The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	顎顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットを用いた抗Netrin-4抗体の鎮痛効果についての検討
Author(s)	本城, 有華
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76291
rights	© 2021 Honjo et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　本城　有華　）	
論文題名	顎顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットを用いた抗Netrin-4抗体の鎮痛効果についての検討

論文内容の要旨

【目的】

神経障害性疼痛は国際疼痛学会により「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、侵害受容性疼痛とは異なる特徴的な痛み（自発痛やアロディニア、痛覚過敏など）を呈する。神経障害性疼痛は顎顔面領域においても手術などによる神経損傷や悪性腫瘍による神経障害、神経変性疾患など様々な要因で生じ、三環系抗うつ薬をはじめとする薬物療法や神経ブロック療法などの治療が行われるが、鎮痛効果が不十分な場合や、年齢や副作用のために使用できない場合もある。一方、Netrinは細胞遊走や細胞死、神経突起形成、シナプス形成など発生・発達期の神経回路形成に重要な役割を担っている分泌タンパク質で成体における機能については明らかにされていなかったが、近年、Netrin-4が脊髄後角に発現し、神経損傷による慢性疼痛に関与している可能性が報告された。そこで本研究は顎顔面領域の神経障害性疼痛の新しい分子メカニズムを解明することで新しい治療法を確立することを目的として、Netrin-4が三叉神経脊髄路核尾側亜核（Vc）にも発現し、顎顔面領域の神経障害性疼痛に関与しているか、さらにその痛みに対して、抗Netrin-4抗体が鎮痛効果を示すかを検討した。

【方法】

1. 神経障害性疼痛モデルラットの作製

顎顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットを作製するために、眼窩下神経の慢性絞扼神経損傷（chronic constriction injury：CCI）を行った。6週齢の雄性SDラットのwhisker padを全身麻酔下で切開し、左側の眼窩下神経を剖出して6-0ナイロンで結紮したのち皮膚縫合を行った（CCI：ipsi側）。さらに対側にSham処置として右側眼窩下神経の剖出のみを行った（Sham：contra側）。以降、この処置をCCI-Sham処置と表記する。これらのモデルに対しては処置前と処置後7, 14, 21日目にvon Frey filamentを用いて行動学的疼痛評価を行った。

2. 抗Netrin-4抗体の鎮痛効果について行動学的疼痛評価

CCI-Sham処置後14日目において、処置前よりも逃避閾値が低下したラットに対し、抗Netrin-4抗体（R&D、AF1132、30μg、生理食塩水50μlで溶解）、またはNormal Goat IgG（Wako、144-09531、30μg、生理食塩水で50μlに希釈）をマイクロスコープ下で大槽内に単回投与した。抗体投与後1, 7日目（CCI-Sham処置後15日、21日目）にvon Frey filament を用いて行動学的疼痛評価を行った。

3. 抗Netrin-4抗体の鎮痛効果について免疫組織化学的検討

CCI-Sham処置後14日目および抗体投与後1日目（CCI-Sham処置後15日目）のラットの行動学的疼痛評価を行い、30分後に灌流固定し、Vc及び上部頚髄（C1-C2）を含むように摘出した。その後、抗pERK抗体（#4370、1:200、CST）と抗NeuN抗体（MAB377、1:1000、Millipore）を用いて蛍光免疫染色法を行い、Vc～C1（+1440,+720,obex,-720,-1440,-2160μm）において、抗pERK抗体と抗NeuN抗体に共陽性を示した細胞数を計測し、抗Netrin-4抗体による神経細胞活性化の変化について検討した。

3. Netrin-4とその受容体であるUnc5Bの発現についての検討

CCI－Sham処置後14日目に処置前よりも逃避閾値が低下したラットを灌流固定し、抗Netrin-4抗体（HPA049832、1:50、ATLAS）と抗Unc5B抗体（HPA01141、1:200、ATLAS）を用いて、Vc～C1（+1440,+720,obex,-720,-1440,-2160μm）の蛍光免疫染色法を行った。

またCCI-Sham処置前、処置後7, 14, 21日目のラットに行動学的疼痛評価を行った後、脱血して凍結させ、レーザーマイクロダイセクション法にてVc～C1を部分的に採取した。それらのサンプルについてRT-PCR法により、Netrin-4とUnc5BのmRNAの発現量を定量解析した。

【結果】

1. 眼窩下神経結紮モデルラットにおける逃避閾値の変化（von Frey test）

眼窩下神経結紮を施したipsi側は結紮前と比較して処置後14，21日目に有意に疼痛閾値が低下した（$p<0.05$）。以降のすべての実験ではこのモデルを使用して行った。

