

## 論文の内容の要旨

氏名：小 山 亮

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：The role of pannexin 1-mediated ATP signaling in the trigeminal spinal subnucleus caudalis in tongue cancer pain

（舌癌性疼痛発症に対する三叉神経脊髄路核尾側亜核における pannexin 1 を介した ATP シグナルの役割）

扁平上皮癌は口腔癌の組織型として最も多く、粘膜、歯肉および舌などに浸潤し、組織を破壊する。癌の浸潤は三叉神経を傷害し、炎症を惹き起こすことにより口腔機能を低下させる。口腔癌に伴う症状の一つである疼痛は、患者の quality of life (QOL) を低下させる要因であることから、疼痛のコントロールは QOL を改善するために重要である。しかし、疼痛の発症メカニズムは十分に解明されていない。先行研究において、腫瘍の浸潤による三叉神経の損傷が口腔顔面領域の神経障害性疼痛を惹き起こすことが報告されている。この際、三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)においてミクログリアの活性化が認められる。パネキシン 1 (PANX1) はヘミチャネルを形成し非選択的にイオンを透過させるチャネルとして知られている。PANX1 はイオンの透過のみならず、アデノシン三リン酸 (ATP) やグルタミン酸などの分子を細胞外へと放出させる役割も果たしている。中枢神経系の種々の細胞において PANX1 の発現が認められており、ミクログリア特異的 PANX1 欠損マウスを用いた実験から、ミクログリアの PANX1 が脊髄における痛み調節に重要な役割を果たしていることが示されている。本研究では、舌癌発症後の舌癌性疼痛に対するミクログリアと PANX1 の役割を検討した。

6 週齢 Fischer 雄性ラットの左側舌縁にラット由来の扁平上皮癌 (squamous cell carcinoma: SCC) 細胞を接種し、舌癌モデル (以下 SCC 群) を作製した。対照群には phosphate-buffered saline (PBS) を投与した (以下 PBS 群)。浅麻酔下にて接種部へ機械刺激を与えた際に生じる頭部引っこめ反射閾値 (mechanical head-withdrawal threshold: MHWT) を経日的に測定したところ、PBS 群に比べ SCC 群において MHWT の有意な低下が認められた。SCC 接種による MHWT の低下に対する PANX1 の関与を検討するために PANX1 阻害薬 (10Panx, 20 nmol, 0.5  $\mu$ L/h) または vehicle (PBS, 0.01M, 0.5  $\mu$ L/h) の大槽内持続投与を行った。その結果、SCC 群において認められる MHWT の低下は、10Panx 大槽内持続投与により有意に抑制された。

次に、SCC あるいは PBS 接種後 14 日目に、Vc における PANX1 の発現を免疫組織化学的手法により解析した。Vc において PANX1 陽性細胞が認められ、SCC 接種後に Vc の第 I-II 層において PANX1 陽性細胞数の増加が認められた。一方で、SCC 接種後に Vc の第 III および第 IV 層では PANX1 陽性細胞数の増加は認められなかった。PANX1 陽性細胞の多くは Iba1 陽性であった。

さらに、SCC あるいは PBS 接種 14 日目に Vc に存在する侵害受容ニューロンである広作動域 (wide dynamic range: WDR) ニューロンから細胞外記録を行い、Vc ニューロンの活動性を解析した。PBS 群に比べ SCC 群では WDR ニューロンの侵害刺激に対する応答性が有意に増大した。一方で、SCC 群で認められた侵害刺激に対する応答性の増大は 10Panx 大槽内持続投与により抑制された。舌の侵害刺激に対する受容野の大きさは PBS 群、SCC 群および SCC+10Panx 大槽内持続投与群の間で差は認められなかった。

Vc における応答性が増大したニューロンをさらに解析するために、ニューロンの活性化マーカーであるリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (pERK) の発現様式について免疫組織化学的解析を行った。Vc における pERK 陽性細胞数は PBS 群と比較して SCC 群において有意に多く認められた。一方で、SCC 群で認められた pERK 陽性細胞数の増加は 10Panx 大槽内投与により抑制された。

SCC 群の大槽内に P2X<sub>7</sub> 受容体のアンタゴニストである BBG (7 pmol/0.5 mL/h) あるいは PBS (0.01 mol/0.5 mL/h) を持続投与し、MHWT および pERK 陽性細胞の発現を解析した。SCC 群において認められた MHWT 低下および pERK 陽性細胞数の増加は、P2X<sub>7</sub> 受容体アンタゴニストの大槽内持続投与により有意に抑制された。SCC 接種による MHWT の低下に対する P2X<sub>7</sub> 受容体の関与をさらに検討するために、SCC 群の大槽内に 10Panx (20 nmol, 0.5  $\mu$ L/h) を持続投与した群に対して、P2X<sub>7</sub> 受容体ア

ゴニストである BzATP (20 pmol/0.5  $\mu$ L/h) または PBS (0.01 mol/0.5  $\mu$ L/h) を持続投与した。10Panx 大槽内持続投与を行った SCC 群に対して、BzATP の大槽内投与を行ったところ、PBS 投与と比較して MHWT の有意な低下および pERK 陽性細胞数の有意な増加が認められた。Vc における P2X<sub>7</sub> 受容体はニューロンに発現した。

ミクログリアにおいても P2X<sub>7</sub> 受容体の発現が報告されており、P2X<sub>7</sub> 受容体を介して interleukin (IL)-1 $\beta$  が合成されることが知られている。そこで、ミクログリアで合成された IL-1 $\beta$  がその受容体に作用する可能性を検討した。Vc における IL-1 $\beta$  受容体である IL-1R1 および P2X<sub>7</sub> 受容体はニューロンに発現した。SCC 群の大槽内に IL-1R1 アンタゴニストである IL-1RA (10  $\mu$ g/rat) を投与したところ、MHWT の低下が抑制された。

以上の結果から、舌への SCC 接種により Vc の第 I-II 層のミクログリアにおいて PANX1 の発現が増加し、PANX1 を介して放出増加した ATP が侵害受容ニューロンの P2X<sub>7</sub> 受容体に作用することで細胞内の陽イオンが流入し、侵害受容ニューロンの興奮性が増大する可能性が示唆された。また、ミクログリアから放出された ATP はニューロンに作用するだけでなく、自身の P2X<sub>7</sub> 受容体に作用することでミクログリアの IL-1 $\beta$  合成および放出を促し、侵害受容ニューロンの IL-1R1 受容体を介して侵害受容ニューロンの興奮性増大を惹き起こしている可能性もある。