

氏名	田畑 光康
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5708号
学位授与の日付	平成30年3月23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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Differential induction of c-Fos and phosphorylated ERK by a noxious stimulus after peripheral nerve injury (末梢神経損傷後の侵害熱刺激による c-Fos およびリン酸化型 ERK 誘発の変化について)
論文審査委員	宮脇 卓也 教授 沢 禎彦 教授 小橋 基 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

手術や外傷によって末梢神経が損傷を受けると、その神経の支配領域やその周囲で痛覚過敏症やアロディニアといった痛覚異常が起こることがある。神経損傷によって脊髄後角2次ニューロンでは興奮性の変化が起こり、このことが神経損傷後の痛覚異常に関与していると考えられている。

末梢部位への侵害刺激により、脊髄後角2次ニューロンでc-Fosタンパクおよびリン酸化型ERK (p-ERK) の発現がみられることが知られている。これらは発現のピークとなる時間は異なるが、ともに脊髄後角2次ニューロンにおける侵害情報伝達の指標として用いられてきている。しかしながら、末梢神経損傷後にこれらの誘発変化を比較した報告はなされていない。そこで本研究では末梢神経損傷後の脊髄後角におけるc-Fosおよびp-ERKの誘発変化を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】

神経損傷手術：深麻酔下でSDラット（6週齢雄）の右側大腿部より脛骨神経を露出し、脛骨神経の腓腹筋への進入部直前で7-0絹糸を用いて結紮・切断した（脛骨神経損傷群）。神経を露出し、結紮・切断を行わないラットを対照群とした（sham手術群）。

後肢への侵害熱刺激によるc-Fosおよびp-ERKの誘発：神経損傷後3、7、14日、およびsham手術群（各群 n=5）に対し、再度麻酔を行い、右側後肢を55℃の熱水に10秒間浸した（侵害熱刺激）。熱刺激の5分後（p-ERK分析用）および2時間後（c-Fos分析用）に4%パラホルムアルデヒド溶液を用いて灌流固定し、第4から第5腰髄を含む脊髄を摘出した。第4から第5腰髄の厚さ50μmの連続凍結切片から1枚おきに切片を採取し、ウサギ由来のc-Fosおよびp-ERKタンパクに対する特異的抗体を用いたPAP法による免疫組織化学的染色を行った。

蛍光2重免疫化学染色：神経損傷手術およびsham手術後14日のラット（各群 n=5）に対して灌流固定の2時間前と5分前に2回の熱刺激を与え、灌流固定を行い、第4から第5腰髄を含む脊髄を摘出した。各髄節を吻尾側の2分割し、合計4ブロックにおける10μmの凍結切片を作製した。ウサギ由来のc-Fosおよびマウス由来のp-ERKタンパクに対する特異的抗体を用いた蛍光2重免疫染色を行った。

MEK1/2 インヒビターの投与：脛骨神経損傷および sham 手術と同時に浸透圧ポンプに接続したカテーテルの先端を第4、第5腰髄付近の脊髄背側クモ膜下腔に留置し、MEK 1/2 インヒビター（PD98059）の持続投与を行った（0、1.2、2.4 μg/day）。手術後14日で、上述のように侵害熱刺激によるc-Fosおよびp-ERKの誘発を検討した。

統計解析：c-Fosとp-ERKの陽性反応の定量的分析は第4/5腰髄移行部から吻側および尾側方向にそれぞれ1.0 mmに含まれる切片から10枚を無作為に抽出し、脊髄後角 I / II 層における陽性細胞数を脛骨神経と総腓骨神経

の中樞投射部位に分けてカウントすることによって行った。それぞれの平均値を個体の代表値とし、さらに実験グループの平均値および標準誤差を求め、統計的解析を行った。

【結果】

非侵害熱刺激（20℃）ではc-Fos、p-ERKともにほとんど誘発が認められなかったが、侵害熱刺激により多くのc-Fosおよびp-ERK陽性細胞が坐骨神経の投射領域と一致して認められた。Sham手術群において、両者の陽性細胞の数および分布は類似していた。神経損傷後3日および7日で脊髄後角の内側1/3（脛骨神経領域）でc-Fosおよびp-ERK陽性細胞数の有意な減少が認められた。神経損傷後14日において脛骨神経領域におけるc-Fos陽性細胞数はsham手術群と同程度にまで増加し、3日および7日と比較して有意な増加が認められた。一方p-ERKに関して、神経損傷後14日における陽性細胞数の増加は認められなかった。総腓骨神経領域ではc-Fosおよびp-ERK陽性細胞ともに神経損傷後の変化は認められなかった。蛍光2重免疫染色を用いた実験ではsham手術群で多くの2重陽性細胞が認められたが、脛骨神経損傷群では、総腓骨神経領域に多くの2重陽性細胞が認められたものの、脛骨神経領域では認められなかった。PD98059投与により、各領域におけるp-ERK、および総腓骨神経領域におけるc-Fos誘発に対する抑制効果は認められたが、脛骨神経領域でのc-Fos誘発に有意な変化は認められなかった。

