

論文の内容の要旨

氏名：洲之内 千尋

専攻分野の名称：博士（医学）

論文題名：ドライアイにおける侵害受容性疼痛の機序の解明にむけたマウス三叉神経節細胞初代培養モデル確立

角膜知覚を司るのは三叉神経第1枝の一部である角膜神経である。ドライアイには侵害受容性疼痛が関与していると考えられている。角膜における侵害受容性疼痛はTRPV1 (Transient Receptor Potential Vanilloid 1; TRPV1)の関与が示唆されているがほぼ未解明である。今回本研究は分散法によって神経細胞のみを単離し三叉神経節初代培養細胞を確立し、この培養細胞内Ca²⁺イメージングを行いTRPV1アゴニストのカプサイシンと既存の薬剤も用いながら神経興奮を測定した。

野生型の生後7日の幼若マウスから三叉神経節を摘出し、分散法で初代培養を行った。培養細胞に対し神経細胞マーカーのNeuN抗体、TRPV1抗体を用いて蛍光抗体法を行った。また培養2週後で細胞内Ca²⁺動態をモニタリングする蛍光プローブであるFura2-AMを培養細胞に導入した後、カプサイシン(10 μM)で刺激し、細胞興奮をマイクロプレートリーダー法で測定した。薬剤を添加せずカプサイシン刺激のみの群(無添加群)と各種薬剤(TRPV1アゴニストのAMG9810、ドライアイ治療薬のジクアホソル、シクロスポリン、レバピミド)を添加した後カプサイシン刺激した群の細胞興奮を測定した。

マウス三叉神経節細胞は約2週間で1本の長い軸索と多数の短い樹状突起を持つ多数の成熟神経様細胞が認められた。さらに蛍光抗体法により核に神経特異的なNeuN抗体陽性像が認められ、成熟神経細胞であると確認された。またこれらの細胞の一部にTRPV1発現も確認された。培養細胞に蛍光強度比(340nm/380nm)から経時的なカプサイシン刺激による変化を観察したところ、カプサイシン刺激によってこの比が上昇した。これはカプサイシンにより神経細胞の興奮が起こり、細胞内Ca²⁺濃度が上昇したことを示していた。AMG9810、ジクアホソル、シクロスポリン添加時には無添加群より細胞興奮は有意に抑制されていた。レバピミド添加時には無添加群と比べて有意な変化は認められなかった。

幼若マウス由来三叉神経節細胞を用いて角膜・三叉神経節における侵害受容性疼痛と神経障害性疼痛に関わる因子の薬剤スクリーニングを可能にするin vitro三叉神経節細胞の初代培養モデルを確立した。侵害受容体のアゴニストによって神経興奮が認められ、臨床使用されている薬剤の効果判定が可能であったことから、本モデルは今後の角膜知覚研究に有用であることが示唆された。本研究ではマウス三叉神経節細胞の神経興奮とジクアホソルとシクロスポリンにおける神経興奮に対する抑制効果をin vitroで蛍光強度比の変化から示すことができた。しかし抑制効果を示した厳密なメカニズムは不明である。今後の機序解明が期待される場所である。