

氏名	山本 祐也
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5306号
学位授与の日付	平成28年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Activated microglia contribute to convergent nociceptive inputs to spinal dorsal horn neurons and the development of neuropathic pain (神経障害性疼痛の発症メカニズム:末梢神経損傷後の脊髄後角におけるミクログリアの活性化と収斂性侵害情報伝達)
論文審査委員	松尾 龍二 教授 宮脇 卓也 教授 杉本 朋貞 教授

学位論文内容の要旨

末梢神経の損傷は、しばしば痛覚過敏やアロディニアなどの神経障害性疼痛を引き起こし、組織学的には末梢組織の侵害刺激による c-Fos(脊髄および延髄後角における侵害受容2次ニューロンの活動のマーカー)の誘発を増強する。また近年我々は末梢神経損傷が、脊髄後角内の侵害情報伝達の様式に重大な変化を惹起し、2次ニューロンに対する過剰な侵害情報の収斂が発生することを報告した。一方、末梢神経損傷は脊髄後角内のグリア細胞にも影響を持つことが知られており、ミクログリアの病的活性化が神経障害性疼痛の発症に関与することが示唆されている。本研究ではラットの脛骨神経を切断し、これによって惹起される神経障害性疼痛と侵害情報の病的収斂に対するミクログリアの活性化阻害の効果を検証した。

神経損傷とミクログリア活性化阻害薬投与: 成熟雄性 S.D.系ラットを用い、麻酔下で一側の坐骨神経の枝である脛骨神経を露出、7-0絹糸にて2か所結紮し、その間を切断した。ミノサイクリン(30mg/kg,ip)を24時間間隔で8回投与した。投与時期は神経損傷手術の1時間前に開始するもの(ミノサイクリン0-7日)と損傷7日後に開始するもの(7-14日)に分け、さらにそれぞれの対照実験(生食群)を行った。

行動実験: 機械的刺激、熱刺激による2種類の行動実験を術前の薬剤投与直前、術後3、7、14日後に行った。機械的刺激に対し逃避行動をとった値(PWT)および、熱刺激に対し逃避行動をとるまでの時間(PWL)を記録した。

術前のPWTは8~12gであった。損傷側は、術後3日で生食またはミノサイクリン投与に関わらず術前と比較し15~18gと有意な上昇が起こったが、生食群では術後14日に4gまで低下した。これに対し、ミノサイクリン(0-7日)群では術後14日で10gと損傷前と同様の値を示した。ミノサイクリン(7-14日)群は14日後で5gと有意に低下し、生食群との間に有意差は認められなかった。

PWLは術前で9-11秒であった。損傷側は、術後3日で生食またはミノサイクリン投与に関わらず13秒とPWLの有意な延長が起こったが、生食群およびミノサイクリン(7-14日)群では術後14日で7秒

と損傷前より有意に短縮した。一方、ミノサイクリン（0-7日）群は術後14日でも損傷前と同様の値を維持した。

ミクログリアの免疫組織染色：術後14日の行動実験終了後にラットを灌流固定し、脊髄の第4、5腰髄節（L4/5）を摘出し、ミクログリアのマーカーであるOX-42を用いた間接蛍光抗体法による組織染色を行った。OX-42の免疫反応は神経交織にびまん性に広がり、個々の細胞の形態を識別できなかったため、画像解析では免疫反応の蛍光強度を測定し、L4/5のI/II層の単位面積当たりの強度を算出した。偽手術（上記と同様の方法で手術はしたが、結紮、切断は省略した）を行ったラット（偽手術群）の反対側（非手術側）と生食群の反対側に差が認められなかったため、すべての実験群の損傷側のデータを生食群の反対側の平均蛍光密度と比較した。

OX-42の免疫反応は、生食群の損傷側で反対側の3.5倍の反応強度を示し、有意差を認めた。ミノサイクリン（7-14日）群の損傷側は生食群の損傷側と同様の免疫反応を示したが、ミノサイクリン（0-7日）群の損傷側においては生食群の反対側と比較して有意差が認められなかった。

2次ニューロンの活動マーカー：行動実験とは別のラットに神経損傷とミノサイクリン投与を実施し、神経損傷の14日後に刺激を行った後、組織化学的検索のため灌流固定を行った。固定2時間前に熱刺激として損傷側の後足に10秒間熱水（55℃）に浸し、固定15分前に露出した脛骨神経の近位断端に5mA、5ミリ秒、5Hzの矩形波で10分間電気刺激を行った。灌流固定後、L4/5の10μmの切片を作製し、免疫組織染色を行い、c-Fos陽性細胞数、p-ERK陽性細胞数および二重陽性細胞数を比較した。c-Fos、リン酸化ERK（p-ERK）はともに侵害受容2次ニューロンの興奮を標識するマーカーであり、c-Fosの免疫活性の誘発には興奮から15分以上の時間を要し、2時間後に最大になる。一方、ERKの免疫活性は15分までに最大となり、2時間後には消失する。

