

氏 名	尾 本 遥
(ふ り が な)	(おもと はるか)
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学 位 授 与 番 号	甲 第 号
学 位 審 査 年 月 日	平成 27 年 7 月 29 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学 位 論 文 題 名	Comparison of mechanisms of allodynia induced by acromelic acid A between early and late phases (アクロメリン酸 A による早期と晩期のアロディ ニアの比較)
論 文 審 査 委 員	(主) 教授 朝 日 通 雄 教授 木 村 文 治 教授 小 野 富 三 人

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

《目 的》

痛みは侵害受容性痛及び神経障害性痛の 2 つに大別される。侵害受容性痛は外傷や病気に対する有用な生体防御のための警告反応であるが、神経障害性痛はそれ自体が有害な病態をもたらし、侵害性刺激に対する閾値が低下する痛覚過敏反応だけでなく、本来痛みを惹き起さない触覚刺激が痛覚となるアロディニアが誘発される。

日本特有の毒茸であるドクササコ (*Clitocybe acromelalga*) を摂取すると、数日後に四肢末端の灼熱痛とアロディニアが出現する。以前我々は、ドクササコの主成分であるアクロメリン酸 A(ACRO-A) をマウスの脊髄腔内に 1 fg/mouse という極少量投与するだけで、アロディニアが出現し 4 週間以上持続することを明らかにした。神経障害性痛の発現と維持には NMDA 受容体 - 一酸化窒素 (NO) 系を介した興奮性の増大や、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞の活性化が関与しているとされているが、不明な点も

多い。

今回我々は ACRO-A によりアロディニアを惹起したマウスに種々の薬剤を投与し早期 (ACRO-A 投与後 1 時間) と晚期 (ACRO-A 投与後 1 週間) を比較することにより、ACRO-A によるアロディニアの発現および維持の機序について検討した。

《方 法》

① ddY- マウスの雄の脊髄腔内に ACRO-A 1 fg を投与し、アロディニアを惹起させた。NMDA 受容体 - NO 系に作用すると考えられている Ca チャネル $\alpha 2 \delta$ リガンド (pregabalin、gabapentin、L-leucine、L-isoleucine)、NMDA 受容体受容体拮抗薬 (MK-801)、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体拮抗薬 (JSTX)、NOS 阻害薬 (L-NAME)、CaMKII 阻害薬 (KN-92、KN-93 (KN-92 は KN-93 の inactive analog)) を脊髄腔内に ACRO-A と同時に投与したもの (早期) と ACRO-A の 1 週間後に投与したもの (晚期) のアロディニアの程度を行動学的に比較した。

② ACRO-A 投与後、早期と晚期の脊髄後角の nNOS 活性を NADPH ジアホラーゼ染色により組織化学的に比較した。

③ ミクログリア活性を阻害するとされているミノサイクリンを ACRO-A の脊髄腔内投与前日から 4 日間 (前処置群) または翌日から 4 日間 (後処置群) 毎日 30mg/kg 腹腔内投与し、アロディニアを ACRO-A 投与後 7 日目まで観察した。また、脊髄後角でのミクログリア活性を早期と晚期に Iba1 染色により組織化学的に検討した。

④ ACRO-A 投与後の晚期のマウスの脊髄腔内にアストロサイトに特異的な毒素である LAA を投与し、アロディニアの程度を行動学的に評価した。

《結 果》

① 今回使用した Ca チャネル $\alpha 2 \delta$ リガンド、NMDA 受容体受容体拮抗薬、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体拮抗薬、NOS 阻害薬、CaMKII 阻害薬は全て用量依存的に早期のアロディニアを抑制したが、晚期のアロディニアは抑制しなかった。

②nNOS は早期には活性化されていたが、晩期には活性化されていなかった。

③Iba1 染色では早期は変化がなかったが、晩期には著明にミクログリアが増加していた。また、ミノサイクリン投与により明らかにミクログリアの発現は抑制されていたが、行動学的には前処置群、後処置群ともにアロディニアを抑制しなかった。

