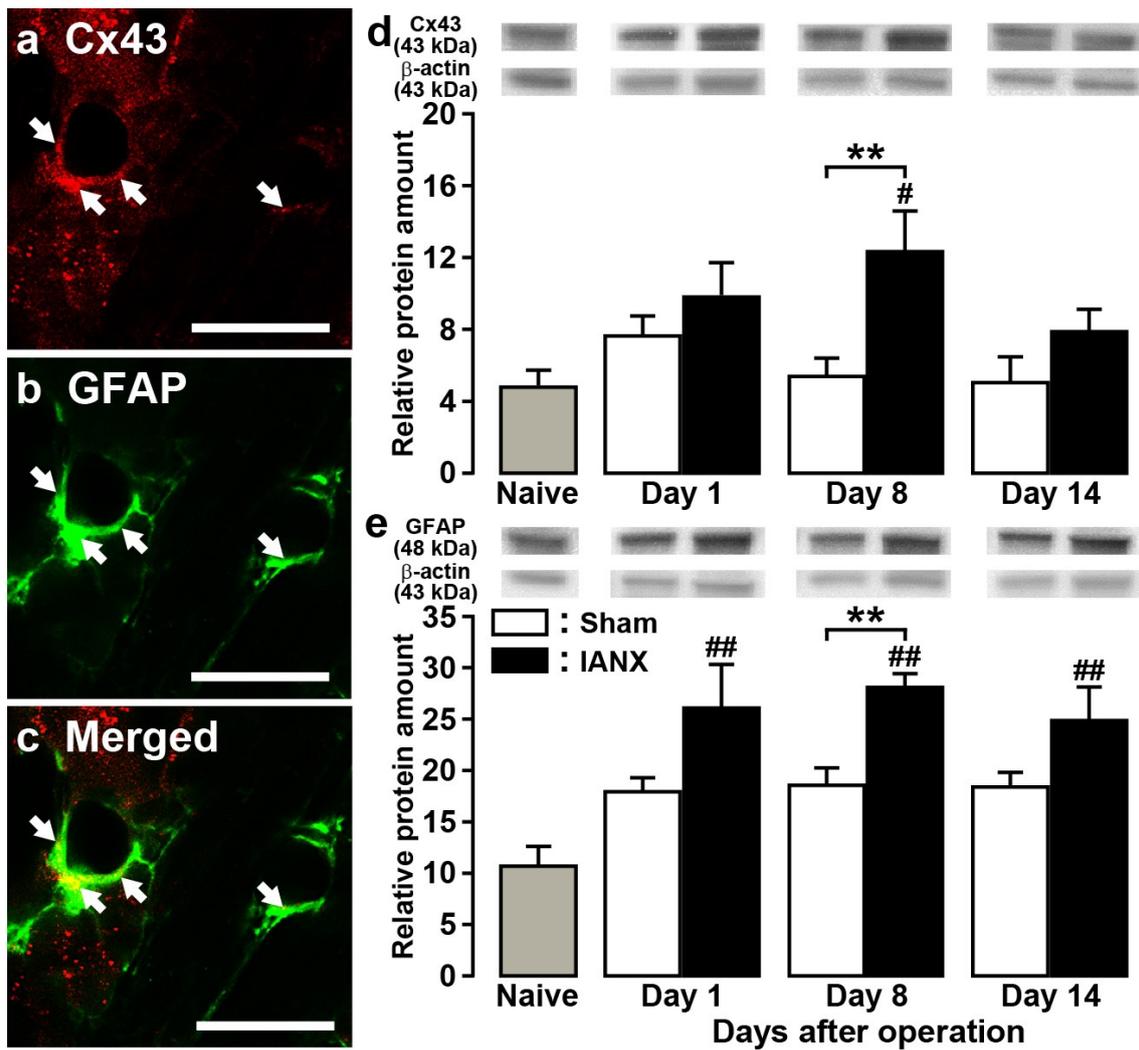
- 35) Campana W M and Myers R R (2003) Exogenous erythropoietin protects against dorsal root ganglion apoptosis and pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 18, 1497-1506.
- 36) Ozog M A, Bernier S M, Bates D C, Chatterjee B, Lo C W and Naus C C (2004) The complex of ciliary neurotrophic factor-ciliary neurotrophic factor receptor alpha up-regulates connexin43 and intercellular coupling in astrocytes via the Janus tyrosine kinase/signal transducer and activator of transcription pathway. *Mol Biol Cell* 15, 4761-4774.
- 37) Lin P C, Shen C C, Liao C K, Jow G M, Chiu C T, Chung T H and Wu J C (2013) HYS-32, a novel analogue of combretastatin A-4, enhances connexin43 expression and gap junction intercellular communication in rat astrocytes. *Neurochem Int* 62, 881-892.
- 38) Huang T Y, Cherkas P S, Rosenthal D W and Hanani M (2005) Dye coupling among satellite glial cells in mammalian dorsal root ganglia. *Brain Res* 1036, 42-49.
- 39) Weick M, Cherkas P S, Hartig W, Pannicke T, Uckermann O, Bringmann A, Tal M, Reichenbach A and Hanani M (2003) P2 receptors in satellite glial cells in trigeminal ganglia of mice. *Neuroscience* 120, 969-977.
- 40) De Pina-Benabou M H, Srinivas M, Spray D C and Scemes E (2001) Calmodulin kinase pathway mediates the K⁺-induced increase in Gap junctional communication between mouse spinal cord astrocytes. *J Neurosci* 21, 6635-6643.
- 41) Scemes E, Suadicani S O and Spray D C (2000) Intercellular communication in spinal cord astrocytes: fine tuning between gap junctions and P2 nucleotide receptors in calcium wave propagation. *J Neurosci* 20, 1435-1445.
- 42) Scemes E and Giaume C (2006) Astrocyte calcium waves: what they are and what they do. *Glia* 54, 716-725.
- 43) Giugliano M (2009) Calcium waves in astrocyte networks: theory and experiments. *Front Neurosci* 3, 160-161.
