



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	<a href="https://doi.org/10.18910/76291">https://doi.org/10.18910/76291</a>
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

# 学 位 論 文

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

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻 高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）

本城 有華

## 緒言

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 (Jensen TS., 2011)、侵害受容性疼痛とは異なる特徴的な痛みを呈する。障害された神経支配領域と一致した部位に、自発的な痛み（持続的もしくは間歇的）や刺激によって誘発される痛み（アロディニアや痛覚過敏）が生じ、神経が障害されることにより様々な感覚異常を合併する特徴がある (Haanpää and Treede, 2010)。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の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る。特に歯科臨床で日常的に行われる抜歯や抜歯などの処置は、機械的に神経や血管を切断する処置であり、さらに口腔外科処置では舌神経や下歯槽神経を誤って損傷してしまうこともあり、神経障害性疼痛を引き起こす可能性がある (千葉 et al., 2008)。治療法としては、三環系抗うつ薬やセロトニン・アドレナリン再取り込み阻害薬、オピオイド鎮痛薬などの薬物療法や神経ブロック療法などが行われるが、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り (Baron et al., 2010)、新規の分子メカニズムを解明することで効果的な治療法を確立することが必要と考えられる。

Netrin は、細胞外基質を構成するタンパク質であるラミニンに相同性を持つ分泌タンパク質で、細胞移動や細胞死、神経突起形成、シナプス形成など発生・胎生期における神経回路形成に重要な役割を担っている (Schwarting et al., 2004; Manitt et al., 2009; Takemoto et al., 2011)。受容体としては Deleted Colorectal Cancer (DCC) や Neogenin、Unc5(A~D)などが同定されている (Sun et al., 2011)。その Netrin ファミリーの 1 つである Netrin-4 は、ラミニンの  $\beta$ 鎖と相同性があり (Cirulli and Yebra, 2007)、発達期には大脳に発現し、視床大脳皮質軸索の枝分かれを促進している (Hayano et al., 2014)。成体では、Netrin-4 は肺や腎臓、血管などに発現しているが、その機能については明らかにされていなかった。しかし、坐骨神経が損傷されると Netrin-4 が脊髄後角第II層の介在ニューロンから分泌され、Netrin-4 受容体の一つとされる Unc5B に結合することで、興奮性神経

伝達を増強し、坐骨神経痛を引き起こすことが明らかとなった (Hayano et al., 2016)。さらにその痛みは抗 Netrin-4 抗体を投与することで抑制されることが報告された。

そこで本研究では、顎顔面領域の神経障害性疼痛においても、脊髄後角に相当する三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) において Netrin-4 が分泌され、神経障害性疼痛の発症に関与しているか、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。

## 実験方法

すべての動物実験は大阪大学大学院医学研究科の飼育と取り扱いのガイドラインに従って行い、大阪大学大学院医学研究科動物実験委員会によって承認された。

### 1. 神経障害性疼痛モデルラットの作製

実験には、6週齢の雄性 SD ラット（体重 190g；日本 SLC）を用いた。Vos ら（Vos et al., 1994）の方法を参考に、眼窩下神経（infraorbital nerve : ION）の慢性絞扼神経損傷（chronic constriction injury : CCI）による神経障害性疼痛ラットを作製した。

ラットにイソフルラン（099-06571、Wako）吸入による全身麻酔を行い、左側の whisker pad の端に 5mm の切開を入れ、筋組織等をよけて左側眼窩下神経を露出させた。黒ナイロン糸（6-0）を神経の下に通し、2mm の間隔をあけ、2 か所を緩やかに結紮し、黒ナイロン糸（4-0）で閉創した（以降、CCI : ipsi 側）。さらに対側の右側眼窩下神経も同様に露出させ、結紮はせずに閉創した（以降、Sham : contra 側）。これらの処置を以降、CCI-Sham 処置と表記する。

### 2. 機械刺激に対する疼痛閾値の測定（von Frey test）

疼痛閾値の解析は Toyama ら（Toyama et al., 2016）の方法を参考に行った。まずラットを 30cm 四方のアクリルボックスの上で 5-10 分間放置し、環境に馴化させた。その後、4.0、8.0、15.0, 26.0 g の von Frey filament（Semmes-Weinstein Von Frey esthesiometer、室町機械）を用いて、contra 側、ipsi 側の順に whisker pad 中央部に機械的刺激を与え、ラットが 5 回中の 3 回以上逃避行動を示す von Frey filament の最小値を逃避閾値として記録した。逃避閾値の測定は、まず CCI-Sham 処置前を行い、26.0 g 以下で反応するラットは本実験より除外した。それ以外のラットには、CCI-Sham 処置を行い、処置後 7 日、14 日、21 日目に von Frey test を行った。

### 3. 抗 Netrin-4 抗体投与による逃避閾値の変化

CCI-Sham 処置後 14 日目に von Frey test を行い、ipsi 側において 4.0g もしくは 8.0g で 3 回以上逃避行動を示し、CCI-Sham 処置前よりも逃避閾値が低下したラットに対し、イソフルラン吸入にて全身麻酔を行い、脳定位固定装置に固定した。頭部後方から頸椎上部までの皮膚を正中切開し、後頭骨と第一頸椎を露出させた。抗体投与量は Hayano ら (Hayano et al., 2016) の方法を参考に決定した。抗 Netrin-4 抗体 (AF1132、R&D Systems)、または Normal goat IgG (144-09531、Wako) 各 30 $\mu$ g を 50 $\mu$ L の生理食塩水で溶解・希釈し、29G 針付注射筒 (SS-10M2913A、TERUMO) を使用してマイクロスコープ (CLS 150 MR、Leica) 下で大槽に直接穿刺し、緩徐に投与した。大槽より投与した抗体が目的とする Vc～上部頸髄 (C1-C2) 領域に達しているかは、Evans Blue を投与して手技の確認を行い、さらに実際に神経細胞に結合しているかを確認するため、蛍光標識した抗 Netrin-4 抗体 (Lightning-Link Rapid Conjugation System DyLight488、Innova Biosciences) を大槽より投与して評価した。

抗体投与後の逃避閾値は抗体投与後 1 日、7 日目 (CCI-Sham 処置後 15 日、21 日目) に von Frey test にて測定した。

### 4. 抗 Netrin-4 抗体投与による神経活性の免疫組織化学的検討

CCI-Sham 処置後 14 日目のラットと、方法 3 と同様の方法で抗体を投与後 1 日目のラットに、von Frey test にて逃避閾値を測定した。その 30 分後に、0.01M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) にて脱血し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) を含む 0.1M リン酸ナトリウムバッファー (PB) を用いて脳の灌流固定を行った。灌流固定後、4°C の 4%PFA 溶液に 24 時間浸漬して後固定を行い、30%スクロースを含む PBS に冷所にて 48 時間浸漬した。その後、三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi) ～C2 を含むように摘出し、凍結した。クライオスタット (NX70、Thermo Scientific) にて厚さ 30 $\mu$ m の連続冠状断切片を作製し、obex より頭側に 720 $\mu$ m、1440 $\mu$ m、尾側に 720 $\mu$ m、1440 $\mu$ m、2160 $\mu$ m の 6 切片を PBS で洗浄後、5%ウシ血清アルブミン (A7906-100G、Sigma-Aldrich) で ブ

ロッキングを行い、一次抗体である抗 pERK 抗体 (Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)(Thr202/Tyr204)、1:200、#4370、CST)、抗 NeuN 抗体 (1:1000、MAB377、Millipore) を 4°C冷所にて 24 時間反応させた。切片を PBS で洗浄後、二次抗体である Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG (1:500、Invitrogen)を室温にて 2 時間反応させ、4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI、Vector Laboratory) を室温にて 15 分間反応させた。その後、PBS で洗浄し、スライドガラスに貼り付け、Fluorescence Mount Medium (S3023、Dako) を用いて封入した。

観察、撮影は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV3000、Olympus) にて行い、6 切片の Vc～C1 第II層において抗 pERK 抗体、抗 NeuN 抗体がともに陽性である細胞数を計数した。

