

氏名	丸濱 功太郎
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4732号
学位授与の日付	平成25年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	神経毒素成分を精製したA型ボツリヌス毒素の三叉神経節細胞への取り込みと軸索輸送の関与
学位論文審査委員	杉本 朋貞 教授 窪木 拓男 教授 十川 紀夫 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

神経障害性疼痛は外科的手術、癌浸潤などに伴って認められる慢性痛である。詳細な発症メカニズムは依然として未解明であり、従来から治療として抗てんかん薬や抗うつ薬などが用いられることが多いが、中枢性副作用が強く服用不可能である患者も少なくない。そのため、多くの人々の苦痛を緩和し、QOLを向上させるためにも、神経障害性疼痛のメカニズム解明と副作用の少ない治療法の開発が急務の課題である。

末梢神経が障害を受けると、知覚神経節細胞から神経伝達物質が遊離され、近傍の細胞間での情報伝達(cross-excitation)が生じること、また神経障害性疼痛モデルにおいて、知覚神経節での侵害受容ニューロンの興奮が生じることが報告されている。したがって、知覚神経節における侵害受容ニューロンの興奮による伝達増強作用を軽減できれば、中枢性副作用の少ない新しい治療法につながる可能性がある。そこで、我々はボツリヌス毒素(BoNT)を用いてこの伝達増強作用を軽減することに着目した。BoNTは小胞性の神経伝達物質遊離を抑制する作用を有しており、これまでに末梢に投与した精製A型ボツリヌス毒素(BoNT/A)が三叉神経節における神経伝達物質遊離を抑制することで鎮痛効果を示す可能性が示唆されている。しかしながら、BoNT/Aが鎮痛効果を発現する詳細なメカニズム、すなわち末梢に投与したBoNT/Aの局在や細胞内輸送メカニズムははまだ確実に解明されていない。そこで本研究では、中枢性副作用を誘発しない神経障害性疼痛の治療法の開発を最終目的とし、その疼痛抑制メカニズムを解明するため、末梢に投与したBoNT/Aの三叉神経における取り込み機構、およびその細胞内輸送メカニズムに対する逆行性軸索輸送の関与について検討した。

【材料および方法】

1. *in vitro*での三叉神経節細胞におけるBoNT/Aの取り込み機構の検討

本研究は、岡山大学動物実験施設倫理委員会(#OKU/2011-190)承認のもと行った。3週齢Sprague-Dawley系雄性ラットの三叉神経節細胞の分離培養を行い、蛍光標識した精製A型ボツリヌス毒素重鎖(100 nM: BoNT/A重鎖, 岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野より供与)を培養液に加え、培養三叉神経節細胞におけるBoNT/A重鎖の取り込みを共焦点レーザー顕微鏡装置(Olympus, 東京, 日本)を用いて観察した。

また神経毒素受容体の阻害実験として、分離培養した三叉神経節細胞を神経毒素受容体であるシナプス小胞タンパク質2(synaptic vesicle:SV2)の3つのアイソフォーム(SV2A, SV2B, SV2C)の中和抗体, またコントロールとしてPBS, IgGにて1時間処理し、蛍光標識したBoNT/A重鎖を培養液に加え、三叉神経節細胞におけBoNT/A重鎖の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

2. 末梢皮内投与されたBoNT/Aの局在と輸送メカニズムの検討

ラット頬髭部中央に蛍光標識したBoNT/A重鎖, またコントロールとしてPBS, そして蛍光色素を単独で投与し, 摘出した三叉神経節組織, また三叉神経節細胞における蛍光の局在を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。また, 末梢に投与したBoNT/Aの逆行性軸索輸送の関与を明らかにするため, 蛍光標識したBoNT/A重鎖を投与する24時間前に同部位へ軸索輸送阻害剤であるコルヒチン (5 mM/ 2 μ l, Sigma, St Louis, MO, USA) を投与した。

【結果および考察】

1. *in vitro*での三叉神経節細胞におけるBoNT/Aの取り込み機構の検討

BoNT/A重鎖を投与したものは, 三叉神経節細胞内において蛍光が観察された。さらに, 三叉神経節細胞における細胞膜受容体阻害実験から, コントロールであるPBS前処理群やIgG前処理群と比較して, SV2C中和抗体前処理群は, 三叉神経節細胞内の蛍光輝度が有意に低下した。

