



Title	アジュバント誘導痛覚過敏に対するc-fosアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの脊髄腔内投与の影響
Author(s)	杉生, 真一
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/43664">https://hdl.handle.net/11094/43664</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名	杉生真一
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第16943号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	アジュバント誘導痛覚過敏に対するc-fosアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドの脊髄腔内投与の影響
論文審査委員	(主査) 教授 重永 凱男  (副査) 教授 野首 孝祠 助教授 杉村 光隆 助教授 米原 典史

## 論文内容の要旨

## 【目的】

脳は複雑な神経回路からなるため、同じ伝達物質でも、その作用効果はニューロンの違い、また同一ニューロンでの部位（細胞体、軸索円錐、軸索瘤、樹状突起）の違いによって異なる。また、レセプターも様々なサブユニットからなり、それらの分布様態は神経細胞の機能により異なる。

アンチセンス法は、アンチセンス（AS）オリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を生体内に投与し、実際にmRNAが生産されている細胞で翻訳を阻害し、遺伝子発現の抑制を可能にする方法である。すなわちこの方法を用いてin vivoで、その生体内での遺伝子の役割をさぐることが出来る。

末梢部への疼痛刺激により脊髄後角、特に浅層部（L I / II）にc-Fos発現が一過性に認められる。c-Fos蛋白はdynorphine, enkephalin, cholecystokinin等のペプチドの遺伝子のプロモーター領域に他のプロトオンコジーンと二量体を形成して結合し、ペプチド遺伝子の転写を制御すると考えられている。c-Fos蛋白発現が疼痛感覚を実際にどう制御するかはほとんど知られていない。

ラットの後肢足底に起炎剤であるアジュバント（CFA）を一側性に注射し、熱疼痛刺激からの逃避行動に対し、チオリン酸化（修飾）したc-fos AS及びミスマッチ（MM）ODNの脊髄腔内前投与の影響を調べた。

## 【方法】

計、82匹の雄性SD系ラット（体重250-300g）を用いた。実験を三つのグループに分けた。(1)30匹の動物は、c-fos AS ODN, c-fos MM ODN及び生理食塩水（生食水）を腰脊髄腔内に前投与し、CFA足底注射後の熱侵害逃避行動を調べるために用いた。(2)32匹の動物は、CFAを足底に注射し脊髄のc-Fosを免疫染色してCFA注入後の時間的発現様式を調べるために用いた。(3)20匹の動物は、10nM, 25nMのc-fos AS ODN, c-fos MM ODN及び生食水を脊髄腔内へ前投与し、CFA注射後3時間目の脊髄のc-Fos発現を免疫組織化学法にて調べるために用いた。

麻酔下で（Na-ペントバービタール、50mg/kg, i.p.）L5の椎骨の棘突起を除去し、PE-10チューブ（Becton Dickinson and Company）を吻側方向に2.5cm挿入（腰膨大部L<sub>4-5</sub>）、その位置に固定し、他端を皮下に通し頸部に開放したラットを作製した。数日後キシロカイン0.5%をそのカテーテルから注入し、下半身の一過性の麻痺を認めたものを実験に供した。さらに数日後外科手術の侵襲からの回復を待って、CFA注射4時間前にc-fos AS ODN, c-fos

MM ODN (10nM, 又は25nM)、又は生食水（容量はすべて20 $\mu$ lになるよう調整）をカテーテルを通して脊髄内に投与した。

*c-fos* AS ODN の塩基配列は5' GAA CAT CAT GGT CGT3'、*c-fos* MM ODN は5' GTA CAC CAT GGT TGT3'でいずれも修飾したものである。CFA の注射は、右後肢の足底皮下に0.2ml の CFA (100  $\mu$ g Mycobacterium butyricum を含む) を用いて行った。免疫染色による c-Fos 発現は、CFA を注入 3 時間後動物を灌流固定し、通法に従ってL<sub>4-6</sub>の60  $\mu$ m の凍結連続横断切片を作製した。その後、c-Fos 発現に対する *c-fos* AS と *c-fos* MM ODN 前投与の影響を免疫組織化学法にて確認した。CFA 注入直後より当日は 1 時間毎に、翌日からは 1 日毎に 7 日まで Plantar Test (Model7370 ; Ugo Basile, Verese, Italy) を用いて熱疼痛刺激に対する逃避時間を測定した。

### 【結果】

c-Fos 発現を免疫組織化学法を用いて確かめた結果、C-Fos 陽性ニューロンの個数は *c-fos* AS ODN (10nM で平均士標準誤差=43.9±1.3 ; 25nM で19.4±4.1) の前投与では *c-fos* MM ODN (63.6±2.9 ; 60.6±4.0)、生食 (56.6±5.5) 前投与と比べ、有意に CFA 誘導 c-Fos 陽性ニューロンの個数が減少した。また25nM の *c-fos* AS ODN を前投与したラットの CFA 誘導熱痛覚過敏反応は *c-fos* MM ODN 前投与したものに比べ有意に減少した。10nM の前投与でも痛覚過敏反応の減少が確認されたが、反応抑制効果は25nM よりは劣った。

### 【考察及び結論】

*c-fos* AS ODN の脊髄腔への前投与が CFA 誘導 c-Fos 発現を抑制することを確認した。c-Fos 発現は疼痛認識を促進する方向に働くと考えられる。修飾 AS ODN の有効濃度は非修飾 AS ODN に比べ少量で効果を持つが、修飾による毒性の発現を考慮すると有効濃度は限られていると考えられる。

### 論文審査の結果の要旨

本研究は、即時遺伝子である c-Fos 蛋白の発現と痛覚との関連性について検討したものである。アジュバント注射による c-Fos 蛋白の発現は、*c-fos*に対する合成アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチドを脊髄腔内導入により抑制した。また、この抑制効果は熱疼痛受容の動態と一致した。以上の結果により脊髄後角第 I 層と II 層における c-Fos 蛋白の発現が痛みの増強に関与することを明らかにした。

これらの結果は、脊髄における疼痛発現機構を追求するうえで、重要な知見を呈示したものであり、博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。