

論文の内容の要旨

氏名：米 本 久 史

博士の専攻分野名称：博士（歯学）

論文題名：顔面皮膚の histamine 刺激によって活性化するミクログリアの動態

Dynamics of activated microglial cells following histamine stimulation of the face

これまでの研究により、延髄を含む中枢神経系にはミクログリア、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの三種類のグリア細胞の存在が報告されている。これらのグリア細胞はニューロンの構造的な支持細胞として、またニューロンの栄養細胞としての機能を有すると考えられてきた。しかし、最近の研究で、グリア細胞は直接ニューロンに作用して、ニューロン活動を変調することが明かにされた。グリア細胞の中でも、特にミクログリアとアストロサイトはニューロン活動に対して強い変調作用を示すことが知られている。末梢神経損傷や組織に炎症が起こると、一次ニューロンの中枢端から ATP が放出される。ATP はミクログリアの膜上に存在する P2X₄ 受容体に結合しミクログリアの活性化が誘導される。一方、アストロサイトは一次ニューロンの中枢端と二次ニューロン間に存在するシナプス領域において、グルタミンを取り込みグルタミン酸を合成して放出することにより、二次ニューロン活動を強く亢進させることが報告されている。また、ミクログリアとアストロサイトは活性時期が異なっている。末梢神経障害や末梢組織に炎症が引き起こされると、最初に活性化されるのはミクログリアであり、それに引き続いてアストロサイトが活性化される。さらに、最近の研究では、活性型ミクログリア細胞から transforming growth factor alpha や vascular endothelial growth factor が放出され、これらの分子がアストロサイトの活性化に影響を与えることが報告されており、これら二種類のグリア細胞は異なるメカニズムで活性化し、ニューロン活動の変調に関与するにもかかわらず、お互いに機能連絡を有することが明らかになった。このようなミクログリアやアストロサイトによる二次ニューロンの活動性変調は疼痛に関係するニューロンだけでなく痒み情報処理に関与する二次ニューロンにも変調をかける可能性が考えられる。しかし、活性型グリア細胞がいかなるメカニズムで、痒み情報処理に関わる二次ニューロン活動の変調に関与するかについては不明な点が多く残されている。そこで、本研究では痒みを誘発することが知られている histamine を顔面皮下に投与することによって出現する Iba1 陽性細胞の延髄における分布様式を検索し、痒み感覚情報処理機構に対するミクログリアの役割の一端を明らかにすることを目的とした。

Sodium pentobarbital (80 mg/kg, i. p.) で深く麻酔したラットを保温パッド上に仰臥位にした状態で、0.9%生理的食塩液に溶解した histamine 溶液 (10 μ l, 5 μ g/ μ l) を左側口ひげ部皮下に静かに注入した。また、vehicle として 0.9%生理的食塩液を同量、同部位に注入し、コントロールとした。Histamine 溶液あるいは vehicle 溶液を注入してから 5 分後に 500 ml 生理食塩液にて脱血後、0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde 溶液 (pH 7.4, 4°C) 500 ml を用いて灌流固定を行った。取り出した三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) および上部頸髄 (C1) 領域の連続切片標本 (厚さ 50 μ m) を作製して 3 切片毎に 1 切片を取り出し、免疫組織染色を行った。まず、厚さ 50 μ m の切片を 0.3% H₂O₂ 加 0.01 M PBS に 30 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した後、0.01 M PBS にて 5 分間の洗浄を 3 回行った。洗浄終了後、0.3% TritonX-100 加 0.01M PBS で希釈した 5% normal goat serum に 1 時間浸漬し、ブロッキングを行った。その後、一次抗体である rabbit anti-Iba1 antibody (1: 1000) に 4°C で 3 日間浸漬し、0.01 M PBS にて 10 分間の洗浄を 3 回行った。次いで切片を二次抗体である biotinylated goat anti-rabbit IgG (H+L) (1: 500) に室温で 2 時間浸漬した。その後 ABC kit (Vector Labs) を用いて室温で 1 時間、反応させた。0.01 M PBS による 10 分間の洗浄を 3 回繰り返した後、0.01% hydrogen peroxide 加 DAB を用いて反応産物を可視化した。次いで、切片を 0.01 M PBS にて洗浄し、被膜処理したスライドガラス (MAS-GP, Matsunami) に貼り付け、室温にて乾燥させた後、アルコールとキシレンにより脱水および透徹を行い、封入した。また、Iba1 陽性細胞を DAB 反応させた切片を光学顕微鏡下で観察し、Vc および C1 領域の表層部および深層部の顕微鏡写真を撮影し、Image J software (Research Services Branch) を用いて Iba1 陽性細胞密度の解析した。

Iba1 陽性細胞は、錐体型の細胞体を有する像として観察された。細胞体からは周囲に複数の突起を出している。Histamine の口ひげ部への注入 5 分後に、延髄および上部頸髄領域で認められた Iba1 陽性細胞の組織標本写真を示した。Histamine および生理的食塩液を口ひげ部へ注入したラットにおいて、多くの Iba1 陽性細胞が延髄の三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi), Vc および C1 に分布していた。また、Iba1 陽性細胞は刺激と反対側においても観察された。特に刺激と同側の Vc 表層では高密度の Iba1 陽