- 44) Wagner L, Warwick R A, Pannicke T, Reichenbach A, Grosche A and Hanani M (2014) Glutamate release from satellite glial cells of the murine trigeminal ganglion. *Neurosci Lett* 578, 143-147.
- 45) Vit J P, Ohara P T, Bhargava A, Kelley K and Jasmin L (2008) Silencing the Kir4.1 potassium channel subunit in satellite glial cells of the rat trigeminal ganglion results in pain-like behavior in the absence of nerve injury. *J Neurosci* 28, 4161-4171.
- 46) Chung M K, Lee J, Joseph J, Saloman J and Ro J Y (2015) Peripheral group I metabotropic glutamate receptor activation leads to muscle mechanical hyperalgesia through TRPV1 phosphorylation in the rat. *J Pain* 16, 67-76.
- 47) Ren K and Dubner R (2015) Activity-triggered tetrapartite neuron-glia interactions following peripheral injury. *Curr Opin Pharmacol* 26, 16-25.
- 48) Lu Y, Jiang B C, Cao D L, Zhang Z J, Zhang X, Ji R R and Gao Y J (2014) TRAF6 upregulation in spinal astrocytes maintains neuropathic pain by integrating TNF-alpha and IL-1beta signaling. *Pain* 155, 2618-2629.
- 49) Liu X, Tian Y, Lu N, Gin T, Cheng C H and Chan M T (2013) Stat3 inhibition attenuates mechanical allodynia through transcriptional regulation of chemokine expression in spinal astrocytes. *PLoS One* 8, e75804.
- 50) Nagy J I, Dudek F E and Rash J E (2004) Update on connexins and gap junctions in neurons and glia in the mammalian nervous system. *Brain Res Brain Res Rev* 47, 191-215.
- 51) Wang H, Cao Y, Chiang C Y, Dostrovsky J O and Sessle B J (2014) The gap junction blocker carbenoxolone attenuates nociceptive behavior and medullary dorsal horn central sensitization induced by partial infraorbital nerve transection in rats. *Pain* 155, 429-435.
- 52) Chiang C Y, Li Z, Dostrovsky J O and Sessle B J (2010) Central sensitization in medullary dorsal horn involves gap junctions and hemichannels. *Neuroreport* 21, 233-237.
- 53) Gold M S and Gebhart G F (2010) Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nat Med* 16, 1248-1257.

