

Roles of cation-chloride cotransporters in trigeminal hyperalgesia and allodynia induced in adult rats

メタデータ	言語: en 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 魏, 兵 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/368

学位論文の内容の要旨及び論文審査の結果の要旨

学位記番号	医博第 498号	学位授与年月日	平成20年 3月17日
氏 名	魏 兵		
論文題目	Roles of cation-chloride cotransporters in trigeminal hyperalgesia and allodynia induced in adult rats (三叉神経痛覚過敏及び異痛症におけるカチオンー塩素共輸送体の役割)		

博士(医学) 魏 兵
論文題目

Roles of cation-chloride cotransporters in trigeminal hyperalgesia and allodynia induced in adult rats
(三叉神経痛覚過敏及び異痛症におけるカチオン-塩素共輸送体の役割)

論文の内容の要旨

[はじめに]

神経因性疼痛の原因の一部として、興奮性の神経伝達物質の過剰放出や伝達物質に対する反応増強が知られている。また、抑制性の神経伝達物質であるGABAが侵害受容ニューロンの興奮を抑制的に調節していることから、GABA作動性神経伝達の変化(脱抑制)もこれらに関与している可能性も考えられる。GABAの脱抑制が起こる原因には、カチオン-塩素共輸送体であるKCC2やNKCC1の発現量の変化が知られている。正常な状態でGABAがGABA_A受容体と結合すると塩素イオンが細胞内へ流入して膜電位が過分極し、細胞興奮性は抑えられる。このGABAの抑制性作用に重要な塩素イオンの細胞内濃度は塩素イオン排出に作用するKCC2や塩素イオン取り込みに作用するNKCC1によって維持されている。これらの共輸送体の発現が病的に増加もしくは減少することにより、塩素ホメオスタシスが破綻し、GABAの脱抑制が起こることが知られている。近年の坐骨神経痛モデル動物を用いた研究では、脊髄後角における抑制系障害が痛覚過敏や異痛症の成因のひとつであり、これにはKCC2やNKCC1の発現の変化が関与していることも示唆されている。ところが、代表的な神経因性疼痛として知られる三叉神経痛は、これまで動物モデル評価系が確立されておらず、詳細なメカニズムは明らかにされていなかった。我々は、三叉神経節の一次感覚ニューロンや脊髄路核内の二次ニューロンの細胞内塩素イオン濃度($[Cl^-]_i$)変化によるGABA作動性神経伝達の変化が痛覚閾値を変化させ、三叉神経痛の病態生理学的な原因となっていると考えた。この仮説を立証するため、まず三叉神経痛モデル動物を作製し、このモデル動物を用いて三叉神経支配領域の痛覚過敏や異痛症におけるKCC2とNKCC1の役割を検討した。

[材料ならびに方法]

動物は生後7週齢で130 g程度の雄ラットを用いた。ペントバルビタール麻酔下において、ラットの右の眼窩下神経をポリグリコール酸糸を用いて結紮し片側の三叉神経線維第Ⅱ枝を傷害した。Von Fray filamentによる顎顔面領域への触刺激に対する反応における逃避行動を異痛症の指標とした。逃避行動は、0：反応なし、1：頭部を動かして刺激物体を探索、2：頭部を刺激物体から遠ざかる方向にゆっくり動かすか顔面を1回拭う、3：刺激物体から体を遠ざけるか、刺激物体を活発に攻撃する、4：刺激顔面領域を3回以上拭う、の5段階で評価し、スコア(0~4点)として記録して2点以上を痛覚反応と考えた。また、痛みの閾値を同定するため、異なる強度を持ついくつかの種類のfilamentで刺激し、スコア2の行動を起こし得た強度(g)を痛みの閾値とし痛覚過敏を評価した。ハンドリングを行ったのち、手術の1週間前から毎週行動評価を行い、手術後1週間毎に、動物の脳を取り出し、両側の脊髄路核領域と三叉神経節を含む凍結切片(20 μ m)を作成した。作製したスライスにおけるNKCC1とKCC2のmRNA発現レベルとタンパク発現を、各々in situハイブリダイゼーション法と免疫組織学的手法により解析した。振動刃マイクロームで作製した急性脳幹部スライス標本を膜電位感受性色素(JPW1114, 100 μ m)で染色し、超高速CCDカメラ(Neuro CCD)を用いて、細胞膜電位の変化を蛍光による光信号として可視化した。