生食を投与した場合、c-Fos陽性細胞はL4/5のI/II層で多数認められたが、p-ERK陽性細胞及び二重陽性細胞はI/II層の内側部（脛骨神経領域）に集中していた。

ミノサイクリン（0-7日）群ではc-Fos細胞は生食群と比較して有意に少なくI/II層の内側部ではほとんど認められず、外側部（総腓骨神経領域）に集中していた。p-ERK細胞は内側部で多数認められ、陽性細胞数は生食群と有意差を認めなかった。二重染色細胞数は生食群と比較して有意に少なかった。ミノサイクリン（7-14日）群ではそれぞれの陽性細胞の空間的分布は生食群と類似しており、陽性細胞数は生食群と比較し有意差を認めなかった。

上記の結果から、神経損傷後の早期に誘発される脊髄後角内のミクログリアの活性化を阻害することにより、本来の末梢受容野から隔離された脊髄後角内侵害受容2次ニューロンに対する周囲受容野からの侵害情報の収斂投射が阻止され、神経障害性疼痛の発症が抑制されたものと考えられる。

論文審査結果の要旨

末梢神経の損傷は、しばしば痛覚過敏やアロディニアなどの神経障害性疼痛を引き起こし、組織学的には末梢組織の侵害刺激による c-Fos（脊髄および延髄後角における侵害受容 2 次ニューロンの活動のマーカー）の誘発を増強する。また、末梢神経の損傷は脊髄後角内の侵害情報伝達の様式に重大な変化を惹起し、2 次ニューロンに対する過剰な侵害情報の収斂を発生させる。一方、末梢神経損傷は脊髄後角内のグリア細胞にも影響を持つことが知られており、ミクログリアの病的活性化が神経障害性疼痛の発症に関与することが示唆されている。本研究はこれらの背景を踏まえ、末梢神経切断によって惹起される神経障害性疼痛と侵害情報の病的収斂に対するミクログリアの活性化阻害の効果を検証したものである。

ラットの脛骨神経を切断した場合、切断 3 日後に痛覚鈍麻がみられた。すなわち、足底部の輻射熱刺激に対する逃避行動の潜時 (PWL) が延長し、von Frey hair を用いて測定した機械的刺激に対する逃避行動の誘発閾値 (PWT) が上昇した。しかし、切断 7 日後ではこれらの指標が回復傾向を示し、14 日後では神経切断前と比較しても PWL の短縮と PWT の低下がみられ、神経障害性疼痛の発症が確認された。また、脊髄後角内侵害受容 2 次ニューロンの活動マーカーについては、切断後 14 日目に後足への侵害性熱刺激によって c-Fos を、脛骨神経の切断端への電気刺激によって ERK のリン酸化を誘発し、それぞれの発現潜時の差を利用して免疫二重染色を行った結果、坐骨神経の投射を受ける髄節の後角において c-Fos とリン酸化 ERK の二重標識によって示される侵害情報伝達の収斂を受けるニューロン数が増加した。

上記実験モデルに対し、手術日から 8 日間連続でミクログリアの活性化阻害効果を持つミノサイクリン (30mg/kg/day, ip) を投与した結果、OX-42 の免疫染色性の上昇によって示されるミクログリアの活性化が抑制されるとともに、切断後 14 日目にみられる過剰な逃避行動と侵害情報の収斂投射が抑制された。なおミノサイクリンの投与時期を切断 7 日後から 8 日間とした場合には、これらの抑制効果はみられなかった。

以上の結果から、神経損傷後の早期に誘発される脊髄後角内のミクログリアの活性化を阻害することにより、本来の末梢受容野から隔離された脊髄後角内侵害受容 2 次ニューロンに対する周囲受容野からの侵害情報の過剰な収斂が阻止され、神経障害性疼痛の発症が抑制されたものと考えられる。

本学位論文の内容は、末梢神経損傷によって惹起される神経障害性疼痛の発症機序を理解するうえで重要な知識を追加するとともに、その予防あるいは治療に向けての研究のひとつの方向性を示唆するものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。