2. 末梢皮内投与されたBoNT/Aの局在と輸送メカニズムの検討

BoNT/A重鎖を末梢に投与した三叉神経節内において, またBoNT/A重鎖を末梢に投与した三叉神経節細胞内において蛍光が観察された。また, BoNT/A重鎖を末梢に投与した三叉神経節細胞内の蛍光輝度が, 蛍光色素を単独で末梢に投与したものと比較して有意に増加した。さらにコルヒチンを前投与することにより, 三叉神経節細胞内の蛍光輝度が有意に減少した。

本研究から, BoNT/A重鎖がラット培養三叉神経節細胞内に取り込まれること, BoNT/A重鎖の三叉神経への取り込みにSV2C受容体が関与していることが明らかとなった。また, 末梢に投与したBoNT/A重鎖の三叉神経節への輸送に逆行性軸索輸送が関与する可能性が明らかとなった。したがって, 末梢に投与したBoNT/Aが三叉神経内において逆行性軸索輸送により三叉神経節へ到達し, 三叉神経節細胞内に取り込まれることで, 三叉神経節細胞における神経伝達物質の遊離を抑制し疼痛抑制効果を発現する可能性が示唆された。

【結語】

ラット培養三叉神経節細胞におけるBoNT/A重鎖の取り込みを観察し, BoNT/A重鎖が培養三叉神経節細胞内に取り込まれることを明らかにした。またラット頬髭部中央に皮内投与したBoNT/Aの三叉神経節細胞における局在を観察し, 末梢に投与したBoNT/A重鎖がSV2C受容体を介して三叉神経節細胞内に取り込まれることを明らかになった。さらに, 末梢に投与したBoNT/A重鎖の三叉神経節への輸送に逆行性軸索輸送が関与する可能性を明らかにした。以上から, 本研究結果は, 末梢に投与したBoNT/Aの疼痛抑制メカニズムの解明に大きく貢献するとともに, BoNT/Aの末梢投与が神経障害性疼痛に対する新たな治療法となる可能性をメカニズムベースでも強く示唆するものと考えられた。

学位論文審査結果の要旨

これまで、末梢に投与した精製A型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) が三叉神経節において神経伝達物質遊離を抑制し、神経障害性疼痛に対する鎮痛効果を示す可能性が示唆されている。しかしながら、BoNT/Aが鎮痛効果を発現する詳細なメカニズム、すなわち末梢に投与したBoNT/Aの局在や細胞内輸送メカニズムはいまだ確実には解明されていない。

そこで本研究では、BoNT/Aを用いた中枢性副作用の少ない神経障害性疼痛の治療法の開発を最終目的とし、その疼痛抑制における奏功メカニズムを解明するため、末梢に投与したBoNT/Aの三叉神経における取り込み機構、およびその細胞内輸送メカニズムにおける軸索輸送の関与について検討した。

*in vitro*で蛍光標識したBoNT/A重鎖を投与したラット三叉神経節細胞において、培養三叉神経節細胞内でその蛍光を認めた。また、三叉神経節細胞における細胞膜受容体阻害実験から、SV2C中和抗体前処理群は、コントロールであるPBS前処理群やIgG前処理群と比較して、三叉神経節細胞内の蛍光輝度が有意に減少した。そして、*in vivo*で蛍光標識したBoNT/A重鎖を末梢に投与した三叉神経節細胞において、三叉神経節細胞内でその蛍光を認めた。また、蛍光標識したBoNT/A重鎖を末梢に投与した三叉神経節細胞内の蛍光輝度が、末梢に蛍光色素を単独で投与したものと比較して有意に増加した。さらに、微小管形成阻害作用を持つ軸索輸送阻害剤であるコルヒチンを前投与することにより、その三叉神経節細胞内の蛍光輝度が有意に減少した。本研究から、末梢に投与したBoNT/Aが三叉神経内において軸索輸送により三叉神経節へ到達し、三叉神経節細胞内に取り込まれることで、三叉神経節細胞における神経伝達物質の遊離を抑制し、疼痛抑制効果を発現する可能性が示唆された。

以上から、本研究結果は末梢に投与したBoNT/Aの疼痛抑制メカニズムの解明に大きく貢献するとともに、BoNT/Aの末梢投与が神経障害性疼痛に対する新たな治療法となる可能性をメカニズムベースでも強く示唆するものである。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。