- 54) Valerio A, Rizzonelli P, Paterlini M, Moretto G, Knopfel T, Kuhn R, Memo M and Spano P (1997) mGluR5 metabotropic glutamate receptor distribution in rat and human spinal cord: a developmental study. *Neurosci Res* 28, 49-57.



第1図：IANXに伴う機械痛覚過敏の継時的変化

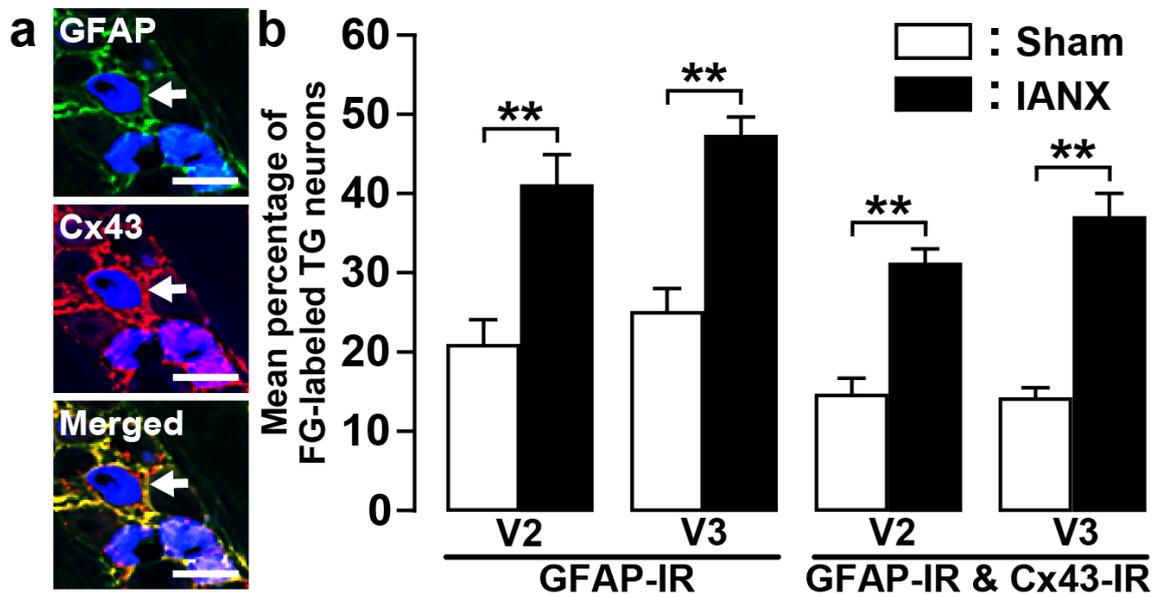
IANX または Sham 群の両側の上眼瞼部皮膚 (a) および口髭部皮膚 (b) における MHWT の測定。結果は、術前 MHWT を 100% として標準化した時の各群の MHWT の% (mean ± SEM) で表した。\$ $P < 0.05$, \$\$ $P < 0.01$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; compared to sham-operated rats. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared to contralateral side. (n = 8 in each group; two-way ANOVA with repeated measures, followed by Bonferroni's multiple-comparison tests)



