

Title	三叉神経領域へのカプサイシン刺激による侵害受容に対するエストロゲンの影響
Author(s)	山形, 和彰
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.18910/52322">https://doi.org/10.18910/52322</a>
rights	This article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License (CC-BY-NC; <a href="https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/</a> ).
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

## 論文内容の要旨

氏 名 (山形 和彰)	
論文題名	三叉神経領域へのカプサイシン刺激による侵害受容に対するエストロゲンの影響
論文内容の要旨	
<p><b>【目的】</b></p> <p>疼痛感受性には性差があり、男性よりも女性の方が痛みをより強く訴える傾向にある。このような性差が生じる原因として、閉経後の女性ではエストロゲン補充療法によって熱刺激に対する閾値が低下すること (Filli ngi mand Edwards., 2001) や顎関節症の症状が悪化すること (Leresche et al., 1997) などから、女性ホルモン、特にエストロゲン (E<sub>2</sub>) の疼痛感受性に対する修飾作用が考えられている。</p> <p>一方、近年、末梢での侵害受容において、Transient receptor potential vanilloid type1 (TRPV1) と Anoctamin1 (ANO1) が注目されている。TRPV1 は、カプサイシン (Cap) や熱 (43 °C以上)、酸 (プロトン) に応答する Ca<sup>2+</sup>透過性の高い非選択性陽イオンチャネルであり、炎症時や組織損傷時にはその活性や発現が高まり、痛覚過敏を惹起することが知られている。また、Cl<sup>-</sup>チャネルの一つである ANO1 は、侵害受容に対して TRPV1 と共役的に重要な役割を果たすイオンチャネルであることが示唆されている。しかし、E<sub>2</sub> が疼痛感受性を修飾するメカニズムにおいて、TRPV1 と ANO1 への関与については明らかになっていない。</p> <p>そこで本研究では、卵巣摘出 (OVX) ラットに高濃度又は低濃度の 17β-エストラジオール-3-ベンゾア-ゼ (E<sub>2</sub>) を短期間投与し、三叉神経第一枝支配領域 (眼球表面) に TRPV1 のリガンドである Cap を点眼した場合の、侵害受容に対する E<sub>2</sub> の修飾作用を行動学的、免疫組織学的に検討した。さらに、三叉神経節 (TG) での TRPV1 及び ANO1 の mRNA量に対する E<sub>2</sub> の影響を Real-time PCRにて検討した。</p> <p><b>【方法】</b></p> <p><u>E<sub>2</sub>投与OVXラットの作製</u></p> <p>雌性SDラット (11週齢、体重210~230 g) を用い、ペントバルビタール (50 ng/kg i p) 麻酔下にOVXし、その3週後実験に供した。4 μg (LE群) または40 μg (HE群) のE<sub>2</sub>をセサミオイル200 μlに溶解し、実験2日前より連日単回皮下投与して、以下の検討を行った。</p> <p><u>行動学的検討 (Eye wipe test)</u></p> <p>覚醒下で、マイクロピペットに採取したvehicleまたは1 mM Cap溶液10 μlを左眼球上に滴下した。滴下後5分間で前足または後足で左眼を擦っている、または閉眼している時間を計測し、疼痛関連行動時間とした。</p> <p><u>免疫組織学的検討 (c-Fos免疫反応)</u></p> <p>ペントバルビタール (50 ng/kg) で麻酔し、vehicle、1 mMまたは10 mMのCap溶液10 μlを左眼球上に滴下した。滴下2時間後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で脱血し、4%パラホルムアルデヒド溶液500 mlで経心臓的に灌流固定した。次に、下部脳幹から上部頸髄を摘出し、通法に従いc-Fos陽性細胞の免疫染色を行った。</p> <p>c-Fos-IR細胞発現は門を基準に、吻側+1.0 mmから-6.0 mmまでの10枚毎の切片を顕微鏡下 (×100) で観察し、三叉神経脊髄路核中間亜核・尾側亜核の境界付近 (Vi/Vc, +0.5~-1.0 mm)、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Mld Vc, -1.5~-2.5 mm)、三叉神経脊髄路核尾側亜核・上部頸髄境界</p>	

