The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Tissue type plasminogen activator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury
Author(s)	香西, 都容子
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47403
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、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

【68】

氏　　名	香西　都容子（こうざい　とよこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　２０９６６　号
学位授与年月日	平成 19 年３月 23 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科生体統合医学専攻
学　位　論　文　名	Tissue type plasminogen actibator induced in rat dorsal horn astrocytes contributes to mechanical hypersensitivity following dorsal root injury. （神経根損傷後に活性化された脊髄アストロサイトで発現増加する組織型プラスミノーゲン活性化因子が神経因性疼痛に関与する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　真下　　節 （副査） 教　授　吉峰　俊樹　　教　授　遠山　正彌

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

Tissue type plasminogen activator（tPA）は、セリンプロテアーゼの一種であり、プラスミノーゲンをプラスミンに変換する。tPA 活性は、神経系の成長および再生に重要な役割を果たし、細胞外マトリクスの修飾、および海馬における long-term potentiation（LTP）などの神経系の可塑的変化に関与する。これまで、末梢神経（坐骨神経）が損傷を受けると後根神経節（DRG）において tPA mRNA が発現し、脊髄後角の一次求心繊維終末へと移動した tPA の酵素活性が、neuropathic pain の発生に関与していると報告されている。一方、脊髄根が損傷されると、脊髄でのグリア細胞が活性化されること、および pain behavior を呈することが知られているが、その機序は明らかにされていない。本研究では、脊髄根完全損傷および部分損傷の二種類のモデルにおいて、根損傷が侵害受容経路における tPA の反応系、および pain behavior に及ぼす影響を検討した。

【方法】

1. 雄性 Sprague-Dawley（SD）ラットの左側腰髄 L4 および L5 の前根および後根を切断した rhizotomy model を作製した。３後に L4-L5 レベルの 8μm フレッシュ脊髄切片を作製した。さらに model 作製３、12 時間後、１、３、５、７、10、14 日後に灌流固定を行い、25μm 固定脊髄切片を作製した。

1.1 tPA mRNA の発現は、フレッシュ切片に tPA コード領域を α-^{35}S UTP でラベルしたプローブを用いた *in situ* hybridization（ISH）で検討した。tPA 発現は、固定脊髄に抗 tPA 抗体を用いた免疫組織化学法にて検討した。

1.2 酵素活性の検出には、フレッシュ切片にプラスミノーゲンを基質とする *in situ* zymography（ISZ）を施行した。tPA の特異的阻害剤である tPA-STOP を用いて、活性の由来を検討した。

1.3 脊髄後角内在の tPA 発現細胞の同定は、固定切片を用いて、抗 tPA 抗体とそれぞれニューロン、マイクログリア、およびアストロサイトのマーカー抗体 NeuN、Ibal、および GFAP とを用いた蛍光二重染色法にて検討した。

2. SD ラットの左側腰髄 L5 の前根および後根を緩く結紮した radiculopathy pain model を作製した。

2.1 術後 12 時間後、１、３、５、７、10、14 日後に灌流固定し、L5 レベルの 25μm 固定脊髄切片を作製した。tPA

発現は、免疫組織化学法にて検討した。

2.2 Pain behavior は、術前、術後１、３、５、７、９、11、13、15 日に、金属網上のラット足底に下から機械的刺激を与え、足を引っ込める際の加重量を mechanical allodynia の指標とした。tPA 活性の影響を検討するために、髄腔内カテーテルを挿入し皮下に留置したポンプより、tPA-STOP を術直後（24、240、480 pmol/d）、4 および 10 日後（480 pmol/d）からを持続投与した。

【成績】

1.1 Rhizotomy により tPA mRNA は患側の脊髄後角で発現増加した。tPA は後角 I-IV 層で手術 12 時間後から有意に発現増加し始め、3 日目をピークとする一過性の増加を示し、7 日後まで sham 群との比較で有意差を示した。

1.2 患側の脊髄後角に内因性の tPA 活性を認めた。

1.3 tPA 発現細胞は、ニューロン、よびマイクログリアではなく、主に Rhizotomy により活性化され、肥大したアストロサイトであった。

2.1 根部分損傷により tPA は 1 日後から脊髄後角 I-IV 層に発現増加し、14 日後も有意な発現増加が持続した。

2.2 ラットは術後 1 日より Mechanical allodynia を呈し、15 日後も持続を認めた。tPA-STOP の術直後からの持続投与では、投与量依存的に mechanical allodynia が抑制され、4 日後からの投与においても抑制を認めた。しかし、10 日後からの投与では抑制されなかった。

【総括】

本研究では、一次神経終末が脱落した脊髄後角において、活性化された脊髄アストロサイトで酵素活性を有する tPA が一過性に発現増加することを明らかにした。さらに、脊髄神経根部分損傷モデルでは、活性化された脊髄アストロサイトで tPA の発現増加が長期間持続し、mechanical allodynia の発症期間と一致することを示した。又、tPA の阻害剤により mechanical allodynia の発症が抑制されることにより、tPA は radiculopathy pain の trigger としての性質を有することが示された。従って、本研究により神経根損傷に伴う疼痛の新規メカニズムが提示された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、雄性 SD ラットの脊髄神経根完全損傷モデルを用い、serine protease の一種である tissue type plasminogen actibator（tPA）が、一次神経終末が脱落した脊髄後角において、活性化された脊髄 astrocyte で、酵素活性を有し、一過性に発現増加することを明らかにした。さらに、脊髄神経根部分損傷モデルでは、活性化された脊髄 astrocyte で tPA の発現増加が長期間持続し、mechanical allodynia の発症期間と一致することを示した。又、tPA の阻害剤により mechanical allodynia の発症が抑制されることより、tPA は radiculopathy pain の trigger としての性質を有することが示された。従って、これらの結果より神経根損傷に伴う疼痛の新規メカニズムを提示した本研究は、学位に値するものと認める。