[結果]

ラットの片側の眼窩下神経を結紮し三叉神経線維第Ⅱ枝を傷害した結果、顎顔面領域への刺激に対する痛覚反応の閾値が傷害側で低下し、触刺激に対する反応スコアも傷害側で増加し痛覚反応を示した。これらの変化は術後1-3週間持続したが、4週後には回復した。

$[Cl^-]_i$ 調節分子であるカチオン-塩素共輸送体のmRNAと蛋白の発現変化を傷害側と健常側の三叉神経脊髄路核内の二次ニューロンで比較した。KCC2の発現は、傷害側で術後1-2週間低下し、4週後には回復した。これは痛覚閾値の低下や触刺激に対する痛覚スコアの増加の時間的経過と良く一致していた。NKCC1のmRNAと蛋白発現には傷害側と健常側の間に違いは見られなかった。

次にカチオン-塩素共輸送体のmRNAと蛋白の発現変化を傷害側と健常側の三叉神経節の一次ニューロンで検討した。KCC2は従来の報告どおり発現していなかった。NKCC1の発現は傷害側で術後1-2週間で増加していた。三叉神経節の一次ニューロンは、 A_β 、 A_δ 、C線維の3種類あることが知られており、細胞体の大きさによって分類することができるが、NKCC1の発現は、 A_β とC線維の細胞体で増加していた。

また、膜電位光学測定法を用いて脊髄路核内の神経伝達を時空間的に可視化したところ、GABAは健常側では抑制性だが傷害側では術後1-2週の間は興奮性に作用していた。

[考察]

以上の結果から、三叉神経感覚枝(一次ニューロン)障害モデルにおいて、二次ニューロンにおけるtrans synapticなシグナルを介するKCC2の減少が、 $[Cl^-]_i$ 上昇によるGABAの抑制作用の減弱もしくは興奮性への逆転を起こす可能性が示唆された。また、一次ニューロン終末でのシナプス前性あるいは近年報告された神経節細胞体での傍分泌・自己分泌性のGABA作用にもNKCC1の発現増加による脱抑制あるいは興奮性への逆転がおり、これらの結果として神経伝達が異常に促進される可能性も示唆された。これらの塩素ホメオスタシスの破綻によって誘発されるGABA作用の興奮性への変化が、三叉神経痛でみられる痛覚過敏や異痛症の原因のひとつである可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

坐骨神経因性疼痛モデル動物による最近の研究から、脊髄後角における抑制系障害が痛覚過敏や異痛症の成因の一つであり、これにはKCC2(塩素イオン排出)やNKCC1(塩素イオン取り込み)の発現の変化によるGABAの脱抑制が関与していることが示唆されている。ところが、代表的な神経因性疼痛として知られる三叉神経因性疼痛については、これまで動物モデル評価系が確立されておらず、詳細なメカニズムは不明のままである。そこで、本研究では、三叉神経因性疼痛の病態生理学的な原因の一つとして、三叉神経節の一次感覚ニューロンや脊髄路核内の二次ニューロンの細胞内塩素イオン濃度変化によるGABA作動性神経伝達の変化が関与するか否かについて調べた。すなわち、三叉神経因性疼痛モデルラットを作製し、このモデル動物を用いて三叉神経支配領域の痛覚過敏や異痛症におけるKCC2とNKCC1の役割について検討を加えた。

対象の選定と方法は以下の通りである。

対象には生後7週齢で右側眼窩下神経を結紮(ポリグリコール酸糸を使用)し片側の三叉神経線維第Ⅱ枝を傷害した雄のWistar系ラットを用いた。なお、反対側には偽手術を施した。

