

## 学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
辰巳真一	主査 教授 南 敏 明 副査 教授 宮 崎 瑞 夫 副査 教授 林 秀 行 副査 教授 清 水 章 副査 教授 米 田 博
主論文題名 Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) (炎症性疼痛と神経因性疼痛における MARCKS のリン酸化反応を介した Rho キナーゼの関与)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究目的》</p> <p>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) は脳のシナプス間の交通や神経伝達物質の遊離といった細胞骨格の再構成に関する主要物質である。Ser159-phospho-MARCKS に対する特異抗体によって、Rho キナーゼが MARCKS を Ser159 でリン酸化すること、そのリン酸化反応を Rho キナーゼの特異的阻害薬である H-1152 が抑制することが明らかにされている。MARCKS は種々の部位でのリン酸化反応によって調節され、多様な機能を引き起こしているため、申請者は H-1152 を用いて、炎症性疼痛と神経因性疼痛における Rho キナーゼの関与について検討し以下の知見を得た。</p> <p>《材料と方法》</p> <p><u>ホルマリン試験</u>: ddY-マウス、雄の左足背側にホルマリンを皮下注射することによって惹起される炎症性疼痛に対し、H-1152 の効果を検討した。</p> <p><u>神経因性疼痛モデル</u>: L5 脊髄神経を結紮、離断することによって神経因性疼痛モデル (Chung モデル) を作製した。</p> <p><u>NADPH ジアホラーゼ組織化学</u>: ホルマリン試験後および Chung モデル作製後に脊髄標本を取り出し、NADPH ジアホラーゼ組織化学を用いて神経型一酸化窒素合成酵素 (neuronal nitric oxide synthase; nNOS) 活性の分布を調べた。</p> <p><u>組織化学</u>: Chung モデル作製後に脊髄標本を取り出し、抗 nNOS 抗体、抗 MARCKS 抗体、抗 Ser159-phospho-MARCKS 抗体を用いて免疫組織学的処理を行った。</p> <p>《結果》</p> <p><u>ホルマリン試験に対する H-1152 の効果</u>: ホルマリンの皮下注射による疼痛は、ホルマリンの侵害受容器への直接作用 (I 相) とそれに続く炎症性疼痛 (II 相) に分類される。脊髄腔内投与の H-1152 は I 相には効果なく II 相を抑制した。</p> <p><u>Chung モデルに対する H-1152 の効果</u>: Chung モデルで生じた疼痛閾値の低下は、H-1152 の脊髄腔内投与によって改善した。</p>	

nNOS 活性に対する H-1152 の効果: NADPH ジアホラーゼ反応によって視覚化された nNOS 活性は、Chung モデルにおいて脊髄後角の浅層で増加したが、H-1152 によって抑制された。  
脊髄における MARCKS のリン酸化反応: Chung モデルと正常マウスの脊髄を比較すると、MARCKS は変化なかったが、Ser159-phospho-MARCKS は Chung モデルの脊髄後角の浅層で増加した。

《考 察》

H-1152 がホルマリン試験の II 相を抑制し、Chung モデルの疼痛閾値を改善したこと、Chung モデルの脊髄後角の浅層で Ser159-phospho-MARCKS が増加したことから、Rho キナーゼによる MARCKS のリン酸化反応が炎症性疼痛と神経因性疼痛の発現に関与していると考えられる。nNOS の産生する一酸化窒素が神経因性疼痛の維持に必要なことは以前に報告されているが、今回 Chung モデルで増加した nNOS 活性を H-1152 が抑制したことより、神経因性疼痛の維持にも Rho キナーゼの関与の可能性がある。以上より、Rho キナーゼが MARCKS のリン酸化反応を介して炎症性疼痛と神経因性疼痛の発現・維持に関与する可能性が示唆された。

## 審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	辰 巳 真 一
論文審査担当者		主 査 教授 南 敏 明 副 査 教授 宮 崎 瑞 夫 副 査 教授 林 秀 行 副 査 教授 清 水 章 副 査 教授 米 田 博	
主論文題名 Involvement of Rho-kinase in inflammatory and neuropathic pain through phosphorylation of myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) (炎症性疼痛と神経因性疼痛における MARCKS のリン酸化反応を介した Rho キナーゼの関与)			
論文審査結果の要旨			
<p>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS) は脳のシナプス間の交通や神経伝達物質の遊離といった細胞骨格の再構成に関する主要物質である。Ser159-phospho-MARCKS に対する特異抗体によって、Rho キナーゼが MARCKS を Ser159 でリン酸化することが明らかにされている。MARCKS は種々の部位でのリン酸化によって調節され、多様な機能を引き起こしているため、申請者は Rho キナーゼの特異的阻害薬 H-1152 を用いて、炎症性疼痛と神経因性疼痛における Rho キナーゼの関与を検討した。</p> <p>ホルマリン試験において、H-1152 はホルマリンの侵害受容器への直接作用を示す I 相には効果なく、炎症性疼痛を示す II 相を抑制した。L5 脊髄神経を結紮、離断することによって生じる神経因性疼痛モデル (Chung モデル) において、H-1152 は疼痛閾値を改善した。神経因性疼痛の維持に必要とされる神経型一酸化窒素合成酵素活性は Chung モデルの脊髄後角浅層で増加したが、H-1152 はこれを抑制した。Chung モデルと正常マウスの脊髄を比較すると、MARCKS の分布は変わらなかったが、Ser159-phospho-MARCKS は Chung モデルの脊髄後角浅層で増加した。</p> <p>以上の結果より、Rho キナーゼによる MARCKS のリン酸化反応が炎症性疼痛と神経因性疼痛の発現と維持に関与していることが、本研究で明らかにされた。これらの結果は、神経因性疼痛の機序の解明と治療法の開発の糸口となることが期待される。</p> <p>以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。</p> <p>(主論文公表誌) Neuroscience 2005 in press</p>			