## 5. Netrin-4 と Unc5B の発現に対する免疫組織化学的検討

CCI-Sham 処置後 14 日目のラットに von Frey test にて逃避閾値を測定した後、脳の 4%PFA 灌流固定、30%スクロース置換を行い、クライオスタットで厚さ 30μm の連続冠状断切片を作製した。obex より頭側に 720μm、1440μm、尾側に 720μm、1440μm、2160μm の 6 切片をクエン酸バッファー (pH6.0) で抗原賦活化し、5%ウシ血清アルブミンで ブロッキングを行った後、一次抗体である抗 Netrin-4 抗体 (HPA049832、1:50、ATLAS)、抗 Unc5B 抗体 (HPA01141、1:200、ATLAS)、抗 NeuN 抗体を 4°C冷所にて 48 時間反応させた。切片を PBS で洗浄後、二次抗体である Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG と Alexa Fluor 594 donkey anti-mouse IgG を室温にて 2 時間反応させ、DAPI を室温にて 15 分間反応させた。その後、PBS で洗浄し、スライドガラスに貼り付け、Fluorescence Mount Medium を用いて封入した。

観察、撮影は共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV3000、Olympus) にて行い、主に Vc～C1 の三叉神経第II枝領域である中央部での発現を観察した (俣野 et.al., 1972; 大田, 2014)。

## 6. Netrin-4 と Unc5B の発現に対する定量解析

CCI-Sham 処置前、処置後 7 日、14 日、21 日目のラットに von Frey test を行った後、0.01MPBS で脱血させ、Vi～C2 を含むように摘出し、凍結させた。クライオスタットにて厚さ 12 $\mu$ m の新鮮凍結切片を作製し、LMD 専用フォイル付フレーム (11600294、Leica) に貼り付け、レーザーマイクロダイセクション法 (LMD7000、Leica) により Vc～C1 を部分的に採取した。採取した組織から TRIzol Reagent (15596018、Invitrogen) を使用して RNA を抽出し、High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (4368814、Applied biosystems) を使用して cDNA を合成し、TaqMan Fast Advanced Master Mix (4444557、Applied biosystems) を使用して定量的 PCR 法を行った。

Taqman Assay は Netrin-4(Rn01760394\_m1)、Unc5B(Rn00573551\_m1) を使用し、 $\Delta\Delta Ct$  法にて解析した。内在性コントロールとしてはラットの GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Rn99999916\_s1) を使用した。

## 7. 統計学的解析

結果は平均値±標準誤差として表した。統計解析には統計解析ソフト Prism7 (GraphPad 社) を使用して行った。

機械刺激に対する逃避閾値 (von Frey test) の変化に対する統計学的解析は、反復測定二元配置分散分析 (Bonfferroni post-hoc test) を、抗体投与による逃避閾値の変化は反復測定三元配置分散分析 (Tukey post-hoc test) を用いた。また抗 pERK 抗体陽性細胞数に対する統計学的解析は、二元配置分散分析 (Tukey-Kramer post-hoc test) を、各測定日における mRNA の発現量の統計学的解析は Mann-Whitney test を用いた。全ての統計学的解析において、危険率  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

## 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) (Fig.1)

顎顔面領域に神経障害性疼痛を発症させたラットを作製するため眼窩下神経の結紮を行って、von Frey test による疼痛閾値の変化を測定した。本研究において CCI-Sham 処置 (n=23) による痛覚過敏発症率は 30.4% であった (痛覚過敏発症群 : n=7)。

眼窩下神経の CCI 処置を施した ipsi 側は Sham 処置を施した contra 側と比較して処置後 14 日、21 日目において逃避閾値が有意に低下した。

以降のすべての実験にはこのモデルを使用し、今回の研究で検討した総ラット数は 86 匹であった。(モデル作製 n=23、抗体投与実験 n=27、免疫組織化学的評価 n=20、定量 PCR 法 n=16)

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

抗 Netrin-4 抗体が眼窩下神経損傷による神経障害性疼痛にも鎮痛効果を示すのか検討するため、抗 Netrin-4 抗体を大槽に直接投与した。抗体投与後 1 日目の体重変化は、Control 抗体では -4～+2g、抗 Netrin-4 抗体では -14～+2g であった。また抗 Netrin-4 抗体投与による死亡例は認めなかつた。蛍光標識した抗 Netrin-4 抗体は Vc 領域の神経細胞に結合していた (Fig.2 A,B)。

大槽への直接穿刺により目的領域に抗体投与が可能であったことを確認できたため、次に抗体投与による機械的刺激に対する逃避閾値の変化を von Frey test にて観察した。CCI-Sham 処置後 14 日目に抗 Netrin-4 抗体 (n=5)、あるいは Control 抗体 (n=5) をそれぞれ投与したところ、抗 Netrin-4 抗体投与群は、投与後 1 日目 (CCI-Sham 処置後 15 日目) に ipsi 側において Control 抗体投与群よりも有意に逃避閾値が上昇した (Fig.2 C)。

### 3. 抗 Netrin-4 抗体による Vc の神経細胞の活性抑制 (Fig.3、Fig.4)

抗 Netrin-4 抗体により Vc における神経細胞の活性化に変化があるか、免疫組織化学的に検討

した。CCI-Sham 処置により逃避閾値が有意に低下した処置後 14 日目において、抗 pERK 抗体陽性細胞は ipsi 側、contra 側ともに発現を認めた (Fig.3 A,B)。抗 pERK 抗体と抗 NeuN 抗体に対し、共陽性であった細胞数は ipsi 側で有意に増加した。一方、抗 Netrin-4 抗体を投与した場合、投与しない場合と比較し、抗 pERK 抗体と抗 NeuN 抗体に対し共陽性を示した細胞数は ipsi 側で有意に減少し、さらに Control 抗体投与群と比較しても ipsi 側で有意に減少していた (Fig.4)。

#### 4. Netrin-4 および Unc5B の Vc における発現 (Fig.5、Fig.6)

Vc における、Netrin-4 と Unc5B の発現を免疫組織化学的に検討したところ、抗 Netrin-4 抗体陽性細胞と抗 Unc5B 抗体陽性細胞は Vc において発現を認め (Fig.5 A,C)、Netrin-4 と Unc5B はともに Vc では神経細胞に発現していた (Fig.5 B,D)。

さらに Netrin-4 および Unc5B の Vc における発現量が CCI-Sham 処置によって変化するのか検討するため、RT-PCR 法で mRNA の定量解析を行った。Netrin-4 は CCI-Sham 処置後 14 日目において、処置前と比較して有意に増加したが、Unc5B はどの日数においても有意な変化を認めなかつた (Fig.6 A,B)。

## 考察

### 1. 眼窩下神経結紮モデルについて

本研究では、顎顔面領域の神経障害性疼痛に対する抗 Netrin-4 抗体の鎮痛効果について検討するため眼窩下神経結紮モデルを用いた。このモデルはこれまでにも多くの研究に用いられており (Vos et al., 1994; Nakajima et al., 2011; Suzuki et al., 2013)、末梢神経結紮による慢性障害を与えると、化学刺激や機械刺激、温熱刺激に対してアロディニアや痛覚過敏といった痛覚異常を示すようになる (Calvelou et al., 1989; Vos et al., 1994; Imamura et al., 1997)。

本研究では、同一個体内に眼窩下神経の結紮処置 (CCI 処置) と非結紮処置 (Sham 処置) を施し、Von Frey test による逃避行動を解析した。多くの研究では、眼窩下神経の結紮 (CCI-ION) 群と疑似損傷 (Sham) 群を別の個体に設けて比較している。しかし、その処置による逃避閾値は Sham 群の損傷側や CCI-ION 群の健常側でも一時わずかな逃避閾値の低下を認めるものの結紮後 14 日目までには回復する (Nakajima et al., 2011)。本研究でも CCI-Sham 処置後 14 日目には Sham 処置側では回復し、CCI 処置側は有意に逃避閾値が低下した。したがって、実験に供する個体数を少なくするため、同一個体に CCI-Sham 処置する方法を採用した。