- (1)手術の1週前から術後4週目までの5週間にわたって痛覚反応を測定した。異痛症の評価(5段階)には、Von Frey filamentによる顎顔面領域への触刺激に対する逃避反応を用いた。また、痛覚過敏の評価には痛みの閾値(g)を用いた。
- (2)術後1週間毎に作製した、両側の脊髓路核領域と三叉神経節を含む凍結切片におけるNKCC1とKCC2のmRNAとタンパク発現を、*in situ*ハイブリダイゼーション法と免疫組織学的手法により、各々測定した。
- (3)手術から1週後と2週後に作製した脳幹部スライス標本を膜電位感受性色素(JPW1114)で染色し、蛍光による光信号として可視化した細胞膜電位の変化を超高速CCDカメラ(Neuro CCD)を用いて測定した。おもな結果は以下の通りである。

- (1)顔面領域への刺激に対する痛覚反応の閾値が傷害側で低下し、触刺激に対する反応も傷害側で増加した。これらの痛覚反応の変化は術後1-3週間持続したが、4週後には回復した。
- (2)KCC2のmRNAと蛋白の発現変化を傷害側と偽手術側の三叉神経脊髄路核内の二次ニューロンで比較したところ、傷害側で術後1-2週間低下し、4週後には回復した。これは痛覚反応の時間的経過と一致していた。NKCC1のmRNAと蛋白発現には傷害側と偽手術側の間に違いは見られなかった。さらに、NKCC1のmRNAと蛋白の発現変化を三叉神経節の一次ニューロンで比較したところ、傷害側における発現が術後1-2週の間で増加していた。しかし、KCC2の発現差はなかった。
- (3)脊髄路核内の神経伝達を時空間的に可視化したところ、GABAは偽手術側では抑制性に、一方傷害側では術後1-2週の間は興奮性に作用していた。

これらの結果から、三叉神経感覚枝障害ラットモデルにおいては、二次ニューロンにおけるKCC2の減少と一次ニューロン終末でのNKCC1の発現増加による、GABAの抑制作用の減弱あるいは興奮性への逆転が起こることが示唆され、これらの可能性により神経伝達が異常に促進され痛覚亢進が生じると考えられた。

審査委員会では、適切な動物モデル評価系を用いて、塩素ホメオスタシスの破綻によって誘発されるGABA作用の興奮性への変化が三叉神経因性疼痛でみられる痛覚過敏や異痛症の原因として関与しうることを初めて明らかにした点を高く評価した。

審査の過程において、申請者に対して次のような質問を行った。

- 1) 正常側と偽手術側を持つ偽手術群と、正常側と手術側を持つ手術群を比較したか
- 2) 痛覚反応(順序尺度)の記述には中央値を用いるべきではないか、また統計学的処理はノンパラメトリック法によったか
- 3) 偽手術側において、1週間後の痛み閾値が2週間目以降に比べ高いのは何故か
- 4) 蛍光強度は絶対値ではないので、KCC2(mRNAと蛋白)の発現強度の評価は、比較しうるリファレンスに対する%値で正規化後に、比較すべきではないか
- 5) KCC2 蛋白の蛍光強度の測定はNeuN 陽性細胞で行ったか
- 6) NKCC1(mRNAと蛋白)の発現において、細胞体の最も大きいA_δ線維で有意差が認められた理由は
- 7) peripherin陽性細胞で核が染まる場合と染まらない場合があるのはなぜか
- 8) 高電流(mAオーダー)の電気刺激による実効範囲はどの程度か
- 9) 傷害側における興奮性GABA様電位の後期成分のメカニズムは何か
- 10) KCC2(mRNAと蛋白)のダウンレギュレーションについて、痛みの異常が発生したといえない三叉神

経第一枝と第三枝支配領域でも調べたか

これらの質問に対し申請者の解答は適切であり、問題点も十分理解しており、博士(医学)の学位論文にふさわしいと審査員全員一致で評価した。

論文審査担当者	主査	中	原	大	一	郎	
	副査	難	波	宏	樹		副査
							山
							本
							清
							二