



Title	口腔顔面領域の神経障害性疼痛に対するNetrin-1の関与
Author(s)	濱辺, 夕華
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105341
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (濱 辺 夕 華)

論文題名 口腔顔面領域の神経障害性疼痛に対するNetrin-1の関与

論文内容の要旨

【目的】

神経障害性疼痛とは体性感覚神経系の病変や疾患によって引き起こされる疼痛と定義され、痛覚過敏やアロディニアだけでなく、疼痛に伴うさまざまな症状からQOL（生活の質）の低下につながる。口腔顔面領域においても抜歯や抜髄などの機械的に神経を切断する処置や手術などによる神経損傷、帯状疱疹などによって神経障害性疼痛を引き起こす場合がある。

Netrinとはラミニンに相同性をもつ細胞外タンパク質ファミリーであり、発生期においては軸索誘導やさまざまな臓器の細胞接着や遊走、分化、成体においては血管新生や腫瘍発生を促進していることが明らかになっている。この受容体としては、Deleted in Colorectal Cancer (DCC) やUncoordinated-5 homolog family members (UNC5A-D)、Down syndrome cell adhesion molecule (DSCAM) などが存在し、Netrinが作用することで軸索誘導を行うといわれている。また、Netrinは神経障害性疼痛を含む痛みに関与することが報告されているが、三叉神経系の神経障害性疼痛の発症メカニズムに対するNetrin-1の関与についての報告はない。

そこで、本研究では三叉神経系の神経障害性疼痛におけるNetrin-1の関与を明らかにするために、神経障害性疼痛動物モデルを用いて、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) におけるNetrin-1の発現およびその作用発現に関与する受容体について検討を行った。

【方法】

1. 口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットの作製

6～7週齢の雄性SDラットを用い、全身麻酔下で左側の眼窩下神経を2か所で緩やかに結紮し閉創した（chronic constriction injury: CCI群）。対照群では左側眼窩下神経の剖出のみを行い、結紮せずに閉創した（Sham群）。

2. 機械刺激に対する逃避閾値の測定 (von Frey test)

ラットを環境に馴化させたのち、非抑制下でvon Frey filamentを用いて結紮側の口ひげ部の中央部に機械刺激を与え、5回中3回以上逃避行動を示す機械刺激の強さの最小値を逃避閾値として記録した。測定は神経結紮前、結紮後7日目、14日目、21日目に行った。

3. 神経活性の免疫組織学的検討

神経結紮後14日目のラットに15.0 gのvon Frey filamentで5分間、60回/分で口ひげ部を刺激後に灌流固定を行い、脳を取り出し、Vc領域を含むように包埋した。厚さ30 μmの連続冠状凍結切片を作製し、obexおよびobexより頭側に720 μm、1440 μm、尾側に720 μm、1440 μm、2160 μmの6切片を抽出した。抽出した切片を用いてphosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK) に対する免疫組織学的染色を行い、6切片のVc表層に認められたpERK陽性細胞数を計数し、1切片あたりの平均数を算出した。

4. VcにおけるNetrin-1とその受容体の発現細胞の検討

神経結紮後14日目のラットを灌流固定し、実験3と同様の方法で6切片の抽出まで行った。抽出した切片を用いて、Netrin-1、神経細胞、ミクログリア、アストロサイト、UNC5B、DCCに対する免疫組織学的染色を行い、6切片のVcにおけるNetrin-1とUNC5B、DCCの発現細胞数を計数し、1切片あたりの平均数を算出した。

5. 疼痛発症に対するNetrin-1の作用の検討

5.1 Recombinant Netrin-1の大槽内投与

全身麻酔下でnaïve ratの背側頸部皮膚に切開を入れ、後頭結節と第一頸椎との間膜を露出し、30 μLの生理食塩水で溶解したrecombinant Netrin-1 (2.0 μg) を大槽内に緩徐に投与した（Netrin-1群）。対照群には30 μLの生理食塩水を緩徐に投与した（NS群）。行動実験として、大槽内投与前、投与後1日目、7日目、14日目にvon Frey testを行い、大槽内投与後14日目には実験3と同様の方法で神経活性の免疫組織学的検討を行った。

5.2 抗UNC5B抗体の大槽内投与

全身麻酔下で神経結紮後14日目のラットの背側頸部皮膚に切開を入れ、後頭結節と第一頸椎との間膜を露出し、30 μ Lの生理食塩水で溶解した抗UNC5B抗体 (2.0 μ g) (抗UNC5B抗体投与群)、またはcontrol IgG (2.0 μ g) (control IgG投与群) を大槽内に緩徐に投与した。行動実験として、抗体投与前、抗体投与後1日目、7日目にvon Frey testを行った。