【考察】

神経損傷後3、7日での脛骨神経領域におけるc-Fosおよびp-ERK陽性細胞数の減少は、侵害受容1次ニューロンからの入力断たれたことによるものと考えられる。神経損傷後14日では損傷後3日および7日と比較してc-Fos陽性細胞数の有意な増加が認められたが、これには周囲神経からの収斂投射が関与していることが考えられた。一方p-ERKにおいてはc-Fosで認められたような神経損傷後14日における陽性細胞数の増加は認められなかった。以上のことから通常の侵害受容伝達におけるc-Fosタンパクの発現にはERKのリン酸化が関与しているが、神経損傷後のc-Fosの過剰誘発には、別の経路が関与している可能性が考えられた。

これまでの研究でc-Fos および p-ERK の誘発はともに中枢2次ニューロンにおける侵害受容伝達の指標として用いられてきたが、神経損傷後の痛覚異常に関する侵害受容伝達では両者の誘発に違いがあることが示唆された。

論文審査結果の要旨

手術や外傷によって末梢神経が損傷を受けると、その神経の支配領域やその周囲で痛覚過敏症やアロディニアなどの痛覚異常が起こることがある。神経損傷によって脊髄後角2次ニューロンでは興奮性の変化が起こり、このことが神経損傷後の痛覚異常に関与していると考えられている。

末梢部位への侵害刺激により、脊髄後角2次ニューロンで c-Fos タンパクおよびリン酸化型 ERK (p-ERK) が発現することが知られている。これらの発現がピークとなる時間は異なるが、ともに脊髄後角2次ニューロンにおける侵害情報伝達の指標として用いられてきている。しかしながら、末梢神経損傷後にこれらの発現の変化を比較した報告はみあたらない。そこで本研究は、末梢神経損傷後、脊髄後角における c-Fos と p-ERK の発現の変化を比較検討することを目的としている。研究方法としては、脛骨神経損傷後、後肢足底部への侵害熱刺激を加え、免疫染色を行い脊髄後角における c-Fos と p-ERK の発現を観察し、灌流固定の2時間前と5分前に2回の侵害熱刺激を加え蛍光2重免疫染色を行い、脊髄後角における c-Fos と p-ERK の発現を観察している。さらに脛骨神経損傷後、侵害熱刺激による c-Fos の発現に対する MEK1/2 インヒビター (PD98059) 投与の効果についても検討している。

研究結果は以下のとおりであった。

- ・ sham 手術群では侵害熱刺激により多くの c-Fos、p-ERK 陽性細胞が認められた。
- ・ 神経損傷後3日および7日で脊髄後角の内側1/3 (脛骨神経領域) で c-Fos および p-ERK 陽性細胞数の有意な減少が認められた。神経損傷後14日において脛骨神経領域における c-Fos 陽性細胞数は3日および7日と比較して有意な増加が認められた。
- ・ p-ERK では神経損傷後14日における陽性細胞数の増加は認められなかった。
- ・ 蛍光2重免疫染色を用いた実験では、脛骨神経損傷群では脛骨神経領域で多くの c-Fos 陽性/p-ERK 陰性細胞が認められた。
- ・ PD98059 投与により、各領域における p-ERK、および総腓骨神経領域における c-Fos の発現に対する抑制効果は認められたが、脛骨神経領域での c-Fos の発現に有意な変化は認められなかった。

以上の結果から、通常の侵害受容伝達においては ERK のリン酸化は c-Fos の発現に関与しているが、神経損傷後の中枢2次ニューロンにおける c-Fos の過剰応答には ERK のリン酸化が関与していない可能性が示唆された。

本論文は、c-Fos と p-ERK の侵害情報伝達の指標としての位置づけ、および神経障害性疼痛発症の機序に関する重要な知見を示している。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。