HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	急性炎症痛におけるカリウムークロール共輸送体KCC2の発現減少に対するTrkB受容体の役割についての研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	敦賀, 健吉
Description	配架番号：1690
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第7004号
Issue Date	2016-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/64459
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kenkichi_Tsuruga_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　敦賀　健吉

学 位 論 文 題 名

急性炎症痛におけるカリウムークロール共輸送体 KCC2 の発現減少に対する TrkB 受容体の役割についての研究
(A Study on the role of TrkB receptor on downregulation of a potassium chroride cotransporter KCC2 in the spinal cord during acute inflammatory pain)

【背景と目的】痛みは動物にとって生体防御としての重要な役割を果たしている．しかし過度な痛みは生体にとって強いストレスであり不要な苦痛となるため，痛みの発生機序，増幅機構の解明は病的な痛みの治療のために有用と考える．カリウムークロール共輸送体（KCC2）は脊髄後角細胞に発現しており，その発現量の変化は抑制性神経伝達物質であるγーアミノ酪酸（GABA）を興奮性に逆転させることが知られている．神経障害痛においては，活性化ミクログリアより脳由来神経栄養因子（BDNF）が放出され，TrkB 受容体を介して KCC2 の発現減少を引き起こしていると考えられている．一方，急性炎症痛においても，過去にラット足底にホルマリンを注射した 5 分後に脊髄後角浅層における KCC2 タンパク発現量と KCC2 免疫反応が減少したという報告がある．しかしこのような急性炎症痛における KCC2 発現減少の機序はまだ明らかになってはいない．
今回の研究では急性炎症痛における痛み増強の作用機序を解明すべく，ラット足底へのホルマリン注射 5 分後における脊髄後角の KCC2 発現減少について各実験を行い検討した．
【対象と方法】実験は 10 週齢の雄性 Sprauge-Dawley ラットを用い，すべて「北海道大学における動物実験に関する指針」に準拠して行った．急性炎症痛のモデルはセボフルランによる吸入麻酔下のラット左足底に 5%ホルマリンを 50μg 皮下注射することで作成した．ホルマリン注射 5 分後にペントバルビタールを腹腔内投与し，十分な麻酔震度に達した後に開胸して心臓を露出，実験 1~3 においてはリン酸バッファー生理食塩水で灌流後 4%パラホルムアルデヒドにより組織を固定，脊髄を摘出した後にショ糖で置換した．脊髄標本は－15℃に保温されたクライオトーム内で標本を O.C.T. compound に包埋し凍結させた後，アビジンービオチン複合体染色用には 30μm，蛍光二重染色用には 15μm の厚さで横断切片を作成した．
実験 1 ではホルマリン注射によって KCC2 の免疫組織化学的反応が脊髄後角において減少するかを，画像解析ソフトを用い KCC2 陽性領域の左右比の変化を画像的に解析することで検討した．また，この KCC2 発現減少がホルマリン注射 15 分前にくも膜下腔へキナーゼ阻害剤 K252a を 2μg 注入することによって抑制されるか実験し，TrkB 受容体を介して BDNF が KCC2 発現減少に影響している可能性を評価した．実験 2 ではホルマリン注射による TrkB，BDNF，活性化ミクログリアのマーカーである Iba1，C 線維のマーカーであるイソレクチン B4（IB4）の免疫組織化学的反応の左右比の変化を実験 1 と同様に画像的に解析し，BDNF がミクログリア以外から放出されている可能性を評価した．実験 3 では KCC2 と TrkB，Iba1 と BDNF，BDNF と IB4 の蛍光二重染色をそれぞれ行い，C 線維が急性炎症痛における KCC2 発現減少に影響している可能性を評価した．
実験 4 では KCC2 と BDNF の mRNA 量が足底へのホルマリン注射によって変化するのか in situ hybridization 法を用いて評価した．実験 4 ではラットを放血死させた後に脊髄標本は液体窒素で凍結し，凍結切片を作製しスライドグラスに張り付けた．アンチセンスプローブを terminal deoxynucleotidy transferase を使用し，33P-dATP で標識した．ハイブリダイズした切片は，オートラジオグラフ用乳剤に浸漬させ，4℃で 8~12 週間露光させた．乳剤切片は現像後に，ヘマトキシリンで核染色を行い，暗視野と明視野で観察した．