眼窩下神経結紮による逃避閾値の低下は結紮後 1 日目より観察され、少なくとも 21 日目まで持続するという報告がある (Suzuki et al., 2013)。本研究でも、逃避閾値の低下は結紮後 21 日目まで認められた。本研究での CCI-Sham 処置後 14 日目における痛覚過敏発症率は 30.4% であり、CCI 群と Sham 群とを別の個体に設けた研究における痛覚過敏発症率 (31%) とほぼ一致した (讃岐 et al., 2007)。

以上のことから、本研究においては CCI-Sham 処置後 14 日目に CCI 処置側で痛覚過敏を発症し、処置後 21 日目まで持続したと考えられ、この処置により 14 日目で逃避閾値が低下したラットを以降の研究には使用した。

## 2. 眼窩下神経結紮による痛覚過敏のメカニズムと Netrin-4 の役割

眼窩下神経結紮などにより末梢神経が損傷されると、ブラジキニン (BK) やプロスタグランジン E2 (PGE2) などの炎症性物質が、一次求心性神経末梢側に存在する個々の受容体を介して TRPV1 の閾値の低下や  $\text{Na}^+$  チャネルの興奮性増大などを引き起こし、その結果、末梢性感作が成立する (Scholz and Woolf, 2002)。さらに、一次求心性神経中枢側から放出されるグルタミン酸や SP、BDNF などが二次求心性神経に存在する神経細胞の個々の受容体に結合すると、MEK ((MAPK (mitogen-activated protein kinase) / ERK kinase) がリン酸化され、次いで ERK (extracellular signal-regulated kinase) がリン酸化により活性化することで、神経細胞核内の CREB (cAMP responsive element binding protein) の活性化を引き起こし、c-Fos や NK-1 などの様々な遺伝子が発現する (Ji and Woolf, 2001; Ji et al., 2003; Ji et al., 2009)。さらに ERK の活性化により、AMPA や NMDA 受容体などの翻訳後調節 (Post-translational regulation) が行われて中枢性感作の発症や維持に関与することが明らかとなっている (Woolf and Salter, 2000; Slack et al., 2004; Kohno et al., 2008)。これら感作の結果、神経の興奮性が増強され、アロディニアや痛覚過敏が生じると考えられている。脊髄神経の損傷後では、リン酸化した ERK (pERK) がまず表層の脊髄後角の神経細胞に一時的に発現し、その後、長期に渡りミクログリアやアストロサイトに発現し、痛覚過敏が惹起される (Zhuang et al., 2005; Gao and Ji, 2009)。MEK の選択的阻害剤により pERK を直接抑制することにより、ホルマリンによる疼痛行動が減少することから、pERK は神経障害性疼痛の発症、維持に深く関与していると考えられている (Ji et al., 1999; Gao and Ji, 2009)。本研究では CCI-Sham 処置後 14 日目に CCI 側が Sham 側よりも pERK 陽性神経細胞が増加していたが、これは処置後 14 日目において眼窩下神経結紮による末梢性感作および中枢性感作が生じ、Vc の神経細胞が pERK を発現して痛覚過敏状態にあることを示唆している。しかし、本研究で観察された pERK 陽性神経細胞数は、これまでの報告 (Sibuta et al., 2012; Suzuki et al., 2013) と比較し、大幅に少なかった。これは本研究でモデルに与えた機械的刺激の強さや刺激方法が先行研究と異なることが一因とも考えられるが、坐骨神経や脊髄を損傷させた動物モデルに軽微な刺激を与えた場

合にも pERK の発現が増加した報告 (Wang et al., 2004; Gao and Ji., 2010) があること、また pERK は侵害刺激後数分で発現がピークに達し、10 分後には半数まで減少するとの報告 (Gao and Ji., 2009) があることから、本研究と先行研究との pERK 陽性神経細胞数の違いは、機械的刺激後の組織採取までの時間の違いによるもので、機械的刺激直後よりも発現が減少したと考えられる。そのため本研究においても機械的刺激後に、より早い段階で組織を採取した場合は、本研究の逃避反応に相応の数の pERK 陽性神経細胞が確認できたのではないかと推測される。また、機械的刺激後 30 分において、pERK 陽性神経細胞の総発現数が少ない中でも CCI 側が Sham 側よりも有意に増加していたことは、機械的刺激により活性化した神経細胞の発現が持続することで、神経障害性疼痛が長期にわたって発症する要因になるとも推測される。

一方、脊髄において末梢神経が損傷されると、脊髄後角第II層の介在ニューロンより Netrin-4 が分泌され、それが神経細胞に発現している Unc5B に結合することで、Unc5B に結合している SHP2 (SH2-domain containing protein tyrosine phosphatase 2) や NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR2B の活性化が起こる (Hayano et al., 2016)。その結果、神経細胞も活性化され、神経障害性疼痛や炎症性疼痛が生じる。本研究において、大槽より抗 Netrin-4 抗体を投与することで眼窩下神経結紮による逃避閾値は上昇し、さらには Vc における pERK 陽性神経細胞の発現も減少した。このことから Vc においても Netrin-4 が神経細胞を活性化し、痛覚過敏を引き起こしたと考えられる。

### 3. Netrin-4 と Unc5B の発現について

Netrin-4 はラットでは成体の健常脳の広範囲に存在し、大脳皮質だけでなく三叉神経脊髄路 (Sp5) や三叉神経脊髄路核中間亜核 (Vi) にも発現している (Zhang et al., 2004)。このことから Vc にも Netrin-4 は発現していると予想された。Unc5B は、Netrin の受容体の 1 つで、先行研究から Netrin-1 や Netrin-4 が結合することが報告されている (Cirulli and Yebra, 2007; Lejmi et al., 2008; Hayano et al., 2014)。

本研究では免疫組織化学的な検討により、痛覚過敏を発症した処置後 14 日目に、Vc～C1 において Netrin-4 と Unc5B の発現を認めた。さらに Vc～C1 における選択的な mRNA の発現量を定量解析したところ、CCI-Sham 処置後 14 日目に Netrin-4 の mRNA は処置前と比較して発現増加していた。このことから神経損傷により Netrin-4 の分泌が増加したことで、Vc の神経細胞の活性化が増大し、疼痛過敏を引き起こしたと考えられる。

一方、Unc5B に関しては、神経損傷後、脊髄では mRNA の発現増加が認められたのに対し、Vc では mRNA の発現に変化を認めなかつた。このことは脳と脊髄という部位の差異が関与している可能性もあるが、Unc5B の mRNA の発現に関しては、脊髄損傷後、発現が一度減少した後に回復するという報告 (Ahn et al., 2007) もあり、Vc における mRNA の発現の変化を捉え切っていられない可能性もある。また、神経損傷後 14 日目というタイミングにおいては、Unc5B のタンパク質の発現自体が変化している可能性もあり、更なる検討が必要である。また Netrin-4 が、Unc5B 以外の受容体であるラミニン  $\gamma 1$  と結合するという報告 (Schneiders et al., 2007; Reuten et al., 2016) もあり、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。

また脊髄では Unc5B の mRNA の発現が損傷側 (ipsi 側) と擬似損傷側 (contra 側) とで変化を認めたのに対し、Vc では mRNA の発現量は Netrin-4、Unc5B とともに CCI 側と Sham 側との間に有意な変化を認めなかつた。これは脊髄において認められた Unc5B に結合している SHP2 の活性や NMDA 受容体のサブユニットの一つである NR2B の活性 (Hayano et al, 2016) などが、Vc の CCI 側において変化し、機械的刺激に対する逃避閾値や pERK 陽性神経細胞数の Sham 側との違いに影響している可能性も考えられるため、より詳細なメカニズムを解明するためにも今後検討しなければならない。

#### 4. 抗 Netrin-4 抗体の鎮痛効果について

本研究では、抗 Netrin-4 抗体を大槽内投与すると、機械的刺激に対する逃避閾値が上昇し、さらに Vc の神経細胞の活性化が抑制された。これは抗 Netrin-4 抗体により Netrin-4 の Unc5B へ

