

論文審査の結果の要旨

氏名：山口 雅巳

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：OX₂ receptors mediate the inhibitory effects of orexin-A on potassium chloride-induced increases in intracellular calcium ion levels in neurons derived from rat dorsal root ganglion in a chronic pain model
(慢性疼痛モデル動物の神経細胞内カルシウムイオン量の増大に対する orexin-A の OX₂ 受容体を介した抑制効果)

審査委員：(主査) 教授 岡田 裕之
(副査) 教授 小見山 道
教授 渋谷 鑛

Orexin-A と orexin-B は、睡眠覚醒サイクルのほか摂食の調節に関わる神経ペプチドであり、OX₁ または OX₂ 受容体を介して作用する。これらの orexin 類の受容体は脊髄を含む中枢神経系に広く認められ、orexin-B は OX₁ 受容体に比べ OX₂ 受容体へ高い親和性があるのに対し、orexin-A は OX₁ および OX₂ の両受容体へ同程度の親和性を示すことが知られている。

Orexin-A は、摂食とエネルギー恒常性維持の面では促進的に作用する一方で、慢性疼痛モデル動物では鎮痛作用を示すことも知られている。慢性疼痛の病態分類には炎症性疼痛と神経障害性疼痛などがあるが、起炎物質の carrageenan (カラゲニン) を後肢足底に投与したマウスに見られる温度刺激による痛覚過敏を、orexin-A の全身投与は抗炎症性の作用は示さずに抑制する。また orexin-A の髄腔内投与は、坐骨神経を結紮することでラットに誘発した機械刺激による実験的な神経障害性疼痛を抑制する。この orexin-A の髄腔内投与は、神経障害性疼痛の動物モデルのひとつの streptozotocin 誘発性糖尿病ラットの痛覚過敏も抑制できる。これらのことは、髄腔内に投与された orexin-A が脊髄への一次知覚神経の入力に作用することで脊髄の侵害受容性神経伝達に影響を与える可能性を示すものである。これは、脊髄には末梢の機械刺激により興奮する C 線維を含む一次知覚神経が入力しているためである。しかし、実験的な痛みのある個体の知覚神経の興奮に対する orexin-A の作用機構の詳細は明らかでなかった。

これまでの研究から、カラゲニンを後肢足底に投与した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 Ca²⁺量 ([Ca²⁺]_i) は、塩化カリウム (KCl) の負荷により増大するが、orexin-A はこの増大を抑制することが示されている。カラゲニンを後肢足底に投与していないラット由来の DRG から分離した C 線維様小型神経細胞の [Ca²⁺]_i も KCl 負荷により増大するが、この増大は orexin-A による影響は受けない。つまり、炎症性疼痛モデルラットは健常なラットとは違い、C 線維様小型神経細胞の脱分極を orexin-A は抑制することができる。

炎症性疼痛とは異なり神経障害性疼痛は、しばしば opioid 鎮痛薬でさえも無効で治療に難渋するのが特徴である。末梢神経の障害は顕著な痛覚過敏を伴う神経障害性疼痛の誘因となる。神経障害性疼痛で認められる opioid 鎮痛薬のひとつである μ 受容体作動薬の効果の低下には、末梢神経、脊髄および脊髄よりも上位の中枢で起こる神経の可塑的变化が関わりと推察されている。本研究では、神経障害性疼痛のモデルラットの C 線維様神経細胞の脱分極に対する orexin-A の効果について検討した。即ち、実験的な神経障害性疼痛を惹起する目的で坐骨神経を結紮したラットから得た C 線維様神経細胞において KCl 負荷が誘発した [Ca²⁺]_i の増大に対する orexin-A の作用メカニズムについて、OX₁ と OX₂ 受容体の拮抗薬の効果を指標としてこれら受容体 subtype の役割について解析した。その結果、OX₁ ではなく OX₂ 受容体の関与の重要性が示唆されたため、比較の目的でカラゲニンを後肢足底に投与したラットの C 線維様神経細胞における KCl 誘発性の [Ca²⁺]_i の増大に対する orexin-A の抑制効果へ OX₂ 受容体の拮抗薬の併用投与が及ぼす影響についても検討を加えた。

実験には、pentobarbital による全身麻酔下で背部を切開し第 5、第 6 脊髄神経を 3-0 絹糸で両側性に結紮

する坐骨神経結紮手術を行なった Wistar 系雄性ラット（体重 225～275 g）を用いた。対照群としラットには、坐骨神経結紮以外は同じ sham 処置を施した。行動実験では、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 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。この行動実験は、坐骨神経結紮手術の直前から術後 14 日まで 24 時間毎に行なった。回避行動はスコア化（反応なし：0、わずかか遅い反応、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）した。また、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。行動実験の結果に基づき、坐骨神経結紮から 7 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 から神経細胞を分離し、アクリル製分析チャンバーに採取して接着剤でコーティングされた底面に付着させた。この神経細胞にカルシウム蛍光プローブの Fluo-4/AM を負荷し、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて直径約 20 μm の C 線維様小型神経細胞の $[Ca^{2+}]_i$ 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 orexin-A をそれぞれ単独か OX_1 と OX_2 両受容体拮抗薬の MK-4305、 OX_1 受容体拮抗薬の SB 334867、 OX_2 受容体拮抗薬 EMPA のいずれかと併用して灌流液に添加して 60 秒間記録し、さらに KCl を灌流液に追加して 30 秒間記録した。

その結果、以下の成果が得られた。

1. 回避行動は、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。坐骨神経結紮群では、10 g 刺激による回避行動が処置 3 日から 5 日にわたり 2.0 から 2.5 であった。26 g 刺激では対照群の回避行動は測定期間を通じてほぼ 1 だった。坐骨神経結紮群では、26 g 刺激による回避行動は 3 日から 5 日にわたり 2.5 から 3.0 であった。
2. 回避閾値は、対照群ではおよそ 26 g のまま殆ど変化がなかった。坐骨神経結紮群は、処置前の 26 g から 3 日で約 5 g まで低下し、この低下は 14 日間持続した。
3. 蛍光強度比（ F/F_0 ）は、対照群では、KCl（25 mmol/L）の添加により平均値はおおよそ 2.3 まで増加した。 F/F_0 の増大は、orexin-A（20 pmol）単独投与、orexin-A（20 pmol）と MK-4305（200 pmol）、SB 334867（2 pmol）または EMPA（200 pmol）の併用投与ではいずれも影響を受けなかった。一方、坐骨神経結紮群の F/F_0 の平均値は KCl（25 mmol/L）の添加で約 2.4 まで増加したが、orexin-A（20 pmol）の投与により抑制された。Orexin-A による F/F_0 の抑制効果は、MK-4305（200 pmol）または EMPA（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。カラゲニン処置群の F/F_0 の平均値の KCl（25 mmol/L）の添加による増加に対する orexin-A（20 pmol）の抑制効果も EMPA（200 pmol）の併用で打ち消された。

以上の神経障害性疼痛および炎症性疼痛モデル動物を用いた実験から、慢性疼痛下では orexin-A が C 線維の興奮を 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。

本研究の行動学および神経薬理学的な基礎実験の結果は、慢性疼痛下では orexin 神経活動の低下に伴い代償的に C 線維上の OX_2 受容体の感受性が亢進する可能性を示すものである。また本研究は、orexin 神経機構の関与の面から慢性疼痛の病態の一端を明らかにすると共に、慢性疼痛の治療ターゲットのひとつとしての OX_2 受容体の重要性を示唆している。

よって本論文の著者は、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

令和 2 年 1 月 23 日