付近 (Vc/Cl, -3.0~-5.0 mm) におけるc-Fos-IR細胞数の平均値を比較した。Mid VcとVc/Clは浅層部 (Laminae I/II) と大細胞部 (Laminae III-V) を区別して観察した。

#### 分子生物学的検討 (Real-time PCR)

ペントバルビタール (50 mg/kg) 麻酔下で断頭後、三叉神経節の第一・二枝領域を摘出した。摘出した組織よりtotal RNAを抽出し、cDNAへ逆転写反応させた。その後、 $\beta$ -actinを内部標準としTRPV1とANO1のmRNA量をリアルタイムPCRで相対定量解析した。

#### データ解析

検定はunpaired student's t test、two-way ANOVA、多重比較はScheffé's F testを用い、 $p < 0.05$ を有意とした。

#### **【結果】**

#### 行動学的検討 (Eye wipe test)

1 mM Cap滴下により、Vehicle群に比べてHE群およびLE群の疼痛関連行動時間は延長した。またLE群に比べHE群の方が有意に長かった。

#### 免疫組織学的検討 (c-Fos免疫反応)

Vc/Cl領域表層で1 mM Cap、10 mM Cap滴下により、LE群と比べ、HE群の方がc-Fos陽性細胞が有意に多かった。一方、Vi/Vc領域、およびmid Vc領域では両群間に差は認めず、mid Vc、Vc/Cl領域の深層では両群ともc-Fos陽性細胞はほとんど認めなかった。

#### 分子生物学的検討 (Real-time PCR)

TRPV1、ANO1いずれのmRNA量も、LE群に比べ、HE群での有意に増加していた。

#### **【考察および結語】**

三叉神経第一枝領域へのCap刺激により、LE群よりHE群の方が疼痛関連行動時間が有意に延長すること、さらにVc/Cl領域でc-Fos陽性細胞の発現が有意に多かったことから、E2はCap刺激に対する疼痛感受性を亢進することが示唆された。さらに、Real-time PCRにおいて、三叉神経節におけるTRPV1やANO1のmRNA量がHE群で増加することから、Cap刺激による疼痛感受性の亢進を惹起する機構の1つとして、E2がTRPV1やANO1といったイオンチャネルの発現を亢進させる可能性が示された。

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 ( 山形 和彰 )			
		(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授	丹羽 均
	副 査	教授	田熊 一徹
	副 査	准教授	豊田 博紀
	副 査	講師	墨 哲郎
<b>論文審査の結果の要旨</b>			
<p>本研究は、三叉神経第一枝支配領域（眼球表面）へのカプサイシン刺激に対するエストロゲンの修飾作用を行動学的、免疫組織学的に検討し、さらに三叉神経節での <b>TRPV1</b> 及び <b>ANO1</b> の <b>mRNA</b>量に対する影響を分子生物学的に検討したものである。</p> <p>その結果、エストロゲンはカプサイシン刺激による疼痛関連行動時間を有意に延長させること、三叉神経尾側亜核と上部頸髄境界付近で <b>c-Fos-IR</b>細胞の発現を亢進させること、さらに三叉神経節で <b>TRPV1</b> 及び <b>ANO1</b> の <b>mRNA</b>量を亢進させることが示された。</p> <p>以上のことは、エストロゲンがカプサイシン刺激に対する疼痛感受性を亢進させること、その機序の一つとして <b>TRPV1</b> や <b>ANO1</b> といったイオンチャネルの発現を亢進させることを示唆するものであり、これらのイオンチャネルが女性の疼痛薬開発の新たなターゲットになる可能性が示された。よって、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものとして認める。</p>			