の結合が阻害され、Vc の神経細胞の活性化が抑制されることで、鎮痛効果を示したと考えられた。そのメカニズムとしては神経細胞に発現している Unc5B に結合している SHP2 の活性化が抑制されることで、何らかのタンパク質を介して Ras-MAPK 経路が抑制されて 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 (Fig.7) (Tong et al., 2001; Krapivinskey et al., 2003; Kim et al., 2005; Easton et al., 2006; Round and Stein, 2007; Peng et al., 2012; Hayano et al., 2016; Abbasi et al., 2018)。

Netrin-4 はヒトの成体では心臓や腎臓、脾臓に多く含まれ、脳や脊髄でもわずかではあるが発現を認めている (Koch et al., 2000; Yin et al., 2000)。またラットでは脳でも広い範囲に発現しており (Zhang et al., 2004)、Netrin-4 をノックアウトしても発達段階で回路形成に異常は認めず、繁殖および臓器・器官形成に顕著な異常は報告されていない (Hayano et al., 2016)。さらに本研究においても抗 Netrin-4 抗体の大槽内投与でラットの死亡例は認めなかった。したがって抗 Netrin-4 抗体は比較的安全に動物に対して使用可能であり、将来的にはヒトに対する臨床応用の可能性も示唆している。

## 結語

本研究の結果より、眼窩下神経の慢性絞扼神経損傷によって三叉神経の持続的な興奮が起り、VcにおいてNetrin-4の発現が増加し、Unc5Bに結合することで疼痛過敏が発症したと推測された。また抗Netrin-4抗体は神経損傷による疼痛反応および神経細胞の活性化を抑制したことから、神経障害性疼痛による疼痛過敏に有効であり、今後ヒトへの応用についても期待される。

## 謝辞

稿を終えるに臨み、本研究を行う機会を与えていただき、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました大阪大学大学院医学研究科分子神経科学の山下俊英教授、ならびに大阪大学歯学研究科口腔科学専攻高次脳口腔機能学講座（歯科麻酔学教室）の丹羽均教授に謹んで感謝の意を表します。

本研究の進行に際し常に御助言、御指導を戴いた大阪大学大学院医学研究科分子神経科学の藤田幸准教授、ならびに MAX PLANCK FLORIDA INSTITUTE FOR NEURO SCIENCE の早野泰史先生に深甚なる謝意を表します。

最後に本研究の円滑な進展のため御理解、御協力頂きました分子神経科学教室員および歯科麻酔学教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

Abbasi Mojdeh, Gupta Vivek, Chitranshi Nitin, You Yuyi, Dheer Yogita, Mirzaei Mehdi, Graham L. Stuart. Regulation of brain-derived neurotrophic factor and growth factor signaling pathways by tyrosine phosphatase Shp2 in the retina: A brief review. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2018; 12: article85

Ahn Kyoung Jin, In Ae Seo, Lee Hyun Kyoung, Choi Eun Jung, Seo Eun Hee, Lee Hye Jeong, Park Hwan Tae. Down-regulation of UNC5 homologue expression after the spinal cord injury in the adult rat. *Neuroscience Letters*. 2007; 419: 43-48

Baron Ralf, Binder Andreas, Wasner Gunnar. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurology*. 2010; 9: 807-819

千葉 雅俊, 桶口 景介, 近藤 武光, 越後 成志. 歯科治療を契機に発症した三叉神経領域の神経因性疼痛の臨床像. *日本口腔科学会雑誌*. 2008; 57(4): 379-384

Cirulli Vincenzo and Yebra Mayra. Netrins: beyond the brain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2007; 8: 296-306

Clavelou Pierre, Pajot Jacques, Dallel Radhouane, Raboisson Patrick. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. *Neuroscience Letters*. 1989; 103: 349-353

Easton B. John, Royer R. Amanda, Middlemas S. David. The protein tyrosine phosphatase, Shp2, is required for the complete activation of the RAS/MAPK pathway by brain-derived neurotrophic factor. *Journal of Neurochemistry*. 2006; 97: 834-845

Gao Yong-Jing and Ji Ru-Rong. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain Journal*. 2009; 2: 11-17

Gao Yong-Jing and Ji Ru-Rong. Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *Journal of Neurochemistry*. 2010; 115(2): 505-514

Haanpää Maija and Treede Rolf-Detlef. Diagnosis and Classification of Neuropathic Pain. *IASP Clinical Updates*. 2010; 18: Issue7

Hayano Yasufumi, Sasaki Kensuke, Ohmura Nami, Takemoto Makoto, Maeda Yurie, Yamashita Toshihide, Hata Yoshio, Kitada Kazuhiro, Yamamoto Nobuhiko. Netrin-4 regulates thalamocortical axon branching in an activity-dependent fashion. PNAS. 2014; 111(42): 15226-15231

Hayano Yasufumi, Takasu Keiko, Koyama Yoshihisa, Yamada Moe, Ogawa Koichi, Minami Kazuhisa, Asaki Toshiaki, Kitada Kazuhiro, Kuwabara Satoshi, Yamashita Toshihide. Dorsal horn interneuron-derived Netrin-4 contributes to spinal sensitization in chronic pain via Unc5B. Journal of Experimental Medicine. 2016;213(13): 2949-2966

Imamura Yoshiki, Kawamoto Hiroya, Nakanishi Osamu. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. Experimental Brain Research. 1997; 116: 97-103

Jensen S. Troels. A new definition of neuropathic pain. PAIN. 2011; 152: 2204-2205

Ji Ru-Rong, Baba Hiroshi, Brenner J. Gary, Woolf J. Clifford. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. Nature Neuroscience. 1999; 2(12): 1114-1119

Ji Ru-Rong and Woolf J. Clifford. Neuronal Plasticity and Signal Transduction in Nociceptive Neurons: Implications for the Initiation and Maintenance of Pathological Pain. Neurobiology of Disease. 2001; 8: 1-10

Ji Ru-Rong, Kohno Tasturo, Moore A. Kimberly, Woolf J. Clifford. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? TRENDS in Neurosciences. 2003; 26(12): 696-705

Ji Ru-Rong, Gereau IV W. Robert, Malcanjio Marzia, Strichartz R. Gray. MAP kinase and Pain. Brain Research Reviews. 2009; 60(1): 135-148

Kim Myung Jong, Dunah W. Anthone, Wang Yu Tian, Sheng Morgan. Differential roles of NR2A- and NR2B-containing NMDA receptors in Ras-ERK signaling and AMPA receptor trafficking. Neuron. 2005; 46: 745-760

Koch Manuel, Murrell R. Julie, Hunter D. Dale, Olson F Pamela., Jin William, Keene R. Douglas, Brunken J William., Burgeson E. Robert. A Novel Member of the Netrin Family,  $\beta$ -Netein, Shares Homology with the  $\beta$  Chain of Laminin: Identification, Expression, and Functional Characterization. J. Cell Biology. 2000;151(2):221-234

Kohno Tatsuro, Wang Haibin, Amaya Fumimasa, Brenner J. Gary, Cheng Jen-Kun, Ji Ru-Rong, Woolf J. Clifford. Bradykinin enhances AMPA and NMDA receptor activity in spinal cord dorsal horn neurons by activating multiple kinases to produce pain hypersensitivity. *The Journal of Neuroscience*. 2008; 28(17): 4533-4540

Krapivinsky Grigory, Krapivinsky Luba, Manasian Yunona, Ivanov Anton, Tyzio Roman, Pellegrino Christophe, Ben-Ari Yehezkel, Clapham E. David, Medina Igor. The NMDA Receptor Is Coupled to the ERK Pathway by a Direct Interaction between NR2B and RasGRF1. *Neuron*. 2003; 40: 775-784

Lejmi Esma, Leconte Laurence, Pétron-Mazoyer Sandrine, Ropert Stanislas, Raul William, Lavalette Sophie, Bouras Ilyes, Feron Jean-Guillaume, Maitre-Boube Martine, Assayag Franck, Feumi Charles, Alemany Monica, Jie Tan Xian, Merkulova Tatyana, Poupon Marie-France, Ruchoux Marie-Magdeleine, Tobelem Gérard, Sennlaub Florian, Plouët Jean. Netrin-4 inhibits angiogenesis via binding to neogenin and recruitment of Unc5B. *PNAS*. 2008; 105(34): 12491-12496

