

論文審査の結果の要旨

氏名：石川 学

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Role of orexin receptor subtypes in the inhibitory effects of orexin-A on the potassium chloride-induced increase in intracellular calcium ion levels in neurons derived from dorsal root ganglion of carrageenan-treated rats

(カラゲニン処置ラットの後根神経節由来の神経細胞内カルシウムイオン量の増大に対してオレキシン A が示した抑制効果の発現におけるオレキシン受容体サブタイプの役割)

審査委員：(主 査) 教授 吉垣 純子
(副 査) 教授 河相 安彦
教授 渋谷 鑠

オレキシン A およびオレキシン B は、睡眠覚醒サイクルと摂食行動の調節に関わるだけでなく、全身麻酔からの覚醒や鎮痛効果との関連性について注目されている神経ペプチドである。オレキシン受容体には OX_1 と OX_2 受容体の存在が確認され、脊髄を含む中枢神経系に広く分布している。オレキシン A は OX_1 および OX_2 の両受容体に同程度の親和性があるが、オレキシン B は OX_1 受容体に比べ OX_2 受容体へ高い親和性を示す。オレキシン A の脊髄への投与は OX_1 受容体を介して、機械的刺激に対するラットの回避行動を抑制することから、オレキシン A が脊髄の侵害受容に関わる神経伝達に関与している。感覚神経細胞の興奮に対するオレキシン A の作用機構は明らかでないが、末梢の機械刺激を伝える脊髄への C 線維を含む 1 次感覚神経に影響を与える可能性が考えられる。

起炎物質のカラゲニンをラットの後肢足底へ局所投与すると、侵害行動を含む炎症症状を実験的に誘発することができる。ラットの後根神経節 (dorsal root ganglion: DRG) から分離した C 線維様小型神経細胞の細胞内 Ca^{2+} 量 ($[Ca^{2+}]_i$) は塩化カリウム (KCl) の負荷により増大するが、カラゲニン処置のラットではこの KCl が誘発した $[Ca^{2+}]_i$ の増大はオレキシン A により強く抑制されることが知られている。これらのことは、炎症を伴う個体では C 線維様小型神経細胞の脱分極をオレキシン A が抑制することを示している。しかし、カラゲニン処置ラットの神経細胞の KCl 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ の増加に対して、オレキシン A が示した抑制効果の発現メカニズムは明らかにされていない。また、DRG の神経細胞には OX_1 および OX_2 受容体が確認されている。

そこで本研究では、カラゲニン処置ラットの DRG から得た C 線維様の神経細胞の KCl 誘発性の $[Ca^{2+}]_i$ の増加に対するオレキシン A の抑制効果の発現機構について、オレキシン受容体サブタイプの関与の面から解析した。

実験には、Wistar 系雄性ラットを用いて、生理食塩液または 2%カラゲニン含有生理食塩液を後肢足底へ 0.25 ml 皮下投与した。床にナイロン製の網を備えた観察ケージに収容したラットの後肢の足底中央部を 10 g および 26 g の曲げ強さの von Frey filament で 1 回 3 秒間、3 回刺激して回避行動とともに回避閾値を測定した。カラゲニン処置の直前から処置後 7 日まで 24 時間毎に行った。回避行動をスコア化 (反応なし: 0, わずか遅い反応, あるいは, わずかで遅い反応: 1, 刺激した後肢の挙上と舐め行動は伴わない速やかな反応: 2, 刺激した後肢の挙上と舐め行動のいずれかまたは両方を伴う顕著な反応: 3) し、スコアで 1 を誘発した von Frey filament の曲げ強さの平均値 (g) を回避閾値とした。また、カラゲニン投与から 24 時間後 (1 日) のラットから分離した神経細胞における $[Ca^{2+}]_i$ の変化を解析した。ラットの DRG から分離した神経細胞にカルシウム蛍光プローブの Fluo-4/AM を負荷し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて C 線維様小型神経細胞 (直径約 20 μm) の $[Ca^{2+}]_i$ の変化を蛍光強度比 (F/F_0 ; F: 任意の時点での蛍光強度, F_0 : 基礎的な蛍光強度) により評価した。蛍光強度は、基礎値を 30 秒間記録したのち、vehicle またはオレキシン A をそれぞれ単独か、 OX_1 受容体拮抗薬の SB 334867 と OX_1 と OX_2 両受容体拮抗薬の MK-4305 のいずれかと併用して記録した。

その結果、以下のような結論が得られた。

1. 回避行動は、生理食塩液投与群（対照群）では 10 g 刺激の測定期間中 0 のままで変化がなかった。カラゲニン処置群では、処置から 1 日で 10 g 刺激による回避行動が約 2.3 まで亢進した。この回避行動は処置から 6 日にわたり 2 から 3 を示した。26 g 刺激では対照群の回避行動は測定期間を通じておよそ 1 であった。カラゲニン処置群では、処置から 1 日で 26 g 刺激による回避行動は 3 まで亢進し、7 日間持続した。

2. 回避閾値は、対照群ではおよそ 26 g のままで推移し変化がなかった。カラゲニン処置群では、処置前の 26 g から 1 日で約 8.6 g まで低下し、7 日間持続した。

3. 蛍光強度比 (F/F_0) は、対照群では、KCl (25 mM) の添加により平均値はおよそ 2.0 まで増加した。 F/F_0 の増大は、オレキシン A (20 pmol) 単独投与、オレキシン A (20 pmol) と MK-4305 (200 pmol) または SB 334867 (2 pmol) の併用投与ではいずれも影響を受けなかった。一方、カラゲニン処置群の F/F_0 の平均値は KCl (25 mM) の添加で約 2.0 まで増加したが、オレキシン A (20 pmol) の投与により抑制された。オレキシン A による F/F_0 の抑制効果は、MK-4305 (200 pmol) の併用で減弱したが、SB 334867 (2 pmol) の併用では影響を受けなかった。

回避行動の解析の結果、ラットの後肢足底へのカラゲニンの投与から 1 日で機械刺激に対する回避反応の亢進と回避閾値の顕著な低下が生じた。カラゲニン処置群から得た神経細胞の KCl による F/F_0 の増加は、オレキシン A により強く抑制された。この F/F_0 の増大に対するオレキシン A の抑制効果は、 OX_1 と OX_2 の両受容体拮抗薬の MK-4305 で打ち消されたが、 OX_1 受容体拮抗薬の SB 334867 では影響を受けなかった。

以上のことから、ラット後肢足底へのカラゲニン投与により、同部位への機械的刺激からの回避が促進したラット DRG 由来の C 線維様小型神経細胞において、KCl が誘発した $[Ca^{2+}]_i$ の増加をオレキシン A が OX_2 受容体の活性化を介して抑制することが示唆された。

本研究の結果は、侵害受容性疼痛の脊髄伝導路におけるオレキシン A 受容体の関与について明らかにしたものであり、歯科麻酔学とくに疼痛制御の分野に大きく寄与するものと考えられる。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成 29 年 2 月 23 日