



Title	神経障害性疼痛に対するTRPM2の関与
Author(s)	吉川, 千晶
Citation	大阪大学, 2023, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/91856
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 吉 川 千 晶 ）	
論文題名	神経障害性疼痛に対するTRPM2の関与
論文内容の要旨 【目的】 神経障害性疼痛の治療は薬物療法が主となるが、十分な効果の得られない場合も多く、新たな作用機序を持つ薬剤の開発は危急の課題である。神経障害性疼痛の発症にはミクログリアが関連することが知られてきた。ミクログリアは、通常条件下では「resting」状態にあるが、中枢神経の損傷や虚血、感染などを感知すると活性化し、Tリンパ球への抗原提示や炎症性サイトカインを含む様々な化学物質を放出することで、神経障害性疼痛の前段階である神経炎症を引き起こし、末梢や中枢神経の感作を引き起こす。 ミクログリアには、transient receptor potential（TRP）ファミリーの一つであるTRP melastatin2（TRPM2）が多く存在し、そのTRPM2が、神経障害性疼痛に関与する可能性が示唆されているが、その詳細については不明な点が多い。本研究では、神経障害性疼痛とTRPM2との関係を明らかにすることによって、TRPM2による神経障害性疼痛の病態を解明し、TRPM2をターゲットにした治療戦略を構築することを研究目的とした。 【方法】 〈実験1〉口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルラットの作製 7週齢の雄性wistarラットの鼻毛部に、von Freyフィラメントによる機械的刺激を5回ずつ段階的に与え、5回中3回以上、逃避行動を示した時の最小の刺激を閾値とした(von Frey test)。閾値が26g未満のラットは神経過敏と判断し、除外した。実験には、閾値が26g以上のラットを用いた。 三種混合麻酔薬で麻酔した後、鼻毛部の上縁に沿って約10mmの切開を行い、眼窩下神経(ION)を露出させた。露出した神経の2か所をそれぞれ4-0絹糸で緩く縛り、切開部を縫合した。結紮後3日目にvon Frey testを行い、逃避行動の閾値を測定した。閾値が15g以下に低下していたラットを、chronic constrictive nerve injury rat model of pain by ligation of the ION (ION-CCI)モデルラットとした。また神経の露出後、結紮を行わなかったラットをsham群とした。 〈実験2〉三叉神経脊髄路核尾側亜核(Vc)のミクログリア上のTRPM2の免疫反応性の検討 ION-CCIモデルラットの眼窩下神経の結紮後、3日目、7日目のラットをそれぞれpentobarbitalで麻酔後、灌流固定した。脳幹の50μmの凍結切片を作製した。また、結紮後1日目のラット群は機械刺激に対する逃避行動の閾値の低下を確認できていないが、比較のため免疫反応性の検討を行った。ionized calcium-binding adaptor molecule-1(Iba1)、およびTRPM2に対する蛍光免疫染色を行い、Vc領域の一定面積におけるIba1とTRPM2のmerge部位の面積の割合からTRPM2の免疫反応性を検討した。 〈実験3〉TRPM2の拮抗薬（ミコナゾール）が機械刺激に対する逃避行動に与える効果の検討 (1) ION-CCIラットに対し、結紮後3日目から4日間、1日1回ミコナゾール10mg/kgを腹腔内投与した。結紮7日目にvon Frey testを行った。ミコナゾールを投与した群をミコナゾール群、溶媒のみを投与した群をvehicle群とした。 (2) ミコナゾールの単回投与での効果を検討するために、ION-CCIラットに対し、結紮後3日目にミコナゾール10mg/kgを腹腔内投与した。その後、15分ごとに60分までvon Frey testを行った。同様にvehicle群でも閾値を計測した。 〈実験4〉ミコナゾールがVcのニューロンとミクログリアの活性化に及ぼす影響の検討 ION-CCIラットに対し結紮後3日目から4日間、1日1回ミコナゾール10mg/kgを腹腔内投与した。7日目に鼻毛部に15gのフィラメントで、1Hz、5分間の刺激を与え、その5分後に灌流固定を行った。脳幹の50μmの凍結切片を作製し、phosphorylated extracellular signal-regulated kinase (pERK)に対する免疫染色を行い、Vcに発現するpERK陽性細胞数を計測した。また、活性化ミクログリアのマーカーとして知られているCD68を用いて免疫染色を行い、陽性細胞数を計測した。 【結果】	

〈実験1〉ION-CCIラットは結紮後3日目において閾値の低下を示した(10.9±3.5g)。閾値の低下(機械刺激に対する過敏性)は7日目まで持続した。一方、sham群には過敏性は認められなかった。

〈実験2〉TRPM2の発現は、結紮側において吻尾的にVcの全域にわたって認められた。ION-CCIラットのVcにおけるミクログリア上のTRPM2の免疫反応性は、結紮後1日目と比べて結紮後3日目と7日目では有意に増加した。sham群と比較すると、ION-CCIラットの結紮後3日目と7日目ではそれぞれ有意な増加が見られた。

〈実験3〉(1)ミコナゾール群では、ミコナゾールの投与後である結紮後7日目において、投与前である結紮後3日目と比較して有意に機械刺激に対する閾値が上昇していた。ミコナゾール群とvehicle群間においては、結紮後7日目にミコナゾール群で有意な上昇が認められた。

(2)ミコナゾールの単回投与を行うと、投与前と比較して15分後から60分後までの15分間隔のすべての時点において有意差が認められた。また、両群間では15分後の時点においてミコナゾール群で有意に閾値が上昇していた。