【結果】

1. 眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛モデルの作製

1.1 von Frey test

CCI群は神経結紮前と比較して、結紮後7日目、14日目、21日目で逃避閾値が有意に低下した。Sham群は神経結紮前と比較して、結紮後7日目で逃避閾値が有意に低下し、その後回復した。また、CCI群はSham群と比較して結紮後14日目、21日目で逃避閾値が有意に低下した。

1.2 神経結紮によるVcの活性化

神経結紮後14日目のラットに対して口ひげ部を刺激すると、CCI群とSham群のVc表層でpERK陽性細胞の発現を認め、その発現数はSham群と比較してCCI群で有意に増加していた。

2. VcにおけるNetrin-1とその受容体の発現細胞の同定

神経結紮後14日目のVc領域の神経細胞にはNetrin-1、UNC5B、DCCが発現していたが、ミクログリア、アストロサイトにはNetrin-1の発現はみられなかった。また、CCI群のVc領域におけるNetrin-1陽性神経細胞数はSham群と比較して有意に増加しており、UNC5B陽性神経細胞数、DCC陽性神経細胞数は両群で有意差はみられなかった。

3. Recombinant Netrin-1および抗UNC5B抗体の大槽内投与による疼痛発症への影響

3.1 Recombinant Netrin-1の大槽内投与

Netrin-1群はNS群と比較して、大槽内投与後1日目、7日目、14日目で逃避閾値が有意に低下し、大槽内投与前と比較して、投与後1日目、7日目、14日目で逃避閾値が有意に低下した。また、大槽内投与後14日目で口ひげ部を刺激すると、Netrin-1群とNS群のVc表層でpERK陽性細胞の発現を認め、その発現数はNS群と比較してNetrin-1群で有意に増加していた。

3.2 抗UNC5B抗体の大槽内投与

CCIラットにおいて、抗UNC5B抗体投与群では抗体投与前と比較して抗体投与後1日目の逃避閾値が有意に上昇した。

【考察および結論】

本研究では、Sham群は神経結紮前と比較して結紮後7日目で逃避閾値が有意に低下し、14日目には回復していた。このような一過性の逃避閾値の低下は、外科的侵襲による一過性の炎症反応が原因と考えられた。また、眼窩下神経結紮による神経障害性疼痛の発症にはVcにおけるERKのリン酸化が関与していることが過去の報告で示されているが、本研究でも同様の結果が認められた。以上より、神経結紮後14日目でアロディニアが発症していると考え、神経結紮前と比較して結紮後14日目において逃避閾値が低下したラットを神経障害性疼痛モデルラットとして使用した。

神経結紮後14日目のVc領域でNetrin-1が神経細胞に発現し、さらにCCI群でNetrin-1陽性神経細胞数の増加が認められたことより、Netrin-1がアロディニア発症に関与することが示唆された。Netrin-1の受容体であるUNC5BおよびDCCも、結紮後14日目のVc領域で神経細胞に発現していることが明らかになった。以上より、神経損傷によりNetrin-1の発現が増加し、UNC5BあるいはDCCに作用することで、神経障害性疼痛を発症することが示唆された。

Recombinant Netrin-1投与によりNetrin-1群で逃避閾値が低下し、pERK陽性細胞数が増加していたことより、Netrin-1がVc領域で神経細胞を活性化し、疼痛発症を引き起こしていると考えられた。また、抗UNC5B抗体投与後1日目に逃避閾値が上昇したことより、Vc領域におけるUNC5Bを介したシグナル伝達経路がアロディニア発症に関与していることが示唆された。

以上より、口腔顔面領域の神経障害性疼痛では、Vc領域の神経細胞で増加したNetrin-1がUNC5Bを介して三叉神経痛覚伝導路を活性化することで疼痛発症に関与すると考えられた。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (濱 辺 タ 華)			
	(職) 氏 名		
論文審査担当者	主 査	准教授	工藤 千穂
	副 査	教授	田熊 一敬
	副 査	教授	古田 貴寛
	副 査	講師	横田 祐介
論文審査の結果の要旨 本研究は、口腔顔面領域の神経障害性疼痛に対する Netrin-1 の関与に関して、神経損傷モデルラットを用いて、三叉神経脊髄路核尾側亜核における Netrin-1 の発現やその作用発現に関与する受容体について行動学的、免疫組織学的に検討したものである。 その結果、Netrin-1 は神経損傷により三叉神経脊髄路核尾側亜核の神経細胞で発現が増加し、その受容体である UNC5B を介して疼痛発症に関与する可能性を見出した。 本研究の結果は、口腔顔面領域の神経障害性疼痛のメカニズムの解明の一助となるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値あるものと認める。			