Manitt Colleen, Nikolakopoulou M. Angeliki, Almario R. David, Nguyen A. Sarah, Cohen-Cory Susana. Netrin Participates in the Development of Retinotectal Synaptic Connectivity by Modulating Axon Arborization and Synapse Formation in the Developing Brain. *The Journal of Neuroscience*.; 2009: 29(36): 11065-11077

俣野 彰三, 日浦 透, 重永 永凱, 堀 章. 口腔領域中枢支配に関する実験的組織化学的研究(第2報) ラット三叉神経終止核への入力線維について. *大阪大学歯学雑誌*; 1972; 17: 102-108

Nakajima A., Tsuboi Y., Suzuki I., Honda K., Shinoda M., Kondo M., Matsuura S., Shibuta K., Yasuda M., Shimizu N., Iwata K. PKC $\gamma$ in Vc and C1/C2 is Involved in Trigeminal Neuropathic Pain. *Journal of Dental Research*.; 2011; 90(6): 777-781

太田 彰人. 上顎神経および下歯槽神経の一次求心有髓神経線維の中枢投射. *国際歯科学会日本部会雑誌*. 2014; 45(1): 70-77

Peng Hsien-Yu, Chen Gin-Den, Lai Cheng-Yuang, Hsieh Ming-Chun, Lin Tzer-Bin. Spinal SIRP $\alpha$ 1-SHP2 interaction regulates spinal nerve ligation-induced neuropathic pain via PSD-95-dependent NR2B activation in rats. *Pain*. 2012; 153: 1042-1053

Reuten Raphael, Patel R. Trushar, McDougall Matthew, Rama Nicolas, Nikodemus Denise, Gibert

Benjamin, Delcros Jean-Guy, Prein Carina, Meier Markus, Metzger Stéphanie, Zhou Zhigang, Kaltenberg Jennifer, McKee K. Karen, Bald Tobias, Tüting Thomas, Zigrino Paola, Djonov Valentin, Bloch Wilhelm, Hauke Clausen-Schaumann, Ernst Poschl, Peter D. Yurchenco, Martin Ehrbar, Patrick Mehlen, J Stetefeld örg, Koch Manuel. Structural decoding of netrin-4 reveals a regulatory function towards mature basement membranes. *Nature Communications*. 2016; 7:1-17

Round Jennifer and Stein Elke. Netrin signaling leading to directed growth cone steering. *Current Opinion in Neurology*. 2007; 17: 15-21

讃岐 拓郎, 佐久間 泰司, 姜 由紀, 安東 大器, 小谷 順一郎. ラット眼窩下神経 CCI モデルに対するホルマリン刺激. *日本歯科麻酔学会雑誌*. 2007; 35(2): 158-162

Schneiders I. Fiona, Maertens Barbara, Böse Kerstin, Li Yong, Brunken J. William, Pailsson Mats, Smyth Neil, Koch Manuel. Binding of Netrin-4 to Laminin Short Arms Regulates Basement Membrane Assembly. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282(33): 23750-23758

Scholz Joachim and Woolf J. Clifford. Can we conquer pain? *Nature Neuroscience Supplement*. 2002; 5:1062-1067

Schwarting A.Gerald, Raitcheva Denitza, Bless P. Elizabeth, Ackerman L. Susan, Tobet Stuart. Netrin 1-mediated chemoattraction regulates the migratory pathway of LHRH neurons. *European Journal of Neuroscience*. 2004; 19: 11-20

Shibuta Kazuo, Suzuki Ikuko, Shinoda Masamichi, Tsuboi Yoshiyuki, Honda Kuniya, Shimizu Noriyoshi, Sessle J. Barry, Iwata Koichi. Organization of hyperactive microglial cells in trigeminal spinal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord associated with orofacial neuropathic pain. *Brain Research*. 2012; 1451: 74-86

Slack E. Sarah, Pezet Sophie, McMahon B. Stephen, Thompson W. N. Stephen, Malcangio Marzia. Brain-derived neurotrophic factor induces NMDA receptor subunit one phosphorylation via ERK and PKC in the rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 2004; 20: 1769-1778

Sun Karen Lai Wing, Correia P. James, Kennedy E. Timothy. Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions. *Development*. 2011; 138: 2153-2169

Suzuki Ikuko, Tsuboi Yoshiyuki, Shinoda Masamichi, Shibuta Kazuo, Honda Kuniya, Katagiri Ayako,

Kiyomoto Masaaki, Sessle J. Barry, Matsuura Shingo, Ohara Kinuyo, Urata Kentaro, Iwata Koichi. Involvement of ERK Phosphorylation of Trigeminal Spinal Subnucleus Caudalis Neurons in Thermal Hypersensitivity in Rats with Infraorbital Nerve Injury. *PLoS ONE*. 2013; 8(2): e57278

Takemoto Makoto, Hattori Yuki, Zhao Hong, Sato Haruka, Tamada Atsushi, Sasaki Shinji, Nakajima Kazunori, Yamamoto Nobuhiko. Laminar and Areal Expression of Unc5d and Its Role in Cortical Cell Survival. *Cerebral Cortex*. 2011; 21: 1925-1934

Tong Jiefei, Killeen Marie, Steven Robert, Binns L. Kathleen, Culotti Joseph, Pawson Tony. Netrin stimulates tyrosine phosphorylation of the Unc5-5 family of Netrin receptors and induces Shp2 binding to the RCM cytodomain. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276(44): 40917-40925

Toyama Midori, Kudo Chiho, Mukai Chikako, Inoue Mika, Oyamaguchi Aiko, Hanamoto Hiroshi, Sugimura Mitsutaka, Niwa Hitoshi. Trigeminal nervous system sensitization by infraorbital nerve injury enhances responses in a migraine model. *Cephalgia*. 2016; 37(14): 1317-1328

Yin Yong, Sanes R. Joshua, Miner H. Jeffrey. Identification and expression of mouse netrin-4. *Mechanisms of Development*. 2000; 96:115-119

Vos P. Bart, Strassman M. Andrew, Maciewicz J. Raymond. Behavioral Evidence of Trigeminal Neuropathic Pain Following Chronic Constriction Injury to the Rat's Infraorbital Nerve. *The Journal of Neuroscience*. 1994;14(5): 2708-2723

Wang Hu, Dai Yi, Yamanaka Hiroki, Obata Koichi, Tokunaga Atsushi, Noguchi Koichi. Enhancement of stimulation-induced ERK activation in the spinal dorsal horn and gracile nucleus neurons in rats with peripheral nerve injury. *European Journal of Neuroscience*. 2004; 19: 884-890

Woolf J Clifford and Salter W. Michael. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. *Science*. 2000; 288: 1765-1768

Zhang Chenggang, Meng Fanwei, Wang Chuli, Guo Huiyun, Fan Ming, Lui Shaojun, Zhou Renping, He Fuchu. Identification of a novel alternative splicing from of human netrin-4 and analyzing the expression patterns in adult rat brain. *Molecular Brain Research*. 2004; 130: 68-80

