

## 論文の内容の要旨

氏名：相馬久実

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：TNF $\alpha$  signaling is involved in the enhancement of hypersensitivity in the adulthood-injured face associated with facial injury in infancy

(TNF $\alpha$ シグナルは幼児期顔面損傷に起因した成体期顔面損傷における痛覚過敏の増強に関与する)

幼児期に、組織損傷に伴って神経が損傷されると、神経回路の再編成が誘導され、成人期にさまざまな機能障害が引き起こされることが知られている。例えば、幼児ラットの腰椎神経損傷は、成体期ラットの一次求心性神経線維の異常な神経支配を誘導し、成体期ラットの後足に機械的過敏症を引き起こすことが報告されている。これらの研究は、乳児における三叉神経損傷が、成人期の末梢および中枢神経系の神経回路の機能不全を引き起こし、口腔顔面領域に感覚異常をもたらす可能性を示している。末梢神経が損傷されると、損傷された神経に異常興奮が惹起されて過興奮状態に陥り、さまざまな分子の合成が誘導され、周囲のニューロンに影響を与え、最終的に損傷を受けていない無傷の一次求心性神経が感作される。感作された一次求心性神経はさらに活動性を増し、その過興奮は中枢神経系に送られ、中枢神経系のニューロンも興奮性が増強する。

神経の損傷は、ニューロンの興奮性増強だけでなく、衛星細胞の活性化とマクロファージの集積も誘導する。下歯槽神経切断モデルラットを用いた研究では、神経損傷後に三叉神経節 (TG) において衛星細胞の活性化とマクロファージの集積が誘導され、これらの細胞は炎症誘発性サイトカインである腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) を産生し、放出することが知られている。遊離した TNF $\alpha$  は、ニューロンに発現する TNF 受容体に結合し、このニューロンの興奮性を増強する。このようなことから、TNF $\alpha$  はニューロンの興奮性調節に関与する重要な分子であり、TNF $\alpha$  が幼児期の組織損傷に伴う成体期組織損傷後の TG ニューロンの興奮性増強に関与する可能性が高いと考えられる。また、炎症性転写因子である nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) は、活性化により炎症性サイトカイン産生を促進することが報告されており、TNF $\alpha$  の受容体結合により NF- $\kappa$ B シグナルが活性化され、痛覚過敏が亢進する可能性も考えられる。

以上のことから、著者は TNF $\alpha$  を介した TG ニューロンと衛星細胞の機能連関によって、乳児期の顔面皮膚損傷に起因する成人期の顔面皮膚損傷後の機械痛覚過敏増強が誘導されると仮定した。そこで本研究では、TNF $\alpha$  を介したニューロン-衛星細胞の機能連関とそれに伴う NF- $\kappa$ B 活性化が、乳児期の組織損傷に伴って誘導される成人期神経障害性疼痛の増強への関与について解明することを目的とした。

実験には、Sprague-Dawley ラット（乳児期：6 - 8 g, 成体期：200 - 310 g）を使用した。ラットを生後 4 日目の乳児期切開処置の有無と生後 7 週目の成体期切開処置により、incision+incision 群と sham+incision 群に分類し、それぞれの群を用いて実験を行った。incision+incision 群および sham+incision 群に対し、成体期切開処置後 14 日目まで隔日的に von Frey を用いた機械刺激による頭部引っ込め閾値 (MHWT) を測定した（各群 n=4）。両群に対し、成体期処置後 10 日目に切開部皮下へ逆行性神経トレーサー (FluoroGold: FG) を注入し、成体期処置後 14 日目に深麻酔下にて、生理食塩水、続いて 0.1 M phosphate buffer にて希釈した 4% paraformaldehyde で灌流固定を行った。同じ固定液による後固定の後、TG を摘出し、0.01 M phosphate-buffered saline (PBS) で希釈した 20%スクロース溶液に 12 時間以上浸漬させ凍結切片を作製した。続いて、一次抗体には衛星細胞のマーカーとして mouse anti-rat glial fibrillary acidic protein (GFAP) monoclonal antibody (1:2000, MAB360, Millipore) および rabbit anti-rat TNF $\alpha$  polyclonal antibody (1:100, ab6671, Abcam), 二次抗体として Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100, Thermo Fisher Scientific) および Alexa Fluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:100, Thermo Fisher Scientific) を用いて蛍光免疫染色を行い、免疫組織化学的解析（各群 n=4）を行った。また、成体期処置後 14 日目に生理食塩水にて両群のラットを脱血し、切開側 TG を摘出し、一次抗体として rabbit anti-rat TNF $\alpha$  polyclonal antibody (1:1000), 二次抗体とし

て horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody (1:5000, Cell Signaling) を用いて Western blotting を行い、タンパク質量の検出および解析を行った (incision+incision 群: n = 17, sham+incision 群: n = 8)。次に incision+incision 群に対し、mouse anti-rat TNF $\alpha$  neutralizing antibody (0.05  $\mu$ g, MAB510, R&D Systems) またはコントロールとして normal goat IgG (0.05  $\mu$ g, AB-108-C, Gibco) を成体期再切開処置後に連日、切開側の TG へ投与し、14 日間隔的に機械刺激を与え MHWT を測定した。また、14 日目において前述と同様にラットの灌流固定、切開側 TG 摘出および切片の作製を行った。一次抗体として mouse anti-rat GFAP monoclonal antibody (1:2000)、二次抗体として Alexa Fluor 568-conjugated goat anti-mouse IgG (1:100, Thermo Fisher Scientific) を用い蛍光免疫染色を行い、免疫組織化学的解析 (各群 n = 4) を行った。また、sham+incision 群に対し、recombinant rat TNF $\alpha$  (ab9756, 0.05  $\mu$ g, Abcam) またはブークルとして PBS (14190-144, Gibco) を成体期切開処置後に連日、切開側 TG へ投与し、14 日間隔的に機械刺激を与え MHWT を測定した。さらに、incision+incision 群に対し、選択的 NF- $\kappa$ B 阻害薬として Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate (P8765, 200 pmol, Merck) またはブークルとして PBS を成体期切開処置後に連日、切開側 TG へ投与し、14 日間隔的に機械刺激を与え MHWT を測定した。

その結果、以下に示す知見を得た。

1. 成体期切開後 2~8 日では incision+incision 群と sham+incision 群で MHWT の有意な差は認められなかった。その後、10 日目以降 incision+incision 群において、sham+incision 群と比較し顕著な MHWT の低下を認めた。
2. 切開側 TG において FG 標識ニューロンが観察され、そのいくつかは GFAP 免疫反応陽性 (IR) 細胞に囲まれており、TNF $\alpha$  免疫反応性を示した。TG ニューロンの多くが TNF $\alpha$  免疫反応性を示し、GFAP-IR 細胞に囲まれていた。TG における TNF $\alpha$ -IR 細胞の相対数および TNF $\alpha$  タンパク質の相対量は、incision+incision 群の方が sham+incision 群と比較して有意に多かった。
3. incision+incision 群に対する抗 TNF $\alpha$  中和抗体の切開側 TG 内投与により、MHWT の有意な上昇に加え、GFAP-IR 細胞に囲まれた FG 標識ニューロン相対数の有意な減少を認めた。
4. sham+incision 群に対する recombinant rat TNF $\alpha$  の切開側 TG 内投与により、MHWT の有意な低下が認められた。
5. incision+incision 群の切開側 TG での NF- $\kappa$ B 阻害により、MHWT の有意な上昇が認められた。

以上から、TG ニューロンおよび衛星細胞から放出される TNF $\alpha$  による、ニューロンでの NF- $\kappa$ B シグナルの亢進が、乳児期の顔面損傷に伴う成体期顔面損傷後の TG ニューロンの興奮性増強を誘導し、成体期での機械痛覚過敏の亢進に関与する可能性が示された。