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_review.pdf, 審査の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏名　敦賀　健吉

審査担当者
主査　教授　岩　永　敏　彦
副査　教授　森　本　裕　二
副査　教授　渡　邉　雅　彦

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)

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られる．

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．

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の発現が減少したという報告があるが，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KCC2発現減少が神経障害痛と同様にBDNFによるものである可能性について検討した．

足底へのホルマリン注射の5分後に，脊髄II層におけるKCC2の免疫組織学的反応は刺激側で有意に減少し，その反応はくも膜下腔へのキナーゼ阻害剤K252aの注入によって抑制された．次に，ホルマリン注射による脊髄II層の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の免疫組織学的反応の左右比を解析したが有意な変化は認められなかった．また，免疫蛍光二重染色の結果によると，KCC2は特に脊髄II層でTrkB受容体と共染性を示しているが，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．最後に，急性炎症痛におけるKCC2とBDNFのmRNA量の変化を調べたが,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．

これらの結果から，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，その証明には更なる研究が必要と考えられた．

審査に当たり，副査の渡辺教授より①組織採取までの設定時間は広く変化させて時間経過による変化を見る必要がある．②共発現を見る際には，その物質がどこに存在するのかといった区別が必要である．たとえば，KCC2とTrkBはこの倍率では同一に発現しているか近接しているかは分からず,BDNFを細胞内で見ることは難しいためBDNFの放出源は分からない．放出源を調べるためには別の視点で研究を考える必要がある．③KCC2がシナプス前後どちらにあるかで話が変わるため，実験前・実験中でも物質の局在について考える視点を持つ必要がある．以上3点の指摘を受けた．また，BDNFの放出源を明らかにするために

どんな実験が必要かとの質問があり，申請者はBDNFの放出源がC線維であるという仮説の証明のためには細胞体のある脊髄後根神経節における BDNF の mRNA 量を定量的に評価する必要があると回答した．

主査の岩永教授より,慢性痛と急性痛ではKCC2減少の作用機序が異なるという主張だが,自ら慢性痛におけるKCC2の発現変化について観察する考えは無かったのかという質問があった。申請者は研究の余裕が無く，また過去の研究での神経障害痛モデルラットの作成は技術的に難しかったが，他のより作成が容易な神経障害痛モデルを使いKCC2減少についての研究を行うべきであったと回答した．またBDNFの放出源のメインがC線維とミクログリアのどちらなのか，今後検討すべき課題であるとの指摘を受けた．

副査の森本教授から，①BDNF以外にTrkBに作用する機序はあるのか，②実験2のTrkBの発現とは受容体の発現をみたものなのか，③ホルマリン刺激の痛み刺激としての位置づけについての質問があった．これらに対し，①キナーゼ阻害剤を用いた検討のため KCC2 に対する他の作用機序が関与している可能性はあり，より選択性の高い阻害剤を使用した研究が必要と考えている．②DAB染色を画像評価した限定的な判定ではあるが，基本的には発現量を反映した結果と考えている．③ホルマリン刺激は歴史のある痛みモデルではあるが,痛み反応は時間によって神経障害痛となる時期があるため今後の研究では，急性炎症痛モデルの検討が必要になるかも知れないと回答した．

本研究は，急性炎症痛における痛み増強の機序の解明に繋がるという点において高く評価され，さらなる研究が期待される．

審査員一同は，これらの成果を高く評価し，申請者が博士（医学）の学位を受けるのに充分な資格を有するものと判定した．