【結果】過去の報告と同様に，足底へのホルマリン注射の 5 分後に脊髄浅層における KCC2 の免疫組織化学的反応は刺激側で有意に減少していたが，その減少は主として脊髄 II 層であり，脊髄 I 層では有意な減少は認められなかった．またこの反応は K252a のくも膜下注入によって抑制された．ホルマリン注射によって脊髄 II 層の TrkB，BDNF，Iba1，IB4 の免疫組織化学的反応の左右比に有意な変化は認められなかった．Iba1 の染色の結果，ホルマリン注射によって活性化ミクログリアが増加している可能性が示唆された．KCC2 は特に脊髄 II 層で TrkB 受容体と共染性を示しており，BDNF と Iba1 は共染性を示しておらず，BDNF とイソレクチン B4 は脊髄 II 層で共染性を示していた．ホルマリン注射によって KCC2，BDNF ともに mRNA 量に有意な変化は認められなかった．

【考察】実験 1 の結果から，急性炎症痛においても神経障害痛と同様に，KCC2 発現減少に TrkB 受容体を介した BDNF の作用が関係している可能性が示唆された．しかし神経障害痛における過去の報告と異なり，KCC2 の発現減少の場は脊髄 II 層が主体であったことから，急性炎症痛と慢性痛の間には同じ KCC2 の発現減少であっても何らかの異なる作用機序が存在している可能性が考えられた．

実験 2 の結果では，ホルマリン注射による BDNF の増加を確認することは出来なかったが，BDNF 陽性領域は脊髄 II 層に多く存在していた．また形態学的に急性炎症痛においても活性化ミクログリアが増加している可能性が示唆された．

実験 3 の結果から KCC2 と TrkB 受容体が共発現していることが示され，BDNF が脊髄後角細胞に TrkB 受容体を介して直接作用し KCC2 の発現減少を引き起こしている可能性が示唆された．このためホルマリン注射後 5 分という短い時間でも BDNF の作用によって KCC2 の発現が減少することは可能と考えた．BDNF の放出源として，神経障害痛と同様に活性化ミクログリアの可能性も考えられたが，蛍光二重染色の結果 BDNF と Iba1 は共発現しておらず，BDNF の放出源として活性化ミクログリアは否定的と考えられた．一方で BDNF と IB4 が共発現していることから，C 線維が BDNF の放出源であり急性炎症痛における KCC2 の発現減少に関与している，という仮説が考えられた．

しかし実験 4 の結果により，KCC2 の発現減少を mRNA の変化から説明することは出来なかった．これは C 線維終末が存在する脊髄後角では BDNF は合成されておらず，BDNF は C 線維の核が存在する脊髄後根神経節で合成され脊髄後角に輸送され，放出されているからかもしれない．また，KCC2 の代謝回転は非常に速い周期で行われているため，KCC2 の発現減少が KCC2 合成の減少では無く分解の促進によるものである可能性があり，これが KCC2 の mRNA 量の変化から発現減少の機序を説明できなかった理由なのかもしれない．今後これらの仮説を証明するためには，行動学的検討に加え，DRG における BDNF の mRNA 量の定量的評価や，KCC2 タンパクの定量的評価など様々な研究の追加が必要と思われた．

【結論】急性炎症痛においては神経障害痛と異なりミクログリア由来ではなく C 線維由来の BDNF が TrkB 受容体を介して脊髄後角細胞に作用し KCC2 の発現を減少させている可能性が示唆されたが，その証明にはさらなる研究が必要と考えられた．