Zhaung Zhi-Ye, Gerner Peter, Woolf J. Clifford, Ji Ru-Rong. ERK is sequentially activated in neurons, microglia, and astrocytes by spinal cord ligation and contributes to mechanical allodynia in this neuropathic

pain model. *Pain*. 2005; 114:149-159

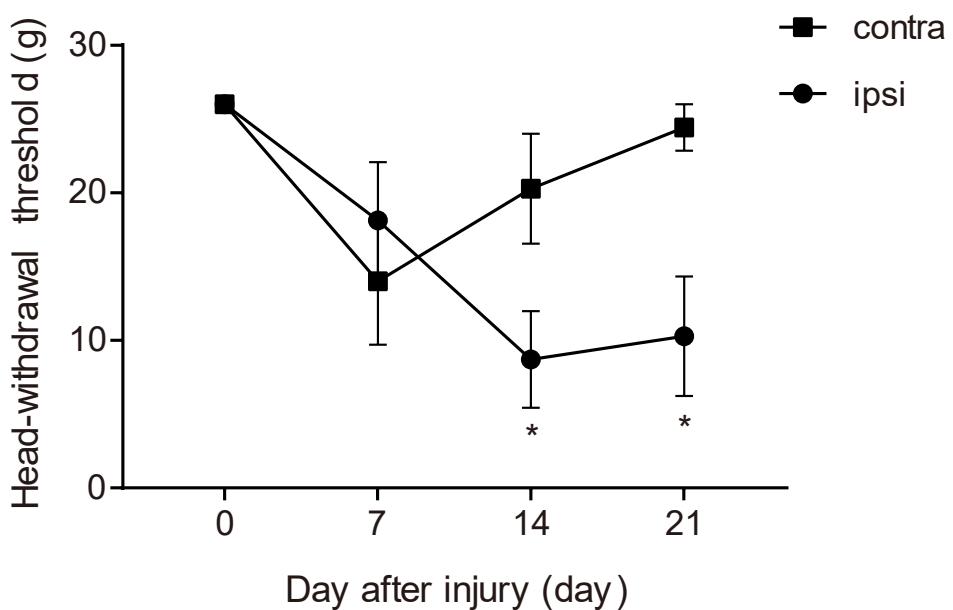


Fig. 1 眼窩下神経結紮による痛覚過敏の発症と時間的変化 (平均値±SEM)

CCI-ION を施した ipsi 側は Sham 処置を施した contra 側と比較して、結紮後 14 日、21 日目において逃避閾値が有意に低下した。(\*p<0.05 vs contra ; 2-way repeated-measure ANOVA post-hoc Bonferroni test, n=7)

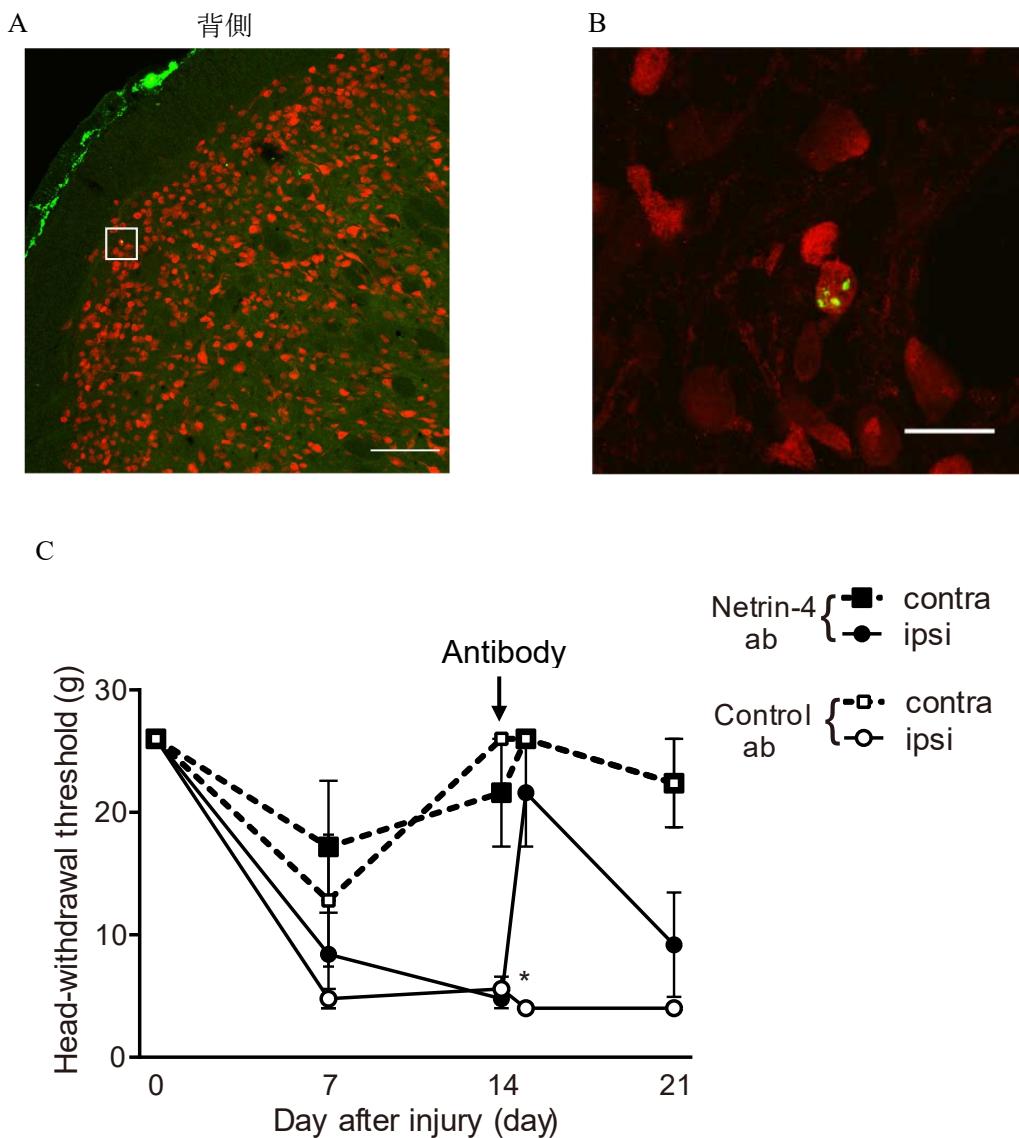


Fig.2 抗 Netrin-4 抗体投与による疼痛行動への影響

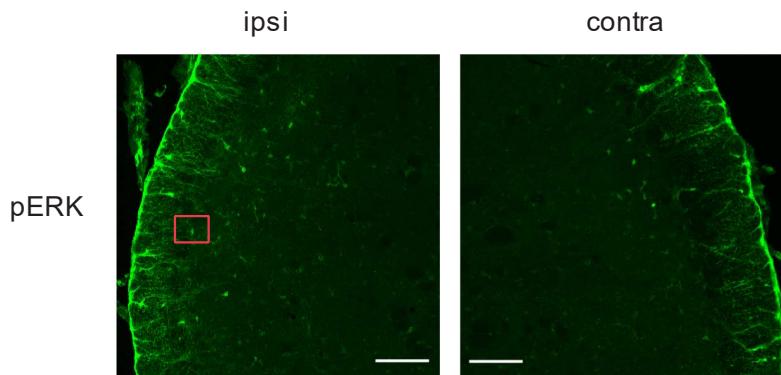
**A and B:**標識抗 Netrin-4 抗体と抗 NeuN 抗体陽性細胞の共染色像 (B ; A の white box 部拡大)

標識抗 Netrin-4 抗体投与後の NeuN との共染色で、神経細胞に投与抗体が結合していることが確認できた。 (green : 標識抗 Netrin-4 抗体、 red : NeuN、 Bars ; A : 0.1 mm 、 B : 20μm、)

