

論文の内容の要旨

氏名：木村有貴

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：IL-33 causes orofacial neuropathic pain via phosphorylation of GluN2B in the trigeminal spinal subnucleus caudalis

(IL-33 は三叉神経脊髄路核尾側亜核の GluN2B のリン酸化を介して神経障害性疼痛を惹き起こす)

口腔顔面領域における外傷や、抜歯やインプラント埋入術などの手術により末梢神経の損傷が生じることがある。組織の損傷を起因として発症する神経障害性疼痛は、触刺激のような非侵害刺激に対して痛みを感じるアロディニアを特徴とする。このような痛みは既存の鎮痛薬では治療に難渋するため、患者の生活の質を著しく低下させることが問題視されている。今日に至るまで多くの研究がなされているものの、口腔顔面領域における末梢神経損傷後の疼痛発現メカニズムは未だ十分に解明されていない。効果的な鎮痛薬の創出には、神経障害性疼痛のメカニズム解明が重要であると考えられる。近年、坐骨神経損傷モデル動物を用いた神経障害性疼痛の研究において、脊髄後角における interleukin (IL)-33 シグナルの重要性が示唆されている。IL-33 シグナルの抑制は、既に発症した痛みに対して鎮痛効果を示すことから、神経障害性疼痛の有効な治療標的になり得ることが期待できるが、口腔顔面領域における神経障害性疼痛への IL-33 の関与は不明である。そこで本研究では、口腔顔面領域の神経障害性疼痛発症時の三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) における IL-33 の役割を検討した。

本実験には雄性および雌性 C57BL/6J マウス (6 週齢) を使用した。深麻酔下にて口腔内より三叉神経第二枝の眼窩下神経を剖出し、6-0 絹糸で神経を部分結紮した群を infraorbital nerve injury (IONI) 群とし、神経の部分結紮を行わず術部を閉創した群を対照群とした。IONI 後、口髭部に von Frey フィラメントを用いて機械刺激を加えた際の頭部引っ込み反射閾値 (head withdrawal threshold: HWT) を測定した。IONI 群では術後 1 日目より有意な HWT の低下が認められた。一方で、対照群では術後の HWT の低下は認められなかった。Vc の三叉神経第二枝入力領域における IL-33 陽性細胞数を解析したところ、IONI 群は対照群と比較して有意な IL-33 陽性細胞数の増加が認められた。また、ウエスタンブロット法を用いた解析において、IONI 群の Vc における IL-33 タンパク量は対照群と比較して有意に増加した。Vc における IL-33 陽性細胞は、オリゴデンドロサイトマーカーである oligodendrocyte transcription factor 2 (OLIG2) 陽性であったが、ミクログリアマーカーの ionized calcium-binding adapter molecule 1 (IBA1)、アストロサイトマーカーの glial fibrillary acidic protein (GFAP)、アストロサイト特異的な核マーカーの SRY-box transcription factor 9 およびニューロンマーカーの neuronal nuclei (NeuN) には陰性であった。Vc における IL-33 かつ OLIG2 陽性細胞数は IONI 後に増加した。

口腔顔面領域における神経障害性疼痛の発症に対する IL-33 シグナルの関与を解析するために、IL-33 受容体である ST2 の組換え体タンパク質を用いて Vc の IL-33 シグナル経路を抑制した。IONI 後 5 日目に ST2 組換え体タンパク質の大槽内投与を行ったところ、低下した HWT の上昇が認められた。一方で、生理食塩水の大槽内投与では HWT に変化は認められなかった。正常なマウスに対して IL-33 組換え体タンパク質の大槽内投与を行ったところ、投与 1 時間後から HWT の低下が認められたが、生理食塩水の大槽内投与では HWT に変化は認められなかった。

Vc において NeuN と ST2 は共存したが IBA1、GFAP および OLIG2 との共存は認められなかった。先行研究において、ST2 はニューロン以外にも発現が認められるため、Vc におけるニューロン特異的な ST2 の発現を検討するために、正常マウスに対する IL-33 の大槽内投与後、Vc におけるグリア細胞の活性化の有無を解析した。IL-33 大槽内投与群の Vc における GFAP および IBA1 の陽性細胞数は、生理食塩水投与群のそれらと同等であった。また、IL-33 大槽内投与による HWT の低下に対して、アストロサイト活性化阻害薬であるフルオロクエン酸あるいはミクログリア活性化阻害薬であるミノサイクリンは影響を及ぼさなかった。

神経障害性疼痛の発症時において N-methyl-D-aspartate receptors (NMDA) 受容体の関与が広く知られており、特に NMDA 受容体サブユニットの一つである GluN2B の活性化が認められている。したが

って、VcにおけるIL-33大槽内投与によるHWTの低下には、GluN2Bの活性化が関与している可能性が考えられる。IL-33の大槽内投与後に低下したHWTは、GluN2Bの特異的アンタゴニストであるRo 25-6981の大槽内投与により回復した。ウエスタンブロット法による解析から、IL-33大槽内投与後にVcのシナプトソーム画分においてGluN2Bのリン酸化が認められた。また、パッチクランプ法を用いてVcニューロンのGluN2Bを介したminiature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs)を測定したところ、IL-33大槽内投与群ではRo 25-6981処置によりmEPSCの振幅の抑制が認められた一方で、生理食塩水の大槽内投与群ではRo 25-6981処置後のmEPSCの振幅抑制はわずかであった。IONI後にVcにおいて認められるGluN2Bのリン酸化は、ST2組換え体タンパク質を用いたIL-33シグナルの阻害により有意に抑制された。

GluN2Bリン酸化の要因として、Fynキナーゼの活性化が示唆されていることから、IL-33大槽内投与によりVcで生じるGluN2Bのリン酸化にFynキナーゼが関与する可能性が考えられる。IL-33大槽内投与後にVcにおいてFynキナーゼのリン酸化が認められ、これはFynキナーゼ阻害薬であるsaracatinibにより阻害された。さらに、IL-33大槽内投与により生じるGluN2Bのリン酸化はsaracatinibにより阻害された。リン酸化Fynの局在を解析したところ、IL-33の大槽内投与後に樹状突起に認められ、特に樹状突起棘に局在していた。IL-33大槽内投与後のHWT低下に対するsaracatinibの影響を解析した結果、saracatinibの前処置によりIL-33投与によるHWTの低下は認められなかった。雌性マウスに対してIL-33の大槽内投与を行ったところ、雄性マウスと同様にHWTの低下が認められた。

以上により、IONI後にVcのオリゴデンドロサイトで産生されたIL-33はニューロンのST2に作用してFynキナーゼのリン酸化を惹き起こし、さらにGluN2Bのリン酸化を介してVcニューロンの興奮性が増大することでHWTの低下をもたらすことが示唆された。