第2図：IANXに伴うTGにおけるCx43およびGFAPの発現

IANX後8日目におけるCx43-IR細胞(a)、GFAP-IR細胞(b)、Cx43-IR細胞とGFAP-IR細胞(c)の免疫組織学的検定。矢印は、二重免疫陽性細胞を示す。スケールバー：50 μm。β-actinタンパクをコントロールとして、TGにおけるCx43(d)およびGFAP(e)の相対的タンパク発現量をIANXまたはSham手術後1, 8, 14日目およびNaive群において示した。

** $P < 0.01$; compared to sham-operated rats. # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; compared to naive rats. (n = 8 in each group; one-way ANOVA followed by Newman-Keuls's multiple-comparison tests)

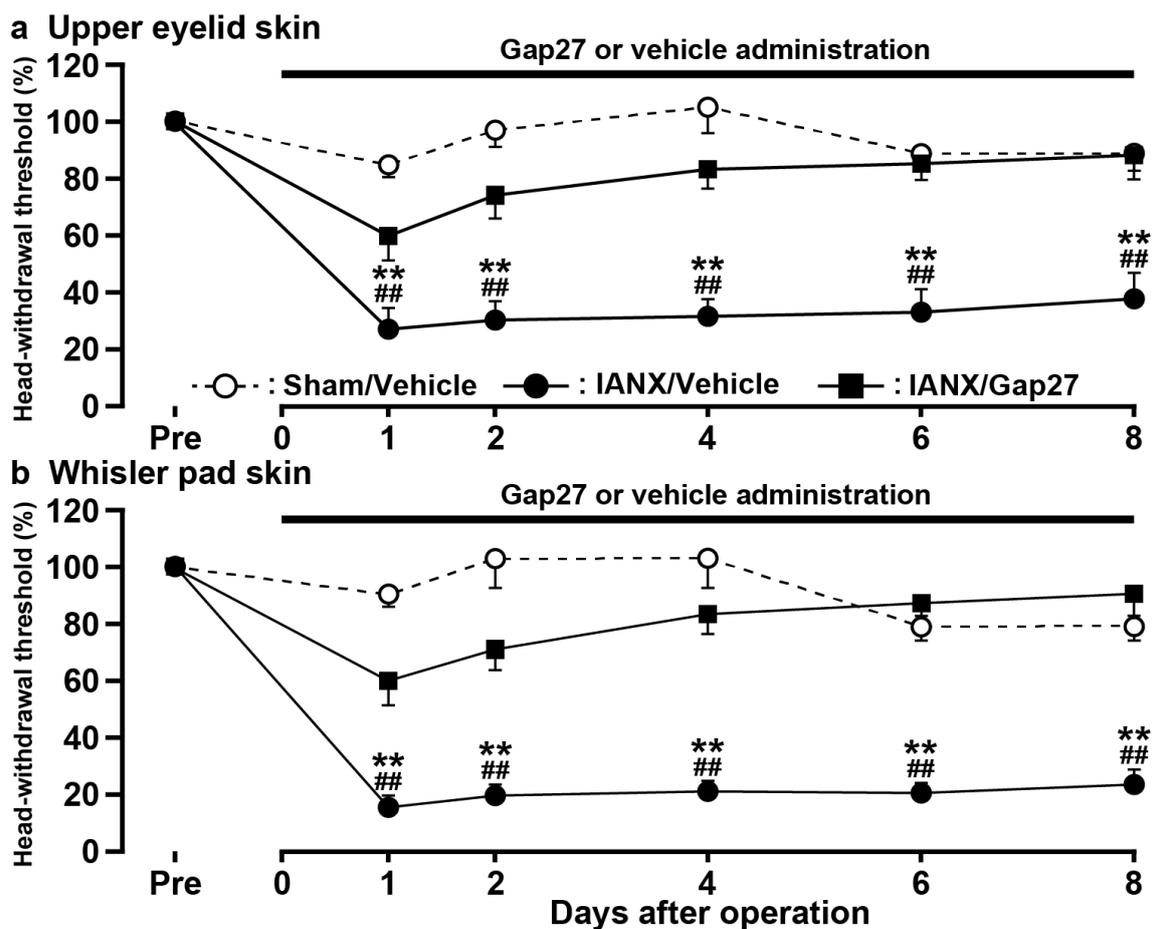