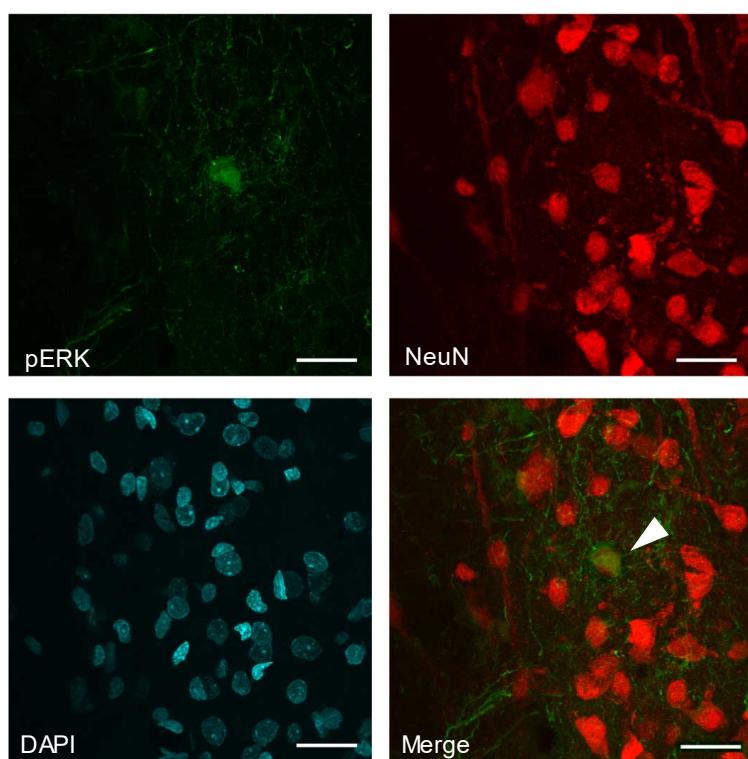
**C:**抗 Netrin-4 抗体および Control 抗体投与による疼痛閾値の変化

CCI-Sham 処置後 14 日目に抗体を投与したところ、抗体投与 24 時間後の ipsi 側において、抗 Netrin-4 抗体投与群は Control 抗体投与群よりも疼痛閾値が有意に上昇した。 (\*p<0.05;3-way ANOVA post-hoc Tukey test、 Netrin-4 抗体 n=5、 Control 抗体 n=5、 平均値±SEM)

A



B



**Fig.3 CCI-Sham 処置による pERK の発現**

**A** : CCI-Sham 処置後 14 日目の pERK の発現

ipshi 側および contra 側とともに抗 pERK 抗体陽性細胞を認めた。 (Bar ; 0.1mm)

**B** : 抗 pERK 抗体と抗 NeuN 抗体の共染色像 (A の red box 部拡大)

CCI-Sham 処置後 14 日目の ipsi 側における pERK 陽性神経細胞を示す。 (green : pERK, red : NeuN, blue : DAPI, 矢頭 : pERK と NeuN が共局在した細胞、Bar ; 20μm)

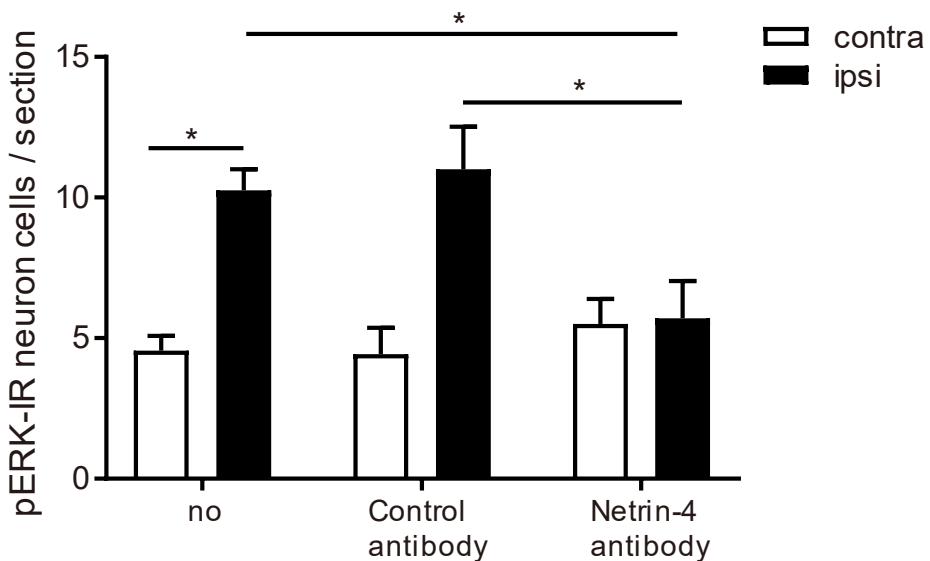
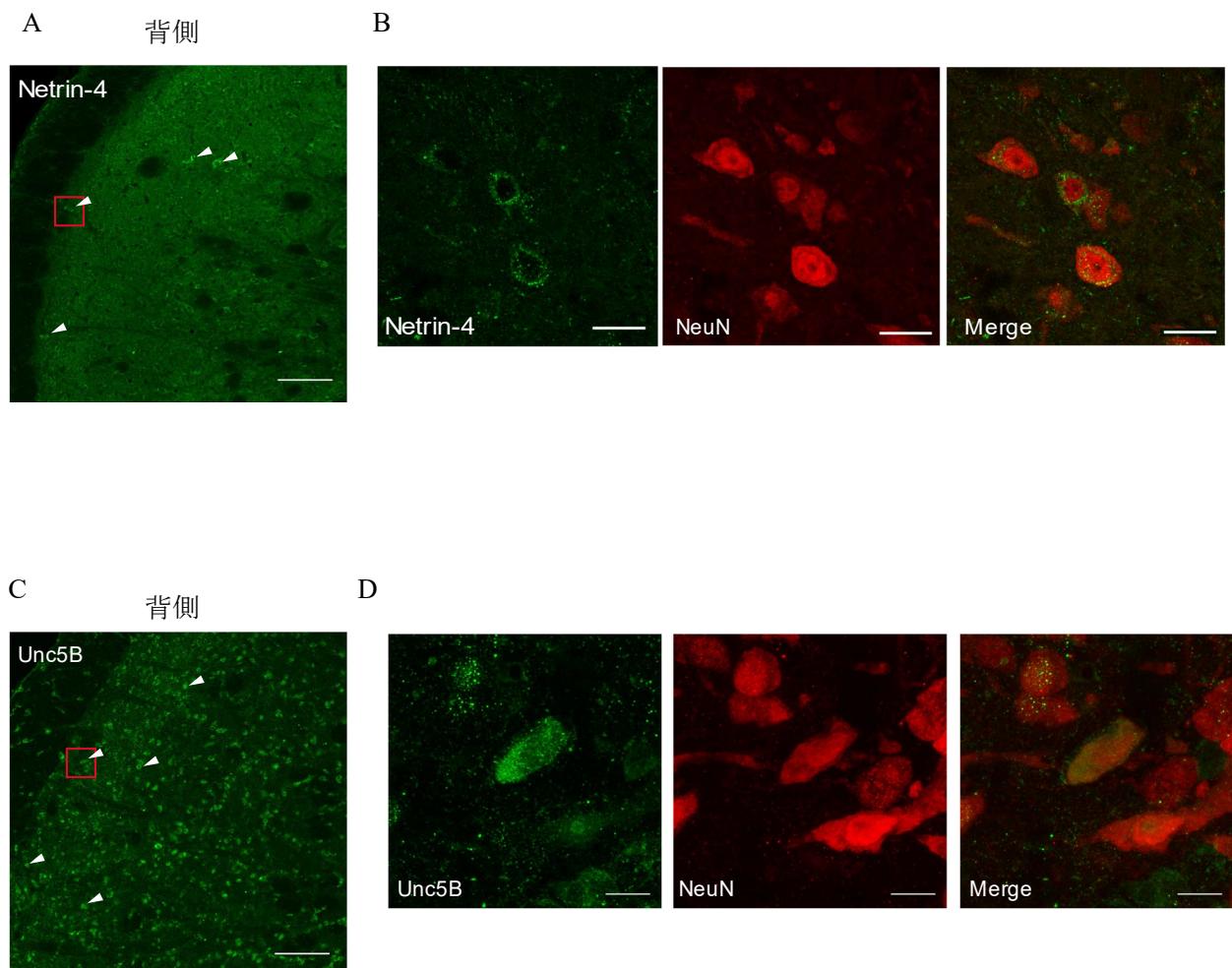


Fig.4 抗 Netrin-4 抗体による神経細胞の活性抑制 (pERK 陽性神経細胞数の変化)

CCI-Sham 処置後 14 日目において、ipsi 側では contra 側よりも pERK 陽性神経細胞数が有意に増加した。また抗 Netrin-4 抗体を投与すると pERK 陽性神経細胞数は抗体投与を行わない場合と比較して有意に減少した。抗 Netrin-4 抗体を投与した ipsi 側は Control 抗体を投与した群と比較しても、pERK 陽性神経細胞数は有意に減少した。（\*  $p < 0.05$  ; Tukey-Kramer test、 $n = 4 \sim 6$ 、平均値  $\pm$  SEM）