2. 抗Netrin-4抗体投与による逃避閾値の変化（von Frey test）

CCI-Sham処置後14日目に各抗体を投与すると、抗Netrin-4抗体投与群ではControl抗体投与群と比較し、抗体投与1日後（CCI-Sham処置後15日）に眼窩下神経結紮を施したipsi側の逃避閾値が有意に上昇した（$p<0.05$）。

3. VcおよびC1におけるpERK発現神経細胞に対する抗Netrin-4抗体の影響

抗体投与なし群のipsi側はcontra側と比較し、有意にpERK陽性神経細胞数が増加した。また抗体投与1日後のipsi側において、抗Netrin-4抗体投与群は抗体投与なし群、Control抗体投与群と比較し、有意にpERK陽性神経細胞数が減少した（$p<0.05$）。

4. VcおよびC1におけるNetrin-4およびUnc5Bの発現変化

CCI-Sham処置後14日目の蛍光免疫染色法によりNetrin-4 、Unc5BともにVc～C1に発現を認めた。またRT-PCR法による定量解析において、Netrin-4のmRNA発現はCCI-Sham処置前と比較し、処置後14日目に有意に増加したが（$p<0.05$）、Unc5Bは変化しなかった。

【考察】

本研究では眼窩下神経結紮による神経損傷により、機械的刺激に対する痛覚過敏を認めた。また眼窩下神経結紮によりpERK陽性神経細胞数が増加しており、これは末梢神経感作や中枢性感作が生じてVcの神経細胞がpERKを発現したことで、痛覚過敏状態であることを示唆している。

Vcにおいて、Netrin-4とUnc5Bは共に神経細胞に発現し、特にCCI-Sham処置後14日目に、Netrin-4のmRNA発現が増加していた。また抗Netrin-4抗体投与群では逃避閾値は上昇し、ipsi側のpERK陽性神経細胞数が減少していた。以上のことから、眼窩下神経を損傷すると、VcにおけるNetrin-4が増加し、神経細胞に発現するUnc5Bに結合することで痛覚過敏を引き起こすと考えられる。脊髄ではNetrin-4がUnc5Bに結合すると、Unc5Bに結合しているSHP2（SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2）が活性化したことから、Vcにおける抗Netrin-4抗体の鎮痛メカニズムとしては、抗Netrin-4抗体によってNetrin-4とUnc5Bの結合が阻害されると、Unc5Bに結合しているSHP2活性化が抑制され、何らかのタンパク質を介したRas-MAPK経路の活性化が抑制されることでpERKの発現が低下し、神経細胞の活性化が抑制されるのではないかと推測される。

先行研究で脊髄においてNetrin-4はmRNA発現量に変化は認めず、Unc5BのmRNA発現量が増加していた。しかしUnc5BのmRNA発現量については脊髄損傷後に一度減少し、その後回復するという報告もあり、VcにおけるmRNAの変化を捉え切っていない可能性もある。またCCI-Sham処置後14日目のUnc5Bのタンパク質発現量が変化している可能性もあるためUnc5Bの発現変化については更なる検討が必要である。さらにNetrin-4がUnc5B以外の受容体のラミニンγ1と結合するという報告もあるため、VcにおいてはUnc5B以外の受容体の関与も考慮する必要がある。

【結論】

眼窩下神経結紮による神経損傷により、三叉神経脊髄路核尾側亜核においてNetrin-4の発現が増加し、Unc5Bに結合することで痛覚過敏が発症したと推測された。また抗Netrin-4抗体は、神経細胞活性化による疼痛を抑制したことから、顎顔面領域の神経障害性疼痛に有効であり、今後ヒトへの応用についても期待される。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　本城　有華　）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	丹羽　均
	副 査	教授	加藤　隆史
	副 査	准教授	中澤　敬信
	副 査	講師	田中　晋

論文審査の結果の要旨

本研究は、顎顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットを用い、顎顔面領域の神経障害性疼痛へのNetrin-4 の関与、および抗 Netrin-4 抗体の鎮痛効果について検討したものである。本研究の結果より、眼窩下神経を損傷すると三叉神経脊髄路核尾側亜核において Netrin-4 の発現が増加し、神経細胞の活性化が増大することで神経障害性疼痛の発症に関与する可能性が明らかとなった。さらにその疼痛は抗 Netrin-4 抗体の投与により抑制されたため、Netrin-4 が治療の標的候補となることが示唆された。

これらの結果は顎顔面領域の神経障害性疼痛の新規メカニズムの解明に寄与し、有効な治療法確立の一助になるものであり、よって博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。