性細胞が検出された。また、この Iba1 陽性細胞の高い密度の分布は Vc の背側から腹側にかけてほぼ均一な密度を示しており、分布密度に偏りは認められなかった。

Histamine 注入群では、刺激と同側表層部で、obex から 720~1440 μ m 尾側部において、生理的食塩液注入群に比べ有意に高密度の Iba1 陽性細胞出現を認めた。また、それよりさらに尾側の obex から 2160 μ m では histamine 注入群の方がやや高い出現を認めたが、有意差はなかった。一方、histamine 注入および生理的食塩液刺激と対側においては、obex から 720~2160 μ m 尾側部の範囲において Iba1 陽性細胞出現密度に違いは認められなかった。

本研究では obex から 720~2160 μ m 尾側部の範囲において、深層部に出現した Iba1 陽性細胞密度に関しても解析を行った。深層部においては、histamine 刺激と同側において、どのレベルにおいてもやや出現密度が高い傾向を認めたものの、有意差はなかった。網様体においては histamine 刺激および生理的食塩液刺激共に同側および対側で、まばらな Iba1 陽性細胞出現を認めた。吻尾方向の分布密度をみると、同側と対側、histamine と生理的食塩液刺激共に有意な差は認められなかった。また、孤束核 (NTS) においては非常に高密度な Iba1 陽性細胞出現が左右対称的に認められた。また、NTS においても histamine 刺激と生理的食塩液刺激において、吻尾方向の分布の広がり有意差は認められなかった。

従来、多くの研究により、神経損傷や組織における炎症により、脊髄後角において、強いミクログリアの活性化が誘導されることが報告されている。すなわち、ミクログリアは活性化すると、細胞体が膨化し細胞体から突出している突起が短くなる。本研究においても、顔面皮膚に histamine を注射して Vc および C1 領域で検出された Iba1 陽性細胞は図 1 に示したように、比較的大型の細胞体と、細胞体から突出する複数の短縮した突起を認めた。これまでの過去の研究と本研究結果から、顔面皮膚の histamine 刺激によって Vc および C1 領域から検出された Iba1 陽性細胞は活性化型ミクログリアであると判断できる。

ミクログリアは非常に数が多く、神経細胞と神経細胞の間に隙間なく存在し、神経細胞に対して様々な作用を及ぼすことが知られている。また、活性化したミクログリアは複数の突起を伸ばしたり、縮めたりと活発に動くことが知られており、これによって神経組織に対する作用を発揮している。末梢神経が損傷を受けると、損傷神経の興奮が異常に亢進し、損傷神経の中枢端から ATP を初めとする様々な物質が放出され 2 次ニューロンに作用することが知られている。特に ATP はミクログリア細胞に出現している P2X₄あるいは P2X₇ 受容体に結合し、ミクログリア細胞の活性化を促す。活性化したミクログリアには形態学的な変化が誘導される。それに引き続き、活性化型ミクログリアからは様々な物質が放出される。このことから、顔面皮膚への histamine 注射によって活性化されたミクログリアは、顔面の皮膚を支配する神経の中枢端から ATP が放出されたことによって誘導されたものと想像される。さらに、histamine 注入によって活性化したミクログリアからは様々な物質が放出される可能性が考えられる。これまでの報告では、活性化型ミクログリアからは brain derived neurotrophic factor (BDNF) や tumor necrosis factor (TNF) が放出され、直接的に神経細胞の活動性を変調することが知られている。おそらく、本研究で histamine 注射によって活性化したミクログリアからも、BDNF や TNF α が放出され、2 次ニューロン活動が増強され、これによって上位中枢に痒みを引き起こすための情報が伝えられると考えられる。

本研究では histamine 刺激により RF において弱いミクログリアの活性化、NTS には強いミクログリアの活性化が観察された。RF および NTS の両領域とも、自律系応答に対して重要な役割を担う領域として知られている。特に histamine 刺激に対して強いミクログリア活性を示した NTS は、口腔顔面領域からの侵害入力を受けて、この入力によって自律神経系の反応を変化させると考えられている。このことから、NTS 領域において活性化したミクログリアはこの領域に存在するニューロン活動を変化させ、痒みによる自律神経系応答の変調に関与する可能性があると考えられる。一方で、自律神経系調節に関与すると考えられている RF 領域において活性化が認められたミクログリアは、活性化の程度が低いこと、また histamine と生理食塩水刺激に対して活性化にほとんど違いが見いだせなかったことなどから、RF 領域の神経活動の変調に関与する可能性は低いと考えられる。

本研究では発痒物質として histamine を用いたが、顔面皮膚に様々な痒みを引き起こす刺激が加えられると、無髄の C 線維が興奮し、活動電位が Vc および C1 の神経細胞へと送られることが観察された。よって、Vc および C1 神経細胞とミクログリアとが物質を介した情報伝達を行い、結果的にミクログリアの活性化が亢進する可能性がある。活性化型ミクログリアからは様々な分子が放出され、Vc および C1 神経細胞の活動性はさらに亢進し、この興奮性は上位中枢へと送られ、顔面皮膚に痒みが引き起こされると考えられる。