第3図：IANX後のV2およびV3におけるTG内のCx43およびGFAP発現

(a) IANX後8日目のTGのV3におけるCx43-IR/GFAP-IR細胞の顕微鏡写真を示す (Sham群も同様であった)。スケールバー：50 μ m。

(b) IANXあるいはSham手術後8日目におけるV2またはV3のTG内のGFAP-IR細胞あるいはCx43-IR/GFAP-IR細胞に取り囲まれるFG標識TG細胞の平均百分率を示す。

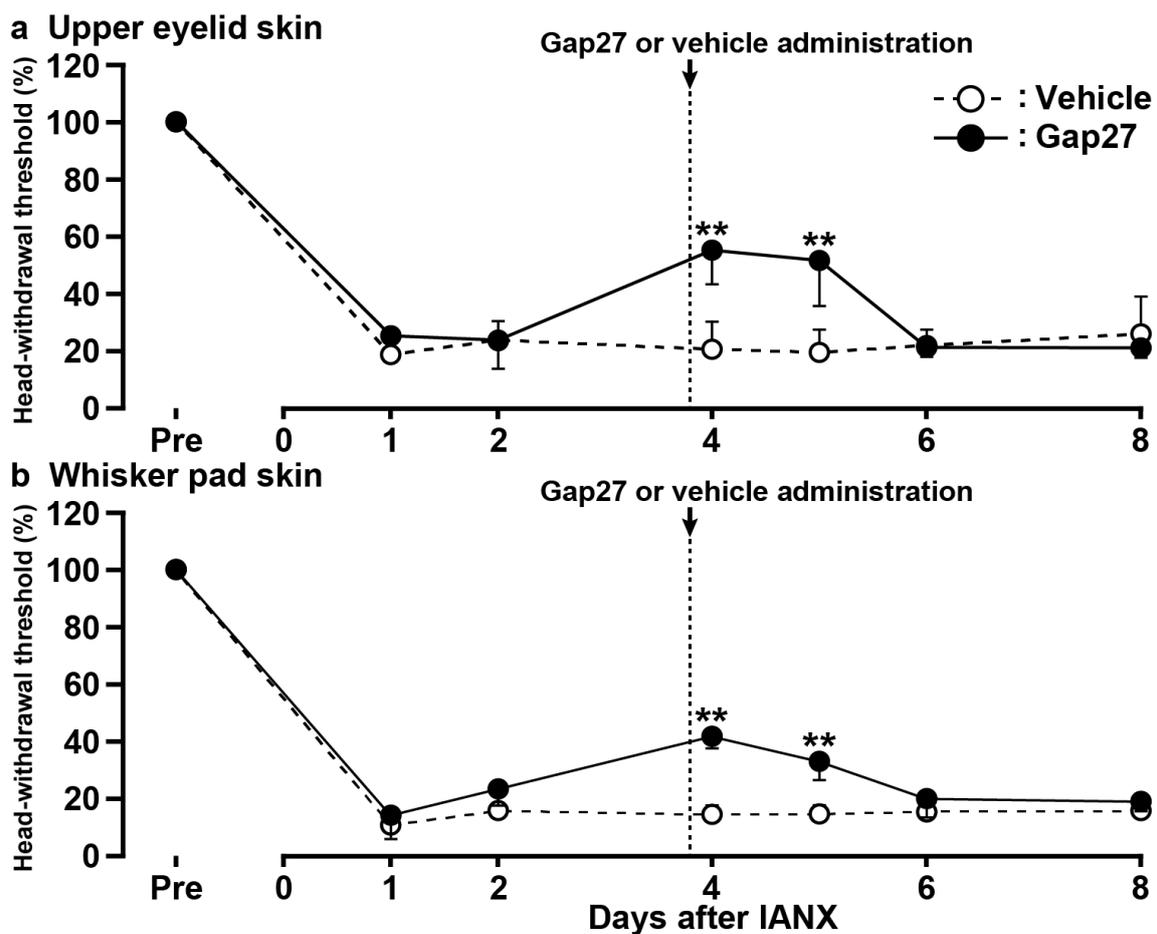
** $P < 0.01$ ($n = 4$ in each group; one-way analysis of ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison tests)