**Fig.5** Netrin-4 および Unc5B の Vc～C1 における発現

**A and B** : Netrin-4 の Vc における発現 (B; A の red box 拡大)

CCI 処置 14 日目の Vc において Netrin-4 の発現を認めた。 (green : Netrin-4、 red : NeuN、 矢頭 : Netrin-4、 Bars ; A : 0.1 mm、 B : 10μm)

**C and D** : Unc5B の Vc における発現 (D ; C の red box 拡大)

CCI 処置 14 日目の Vc において Unc5B の発現を認めた。 (green : Unc5B、 red : NeuN、 矢頭 : Unc5B、 Bars ; A : 0.1 mm、 B : 10μm)

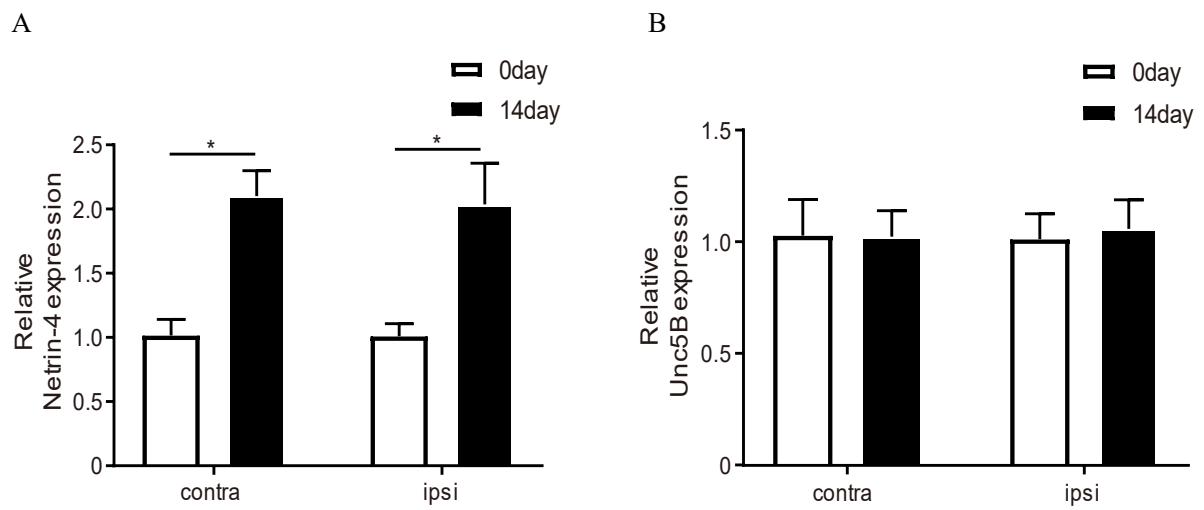


Fig.6 Netrin-4 および Unc5B の Vc~C1 における発現変化

CCI-Sham 処置後 14 日において処置前と比較し、Netrin-4 では有意に mRNA の発現増加を認めたが、Unc5B では発現量の変化は認めなかった。(A ; Netrin-4 の mRNA 発現量、B ; Unc5B の mRNA 発現量、\*p<0.05 ; Mann-Whitney test、n=3~5、平均値±SEM)

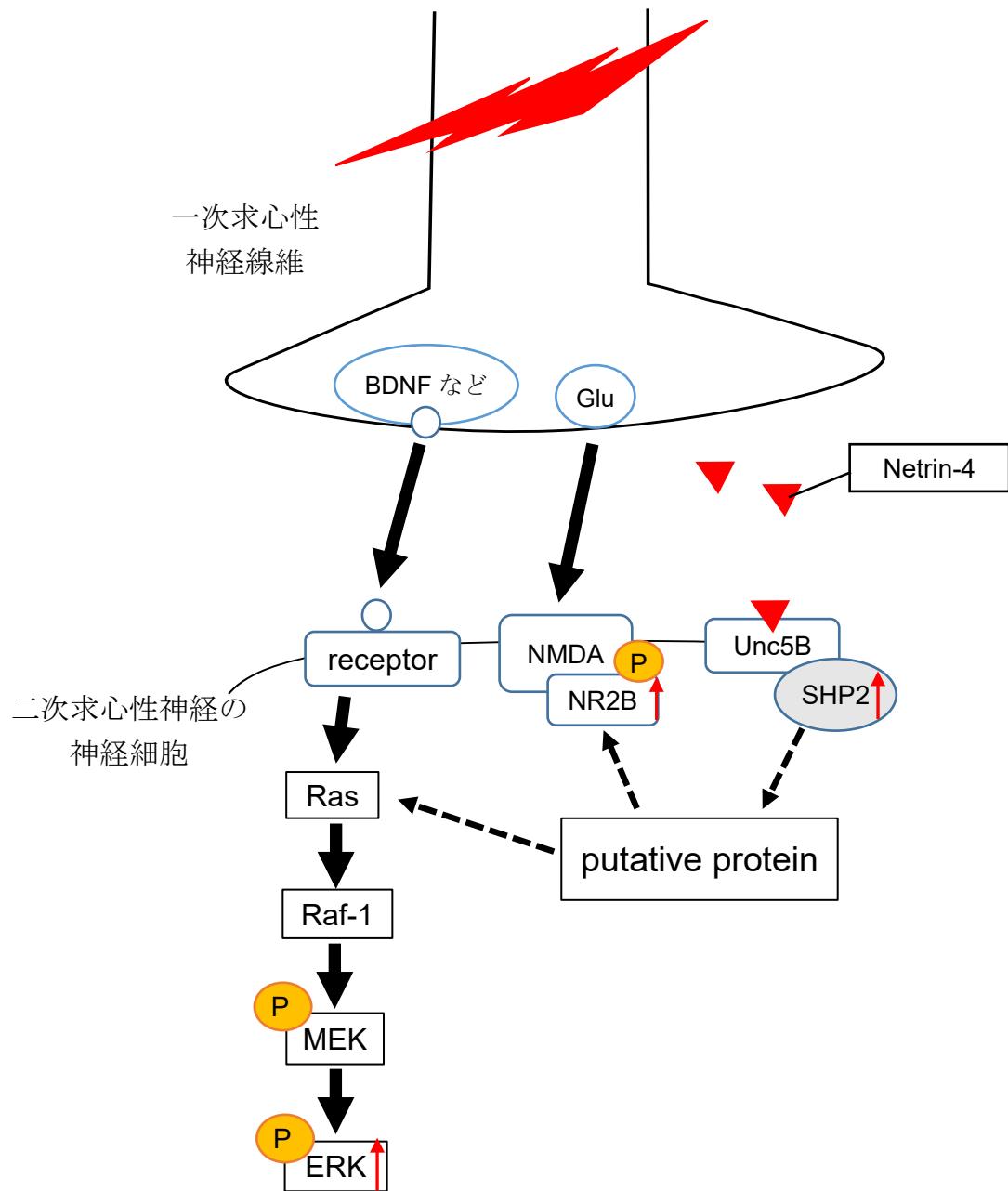


Fig.7 VcにおけるNetrin-4およびUnc5Bの作用機序（仮説）

末梢神経が損傷すると一次求心性神経（三叉神経）中枢側末端より BDNF や SP、グルタミン酸などの神経伝達物質が分泌され各受容体に結合し、ERK がリン酸化されることで活性化し、c-fos などの遺伝子が発現する。Netrin-4 は二次求心性神経（Vc）の神経細胞に発現しており、神経細胞に発現する Unc5B と結合することで Unc5B に結合している SHP2 が活性化し、さらに何らかのタンパク質を介して、NMDA 受容体のサブタイプの 1 つである NR2B の活性化や Ras の活性化が起こり、リン酸化された ERK が増加することで痛覚過敏発症に関与すると考えられる（破線矢印は仮説）。