

## 論文審査の結果の要旨

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)

審査委員：(主 査) 教授 小 林 真 之

(副 査) 教授 米 原 啓 之

教授 金 子 忠 良

教授 今 村 佳 樹

教授 篠 田 雅 路

扁平上皮癌は口腔癌で最も多く、扁平上皮癌の進行は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) を低下させる大きな要因であるが、疼痛の発症メカニズムには不明な点が多い。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では、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。そこで本研究では、舌癌発症後の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ひっこめ反射閾値 (mechanical head-withdrawal threshold: MHWT) を経日的に測定した。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) または PBS の大槽内持続投与を行った。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。さらに、Vc に存在する侵害受容ニューロンである広作動域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。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。また、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 あるいは PBS を持続投与し、MHWT および pERK 陽性細胞の発現を解析した。さらに、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 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 または PBS を持続投与し、MHWT および pERK 陽性細胞の発現を解析した。最後に、ミクログリアにおいて 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おり、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するため、Vc における IL-1 $\beta$  受容体である IL-1R1 および P2X<sub>7</sub> 受容体の発現を免疫組織化学的に解析し、SCC 群の大槽内に IL-1R1 アンタゴニストである IL-1RA を投与 MHWT の測定を行った。

その結果、以下に示す結論を得た。

1. SCC 群において舌機械アロディニアが発症した。
2. 10Panx の大槽内投与により舌機械アロディニアの発症が抑制された。
3. SCC 群の Vc 表層で PANX1 陽性細胞が増加し、その多くは Iba1 陽性であった。
4. SCC 群で PBS 群と比較して Vc 侵害受容ニューロンの応答性が増大し、それらは 10Panx により抑制された。
5. SCC 群では Vc の pERK 陽性細胞数が増加したが、10Panx 投与はその効果を抑制した。

6. BBG 投与により Vc での pERK 陽性細胞は増加しなかった。
7. 10Panx を投与した SCC 群への BzATP 投与は、pERK 陽性細胞数を増加させた。
8. IL-1 $\beta$  受容体はニューロンに発現し、IL-1RA の投与により機械アロディニアが抑制された。
9. P2X<sub>7</sub> 受容体はニューロンに発現していた。

以上の結論から、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示唆された。

本研究より得られた知見は、舌癌による疼痛発症メカニズムの一端を明らかにするものであり、歯科医学に寄与すること大である。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和4年3月10日