第4図：IANXに伴う顔面領域における機械痛覚過敏におけるGap27のTG内への持続投与の効果

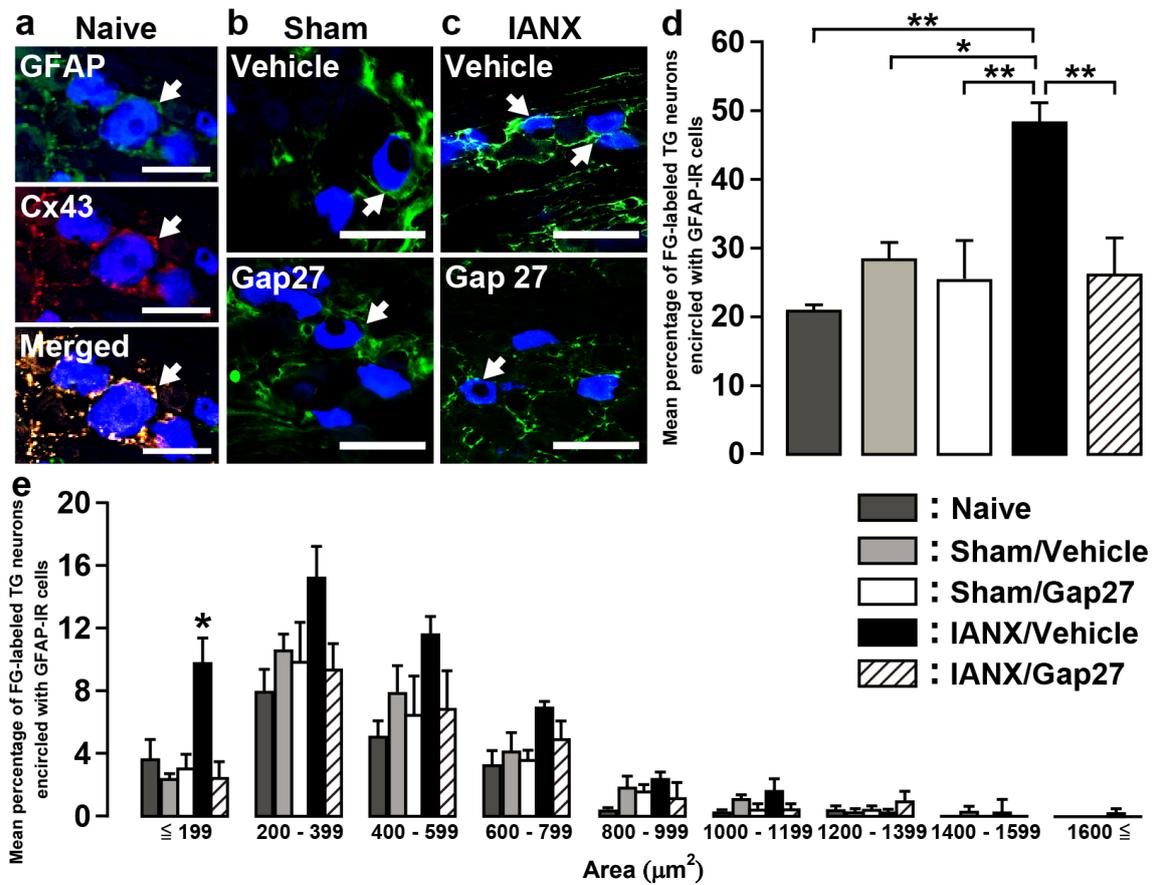
ShamまたはIANX群へのTG内Gap27または溶媒(Vehicle)持続投与における上眼瞼部皮膚(a)および口髭部皮膚(b)でのMHWTの継時的変化。

