

論文の内容の要旨

氏名：鈴木 達 郎

博士の専攻分野の名称：博士 (歯学)

論文題名：Regeneration of medullary neuronal circuits following inferior alveolar nerve transection
(下歯槽神経切断後に誘導される延髄内の神経回路再生)

末梢神経障害は、損傷した軸索の種類および重篤度に応じて、痛覚鈍麻および神経障害性疼痛を含む体性感覚障害を引き起こすことが多い。末梢神経の一次求心性神経は、A β , A δ , および C 線維の 3 型に分類される。また、C 線維はカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) およびイソレクチン B4 (IB4) 結合性に基づいて、ペプチド作動性および非ペプチド作動性ニューロンの 2 群に細分される。三叉神経系において、これら CGRP 陽性および IB4 結合性線維 (軸索) は、延髄三叉神経脊髄路核内の異なる層に投射することが明らかにされている。さらに近年、遺伝学的手法を用いた解析により、CGRP 陽性および IB4 結合性線維は、温熱および機械感覚の伝達に関与することが報告されている。しかし、軸索損傷に伴う各ニューロン (C 線維) 群の再生過程については、いまだ不明な点が多く残されている。

細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) は、細胞増殖および分化において重要な役割を果たす酵素である。最近の研究において、さまざまな侵害情報を伝達するニューロン群で特異的に ERK のリン酸化が誘導されることが実証され、この ERK の活性化を指標に、疼痛感覚および侵害反射に関与するニューロンを同定することが可能となった。

そこで本研究では、下歯槽神経の完全切断 (IANX) モデルマウスを用いて、ペプチド作動性および非ペプチド作動性ニューロンの神経回路の回復過程を、逆行性トレーサー (Fluoro-gold, FG), CGRP 抗体陽性 (IR) および IB4 結合性をもとに、解剖学的または免疫組織化学的に解析し、さらにオトガイ皮膚への侵害性熱または機械刺激に対する延髄内での pERK-IR および逃避反射閾値の変化を解析することで、損傷軸索の形態学的かつ機能的な再生過程を評価した。

C57BL/6 マウス (7 週齢, 雄) の左側下顔面皮膚を切開した後、下歯槽神経を露出させ、IANX モデルを作製した。まず始めに、CGRP-IR および IB4 結合性をもとにペプチド作動性および非ペプチド作動性ニューロンの神経損傷後の回復過程を免疫組織化学的に解析した。また、Naïve 群および IANX 群の左側オトガイ皮膚に FG を皮下注射し、IANX 後の軸索再生を評価した。その結果、Naïve 群の三叉神経節 (TG) 領域において、CGRP-IR および IB4 結合性はいずれも中・小型ニューロンで観察され、両者の共存は認められなかった。IANX 3 日後、CGRP 陽性および IB4 結合性細胞の数が顕著に減少したが、IANX 2 週間後には Naïve 群と同程度まで回復した。また、Naïve 群と同様、FG により逆行性に標識されたニューロンの分布は、TG の三叉神経第三枝領域に局限していた。これらの結果は、損傷した下歯槽神経の一部は、IANX 2 週間後には適切な受容野へと軸索を伸長 (再生) したことを示している。一方、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) 領域において、Naïve 群の CGRP-IR ニューロンは主に I 層および II 層外側に、IB4 結合性ニューロンは II 層および III 層内側に分布していた。IANX 3 日後、両者の著しい減少が観察された。IANX 2 週間後、CGRP-IR ニューロンは有意に増加し、Naïve 群レベルまで回復したが、IB4 結合性ニューロンは回復しなかった。この結果は、非ペプチド作動性ニューロンと比較して、ペプチド作動性ニューロンにおいてより再生が起りやすいことを示している。

さらに、この軸索再生過程において、適切な後シナプス細胞に情報伝達が行われているか否かを検討するため、オトガイ皮膚への侵害性機械刺激または熱刺激により生じる ERK 活性を解析した。Naïve 群では Vc-C2 の背側 1/3 領域において ERK のリン酸化が確認された。機械刺激に対する pERK-IR 細胞は主に Vc の I/II 層に局在したが、一部 III 層内側にも認められた。吻尾側的な分布様式の解析から、pERK-IR 細胞は obex -1440~180 μ m (Vc-C2) に広く分布し、その分布率は obex -360 μ m の高さにおいて最大であること、また、機械刺激と比較して、熱刺激依存性 ERK のリン酸化 (pERK 陽性細胞数) は常に少ないことが明らかになった。IANX 3 日後、Vc において pERK-IR 細胞は有意に減少し、IANX 2 週間後に回復傾向を示した。この際、機械刺激依存性 pERK 陽性細胞数のピ

ークは, obex -360 μm から -180 μm に移行した。また, 機械刺激依存性 pERK-IR 細胞の分布領域は, IB4 陽性領域内に限局することを見出した。これに対して, IANX 2 週後の熱刺激依存性 pERK 陽性細胞数は Naive 群と比較して有意差は認められず, さらに IB4 陰性領域内においても pERK 陽性細胞が検出された。この結果は, 免疫組織化学的解析により得られた再生過程の所見, および先に報告された各ニューロン群と感覚機能の関係 (CGRP 陽性および IB4 結合性線維は, 温熱および機械感覚の伝達に関与) とよく一致している。

そこで次に, 2% イソフルランによる浅麻酔下において, Sham 群および IANX 群の左側下唇部に機械刺激または熱刺激を与え, 頭部引っ込め反射閾値 (HWT) を経日的に測定した。その結果, IANX 3 日後において術前と比較して機械刺激または熱刺激に対する HWT の有意な増加が認められた。IANX 2 週後では HWT は回復傾向を示したが, 少なくとも IANX 4 週後までは正常な逃避反射閾値に回復せず, 痛覚鈍麻状態が継続した。

以上の結果から, 三叉神経の軸索損傷において, 非ペプチド作動性ニューロンと比較してペプチド作動性ニューロンは解剖学的かつ神経化学的に軸索再生が起りやすいが, 侵害刺激に対する逃避反射閾値の回復は, IANX 2 週では不完全であることが明らかになった。これらの結果は, 軸索損傷誘発性感覚障害のメカニズムおよび新規療法の開発に対する新しい示唆を与えると考えられる。