④LAA は晩期のアロディニアを著明に改善した。

《考 察》

一般に確立された神経障害性痛モデルには薬剤投与モデルと神経損傷モデルが用いられている。神経損傷モデルでは刺激が持続するため、アロディニアを早期と晩期に分けて考えることができない。そのため今回は 1 度の投与で 4 週間以上アロディニアが持続する ACRO-A の脊髄腔内投与を選択した。ACRO-A 投与によるアロディニアは一般的な神経障害性痛の臨床症状と非常に類似しており、本研究の結果は神経障害性痛に共通している可能性が示唆される。

本研究では早期と晩期のアロディニアは行動学的には極めて似た反応を示しているにもかかわらず、グルタミン酸受容体 - NO 系に関与するとされているすべての薬剤が早期のアロディニアは抑制したが、晩期は抑制しなかった。NADPH ジアホラーゼ染色の結果からも、NMDA 受容体およびそれに続くカスケードの活性化は ACRO-A 惹起の早期のアロディニアの発現に関与しているが、一旦活性化されるとアロディニアの維持には持続的な活性は必要なく、晩期のアロディニアは早期のアロディニアの発現機序とは異なっていると考えられる。

また、ミクログリアは ACRO-A 投与により晩期に著明に活性化された。しかし、ミノサイクリンの投与によりミクログリア活性は抑制されたにもかかわらずアロディニアは抑制されなかった。一方、アストロサイトを抑制する LAA の投与では晩期のアロディニアは抑制された。ミクログリアではなくアストロサイトが晩期のアロディニアの維持機構に関与している可能性が示唆された。

以上のことより、ACRO-A 惹起の早期のアロディニアの発現には NMDA 受容体 - NO

系が、晩期のアロディニアにはグリア細胞のアストロサイトが関与していることが明らかになった。しかし、早期のアロディニア発現機序と晩期のアロディニア発現機序が互いに独立したものなのか、関連するのは更なる研究が必要である。早期から晩期の細胞内シグナル伝達経路の変更機序を理解することにより、慢性疼痛の新しい治療法の開発における重要な一助になると考えられる。

論文審査結果の要旨

日本固有の毒茸であるドクササコから抽出されたアクロメリン酸 A(ACRO-A) をマウスの脊髄腔内に投与すると触覚刺激で誘発される激しい痛み（アロディニア）が惹起され、長期間持続する。神経障害性痛の発現と維持には NMDA 受容体 - 一酸化窒素 (NO) 系を介した興奮性の増大や、アストロサイトやミクログリアなどのグリア細胞の活性化が関与しているとされているが、不明な点も多い。

申請者は、ACRO-A によりアロディニアを惹起したマウスの早期 (ACRO-A 投与 1 時間後) と晚期 (ACRO-A 投与 1 週間後) を比較することにより、以下の知見を得た。

①NMDA 受容体 -NO 系に作用すると考えられている Ca チャネル $\alpha 2\delta$ リガンド、NMDA 受容体受容体拮抗薬、 Ca^{2+} 透過性 AMPA 受容体拮抗薬、NOS 阻害薬、CaMKII 阻害薬は用量依存的に早期アロディニアを抑制したが、晚期アロディニアは抑制しなかった。

②nNOS は早期には活性化されていたが、晚期には活性化されていなかった。

③早期はミクログリアに変化がなかったが、晚期には著明にミクログリアが増加していた。ミクログリア活性を阻害するとされているミノサイクリンの投与により明らかにミクログリアの発現は抑制されていたが、行動学的にはアロディニアを抑制しなかった。

④アストロサイトに特異的な毒素である LAA は晚期のアロディニアを著明に改善した。

これらの知見より、申請者は ACRO-A 惹起の早期のアロディニアの発現には NMDA 受容体 - NO 系が、晚期のアロディニアにはグリア細胞のアストロサイトが関与していることを明らかにしたと考えられ、早期から晚期の細胞内シグナル伝達経路の変更機序を理解することが、慢性疼痛の新しい治療法の開発における重要な一助になる可能性を示唆している。

以上により、本論文は本学大学院学則第 11 条第 1 項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。

(主論文公表誌)

European journal of pharmacology 760: 42-48, 2015