$P < 0.01$ vs. pre value; ** $P < 0.01$ vs. value of IANX group with TG continuous-administration of Gap 27. (n = 8 in each group; two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's multiple-comparison tests)

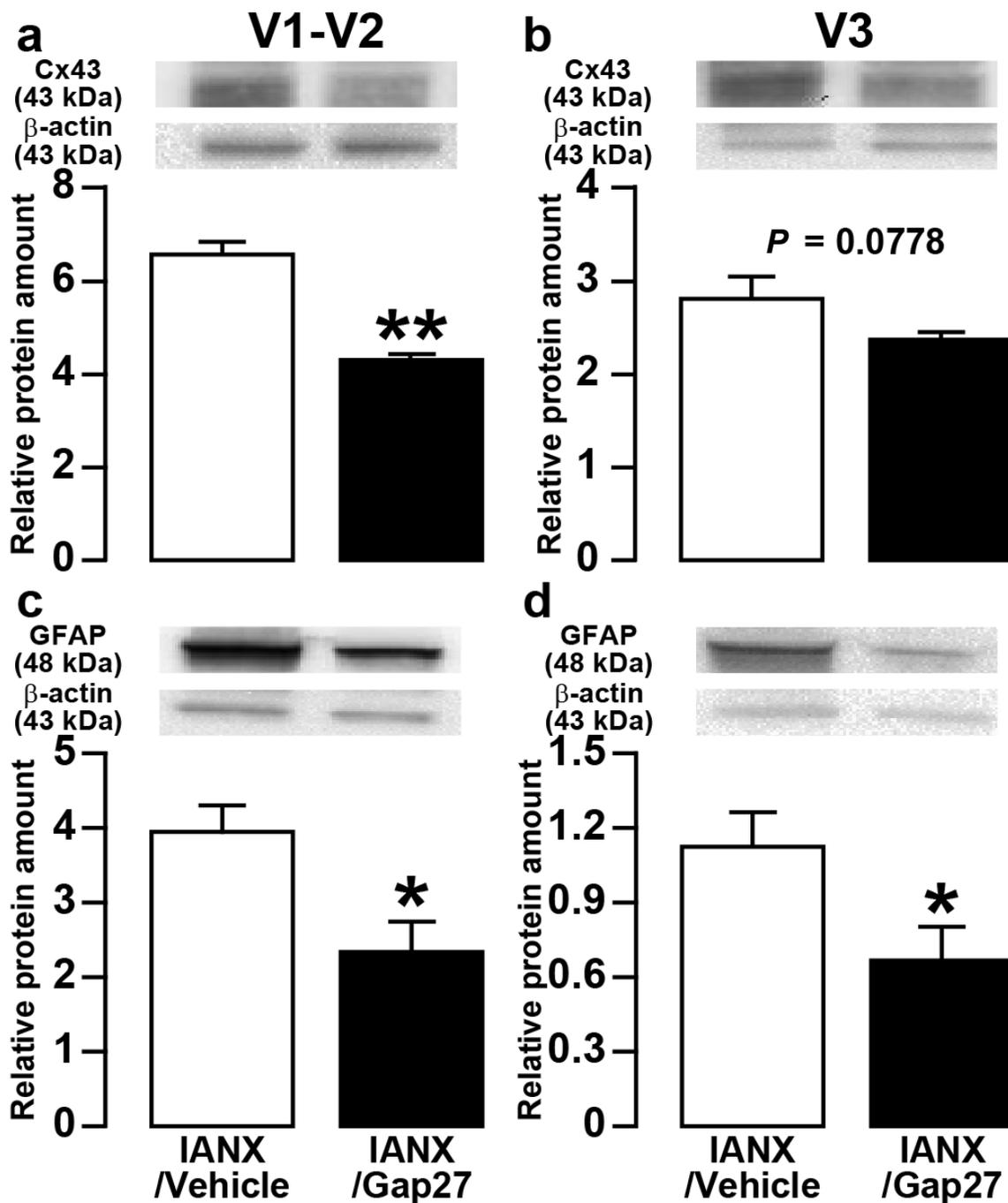


第5図：IANXに伴う顔面領域での機械刺激におけるGap27のTG内単回投与の効果 ShamまたはIANXラットへのTG内Gap27またはVehicle単回投与における上眼瞼部皮膚(a)および口髭部皮膚(b)でのMHWTの継時的変化。

** $P < 0.01$ (n = 8 in each group; two-way ANOVA with repeated measures followed by Bonferroni's multiple-comparison tests)



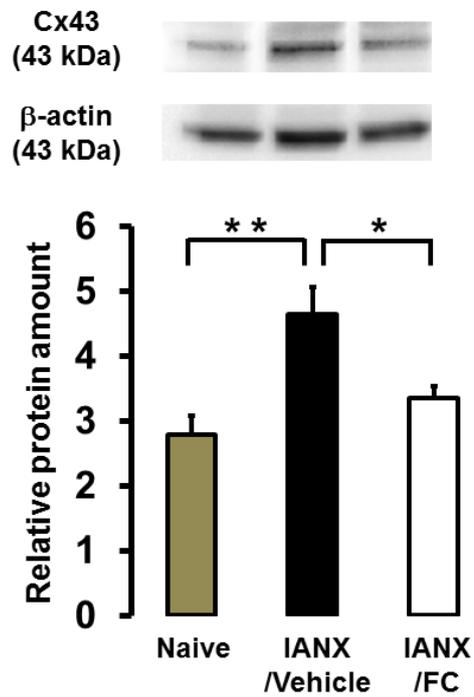
第6図：IANX後のTG内の衛星細胞の活性化におけるGap 27持続投与の効果
 Naive群におけるFG標識TG細胞でのCx43-IR/GFAP-IR細胞の顕微鏡写真(a)，およびVehicleまたはGap27持続投与を行ったIANXあるいはSham群における口髭部皮膚におけるFG標識TG細胞を取り囲むGFAP-IR細胞の顕微鏡写真(b, c)を示す。矢印はFG標識TG細胞を示す。スケールバー：50 μm 。また，VehicleまたはGap27持続投与を行ったIANXあるいはSham手術後8日目におけるGFAP-IR細胞に取り囲まれるFG標識TG細胞の平均百分率(d)および細胞断面積サイズ分布(e)を示す。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n = 4 in each group; one-way analysis of ANOVA followed by Tukey's multiple-comparison tests)



第7図：IANXに伴うTG内Cx43およびGFAP発現におけるGap27のTG内持続投与の効果

IANX後8日目のTGのV1-V2およびV3におけるCx43のタンパク発現相対量(a, b)およびTGのV1-V2およびV3におけるGFAPのタンパク発現相対量(c, d)を示す。なおβ-actinタンパクをコントロールとした。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n = 8 in each group; Student's *t*-test)



第 8 図 : IANX に伴う TG 内 Cx43 発現における FC の TG 内持続投与の効果
 IANX 後 8 日目の TG における Cx43 のタンパク発現相対量を示す。なおβ-actin タンパク
 をコントロールとした。
 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (n = 5 in each group; one-way analysis of ANOVA followed by
 Tukey's multiple-comparison test)