〈実験4〉pERK陽性細胞は、obexより約2000 μ m尾側のVc表層において多く発現していた。その陽性細胞数は、vehicle群と比較してミコナゾール群で有意に減少していた。また、obexより約2000 μ m尾側のVc表層のCD68の陽性細胞数はミコナゾール群ではvehicle群と比較して、有意に減少していた。

【考察・結語】

本研究では神経障害性疼痛とTRPM2との関係を調べるために、モデル動物として、眼窩下神経を結紮したラットを用いた。ION-CCIラットは口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルとして多くの研究で用いられ、神経結紮の3日後から機械的刺激に対する逃避反応の閾値の低下が認められ、21日後まで持続する(Suzuki et al, 2013)。本研究のION-CCIラットにおいても同様の変化が認められ、神経障害性疼痛モデル動物として適切であると考えられた。

神経障害性疼痛の発症のメカニズムは解明には至っていないが、その発症にミクログリアが関与することが知られている(Tsuda et al, 2004; Tsuda et al, 2005; Coull et al, 2005; Inoue, 2006)。

ION-CCIモデルにおいてもVcのミクログリアの活性化が生じることが報告され(Shibuta et al, 2012)、Vc~C1の広い範囲におけるミクログリアの活性化が、同領域の神経興奮性の亢進に関与し、機械的アロディニアを発症させる(Shibuta et al, 2012)。本研究においても、結紮3日目にはVcの逃避閾値の低下とミクログリアの活性化が認められ、そのミクログリア上にはTRPM2が発現していた。神経損傷により、中枢にマクロファージの浸潤がおこることが報告されている(Nakagawa et al, 2013)。Iba1はミクログリアとマクロファージの両方に発現するタンパク質であるため、Iba1陽性細胞はミクログリアだけでなく、浸潤したマクロファージである可能性も排除できない。

本研究では、眼窩下神経結紮後にVcにおけるミクログリアの活性化を示す形態変化とミクログリア上のTRPM2免疫反応性の増加を認めた。また、鼻毛部の機械的刺激によりpERK陽性細胞が多く発現していた領域のCD68陽性細胞数がTRPM2の拮抗薬であるミコナゾール投与によって減少したことは、TRPM2を介した、ミクログリアの活性化の抑制を示唆している。この変化は、機械的刺激に対する閾値の上昇とVcにおけるpERK陽性細胞数の減少を伴っていた。

ミコナゾール投与によるTRPM2の拮抗は、一酸化窒素(NO)産生を抑制することによって、神経障害性疼痛を抑制する可能性がある。ミコナゾールを単回投与した後、一度上昇した逃避閾値が投与30分以降、再び低下するという現象が認められた。単回投与では全てのTRPM2が拮抗されるとは限らず、拮抗されず残ったTRPM2ではCa²⁺の流入が生じ、その後のカスケード反応が続き、投与から時間が経過するほど、その影響が現れた可能性が考えられる。行動学的な評価に留まるが、ミコナゾールによるTRPM2の拮抗によって得られた閾値の上昇が投与15分後という短期間で生じることから、TRPM2を介したNO産生の抑制に起因するような反応である可能性は低い。ミコナゾールは誘導型一酸化窒素合成酵素(inducible nitric oxide synthase: iNOS)にも結合することが報告されており(Yeo et al, 2020)、ミコナゾールがiNOSに直接的に作用するなら、投与後短時間での効果発現も可能性があるのではないかと考える。

口腔顔面領域に侵害刺激が伝わると、数分以内にVcニューロンにERKのリン酸化が生じ、pERK陽性細胞として検出される。本研究では結紮7日目に上顎鼻毛部皮膚を15.0 gのvon Frey filamentで5分間刺激したところ、pERK陽性細胞がobexより1950~2250 μ m尾側のVc表層において多く発現していた。ミコナゾールは、機械刺激に対する同部位のpERK陽性細胞数とCD68陽性細胞数を減少させ、神経障害性疼痛を改善した。

今回の実験では、ミコナゾールの抗真菌作用については評価していないが、腹腔内投与された10 mg/kgのミコナゾール濃度ではミクログリアや神経に対して有害な作用は及ぼさないものと推測される。ただし、ヒトの神経障害性疼痛の治療に用いるミコナゾールの適切な投与量については、今後の検討が必須である。

TRPM2は、神経障害性疼痛の治療のための新たな標的となる可能性がある。また、その拮抗薬であるミコナゾールはドラッグリポジショニングとして神経障害性疼痛の治療薬となる可能性を持つ。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (吉川 千晶)		
論文審査担当者	(職)	氏 名
	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 古田 貴寛
論文審査の結果の要旨 本研究は、神経障害性疼痛における TRPM2 の関与を、口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルである眼窩下神経結紮ラットを用いて検討したものである。 本研究の結果より、眼窩下神経結紮ラットでは、三叉神経脊髄路核尾側亜核の TRPM2 陽性ミクログリアの増加が認められた。また、TRPM2 の拮抗作用のあるミコナゾールを投与すると、機械的刺激に対する逃避反応の閾値の上昇と三叉神経脊髄路核尾側亜核の pERK 陽性細胞数の減少と活性型ミクログリアの減少が示された。これらの結果は、神経障害性疼痛に対してミコナゾールが TRPM2 を標的とした治療薬となる可能性を明らかにしたものであり、博士（歯学）の学位論文として、価値のあるものと認める。		