

論文の内容要旨

氏名：佐藤 有華

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：眼窩下神経損傷モデルラットにおける神経障害性疼痛の発症機構

神経障害性疼痛は、持続的あるいは間歇的な自発痛や非侵害刺激で誘発される痛み（アロディニア）、侵害刺激に対する過剰な反応（痛覚過敏）を特徴とする。抜歯や外科的矯正手術などの口腔外科的処置により三叉神経が傷害されると、口腔粘膜や顔面皮膚に神経障害性疼痛が引き起こされることがある。その多くは難治性で治療に苦慮することが多く、神経障害性疼痛の適切な診断および治療法を確立するためには、その発症のメカニズムを解明することが極めて重要である。

侵害刺激が組織に加わると、グルタミン酸がalpha-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 受容体と結合してシナプス伝達となされる。また、神経障害性疼痛モデルにおいては、AMPA受容体サブユニットの一つであるGluR1がリン酸化されたphosphorylated GluR1 (pGluR1) が中枢神経で増加しており、疼痛発症に関与している可能性が報告されている。そこで本研究では、三叉神経第二枝の枝である眼窩下神経 (infraorbital nerve: ION) を傷害することにより引き起こされる神経障害性疼痛に対して、ニューロンの興奮性マーカーとして用いられるphosphorylated extra-cellular signal-regulated kinase (pERK) を指標に、GluR1のリン酸化 (pGluR1) が関与するメカニズムを明らかにすることを目的とした。

塩酸メドミジン、ミダゾラムと洒石酸ブトルファノールを混合した三種混合麻酔下で、雄性Sprague-Dawley系ラットの左側上顎臼歯部歯肉頬移行部に縦切開を施し、IONを剖出して腹側半分を結紮した後、切開創を縫合し、ION部分損傷モデルラット (IONI群) を作製した。同様に神経の剖出のみを行い結紮は行わずに創を縫合したものをSham群として実験に用いた。IONIによる疼痛発症メカニズムについて侵害刺激に対する反応を行動学的に解析するとともに、pERKおよびpGluR1の発現を免疫組織化学的手法およびWestern blot法によって解析した。

IONI前と3日後に口髭部皮膚へ機械刺激を与えて頭部逃避反応閾値 (HWT) を測定した。その結果、HWTは処置前と比較してIONI後3日目に有意な低下を示した。

IONIもしくはsham処置後3日目のラットの口髭部に三種混合麻酔下でフォンフライヘアを用いて侵害的機械刺激 (強度: 60 g, 持続時間: 10分, 間隔: 1秒, 刺激回数: 600回) を加えた後、灌流固定して延髄を摘出し、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) におけるpERK陽性細胞の発現を観察した。その結果、obexより2400 μ m尾側において、IONI群でSham群に比べて有意に多くのpERK陽性細胞の発現を認めた。次に、上記と同様の刺激を与えて灌流したIONI群でpERKとpGluR1の免疫組織化学的解析を行って、pERK陽性細胞とpGluR1陽性細胞の関係を検討した。併せて侵害的機械刺激を行わずに灌流したIONI群でpGluR1と神経細胞マーカーであるneuronal nuclei (NeuN) の免疫組織化学的解析を行って、pGluR1陽性細胞とニューロンの関係を検討した。その結果、IONI後にVc浅層に発現したpERK陽性細胞はpGluR1を共発現しており、pGluR1陽性細胞はNeuNを共発現していた。また、pGluR1陽性細胞数はSham群と比べIONI群で多い傾向が認められた。

次に、IONI3日前に三種混合麻酔下にラットの頭蓋骨へ小穴を開けて大槽内にカニューレを挿入し、浸透圧ポンプを利用してERKリン酸化阻害薬であるPD98059もしくは溶媒を持続投与した動物を作製した (PD群およびVehicle群)。機械刺激に対するHWTの変化を計測するとともに、VcにおけるpERK陽性細胞発現の変化を免疫組織化学的に解析した。その結果、PD群のHWTは、IONI後も明らかな低下を示さず、Vehicle群に比べて明らかな高値を呈した。また、pERK陽性細胞の発現についても、PD群ではVehicle群に比べ著しく少なかった。

さらに、IONIに起因するGluR1とpGluR1タンパク発現量の変化をWestern blot法を用いて検討した。Naïve群、IONI群、Sham群、PD群を生理食塩水で灌流し、取り出した延髄のobexより2400 μ m尾側部付近のVcを摘出し、pGluR1タンパクの発現量について解析を行った。これらの処置はいずれもIONIまたはsham処置後3日に行った。GluR1のタンパク発現量はNaïve群、Sham群、IONI群、PD群間で有意な差は認めなかった。一方、pGluR1タンパクについては、IONI群でSham群と比べて多く認められ、PD群ではIONI群と比べ少量しか発現しない傾向にあった。すなわち、IONIによってpGluR1のタンパク質発現

量は増加し、ERKのリン酸化を阻害することでその発現量が抑えられる傾向を認めた。

これらの結果から以下に示す結論を得た。

1. IONIにより口髭部への機械刺激に対する痛覚過敏が発症した。
2. IONI後、口髭部への機械刺激によって、Vcの三叉神経第二枝領域にpERK陽性細胞の有意な増加が認められた。
3. IONIラットのVcの三叉神経第二枝領域には、pGluR1陽性細胞の増加傾向を認めた。
4. IONIによる機械痛覚過敏は、ERKのリン酸化を阻害することで有意に抑制された。
5. pGluR1はニューロン上に存在し、pERKとpGluR1は機能的に関連する可能性が示された。
6. ERKがリン酸化されることによりGluR1がリン酸化されて、 Na^+ 、 Ca^{2+} の流入が生じることで二次ニューロンが活性化され神経障害性疼痛を発症する可能性が示唆された。

以上から、ION損傷によって引き起こされる口髭部の機械痛覚過敏にはERKのリン酸化とGluR1のリン酸化が重要な役割を担っている可能性が示された。