論 文 の 内 容 の 要 旨

論文提出者氏名	井　出　進
論文審査担当者	主　査　中山　淳 副　査　高橋　淳　・　福島　菜奈恵　・　飯田　宏樹

論　文　題　目

Phospholipase Cβ3 expressed in mouse DRGs is involved in inflammatory and postoperative pain
（マウス後根神経節に発現する PLCβ3 は炎症性及び術後性疼痛に関与する）

（論文の内容の要旨）

【背景】組織に炎症が生じると、ブラジキニンなどさまざまなサイトカインが放出され、それぞれ固有の受容体を介してホスホリパーゼ Cβ（PLCβ）が活性化される。活性化された PLCβ はその後のカスケード反応を介して、痛み受容に関与するカプサイシン受容体（TRPV1 受容体）などを活性化し、痛覚過敏が引き起こされる。PLCβ には各受容体からのシグナルが集約してくるため、痛覚過敏治療の標的となりうることが期待される。PLCβ には 4 つのサブタイプがあり、このうち末梢神経に発現するのは PLCβ1、PLCβ3、PLCβ4 である。PLCβ3 は炎症性疼痛モデルにおいて痛覚過敏へ関与することが示されているが、詳細な検討はなされていない。また、術後痛モデルでの関与は示されていない。本研究では末梢神経に発現する PLCβ3 がどのような感覚神経に発現しているのか、また急性期および慢性期の炎症性疼痛における関与や術後性疼痛における関与を明らかにすることを目的とする。

【方法】免疫染色実験では、マウスの後根神経節（DRG）を摘出して免疫染色を行った。一次抗体には PLCβ3、代表的な侵害受容体である TRPV1、有髄神経のマーカーである NF-200、非ペプチド作動性ニューロンに特異的に結合する IB4 を使用した。蛍光標識二次抗体を用いて二重または三重染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて撮影した。PLCβ3 のたんぱく定量には、β アクチンを対照としたウェスタンブロット法を用いた。炎症性疼痛モデルマウスでは、マウスの左足底に起炎物質（complete Freund's adjuvant: CFA）30 μL を注入した。術後痛モデルマウスでは、マウスの左足底を 6 ㎜切開したのち縫合した。PLCβ3 のノックダウン効果をみるために、マウスの脊髄くも膜下腔に細径のチューブを留置し、アンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）を 3 日間投与した。熱刺激実験は、マウスの足底に熱線を照射し、逃避潜時を評価した。機械刺激実験は、マウスの足底を機械的に刺激し、逃避閾値を計測した。ODN は、炎症急性期の効果を評価するために CFA 投与前に、炎症慢性期の効果を評価するために CFA 投与後に、それぞれくも膜下投与した。術後痛モデルでは足底切開前に ODN を投与した。それぞれのモデルにおいて熱および機械刺激実験を経時的に行った。

【結果】免疫染色実験では、PLCβ3 は NF-200 陽性細胞とは共発現せず、PLCβ3 陽性神経のうち 64%は IB4 陽性、30%は TRPV1 陽性であり、IB4 もしくは TRPV1 のどちらかと共発現していた。CFA 投与により、7 日間熱性および機械性痛覚過敏となることを確認した。CFA 投与前、1 日後、3 日後、7 日後では PLCβ3 のたんぱく量は変化しなかった。アンチセンス ODN 投与 24 時間後に、PLCβ3 のたんぱく量は対照群に比べ 60%に減少した。PLCβ3 アンチセンス ODN は PLCβ1 および PLCβ4 のたんぱく量には影響しなかった。アンチセンス ODN を投与しても、熱刺激および機械刺激に対する逃避閾値は変化しなかった。一方、アンチセンス ODN 投与は、CFA によって生じる熱性および機械性痛覚過敏を 24 時間抑制した。CFA 投与から 2 日後には ODN の痛覚過敏抑制効果は消失した。アンチセンス ODN の炎症慢性期への影響を調査するため、CFA 投与 4 日後から ODN を投与したところ、CFA 投与 7 日後の熱性痛覚過敏および機械性痛覚過敏は抑制された。8 日後には痛覚過敏抑制効果は消失した。アンチセンス ODN の足底切開モデルでの熱性および機械性痛覚過敏への影響を調査するため、ODN を足底切開前に 3 日間投与したところ、足底切開から 24 時間後まで熱性および機械性痛覚過敏は抑制された。切開から 2 日後には痛覚過敏抑制効果は消失した。

【考察】非ペプチド作動性ニューロンに特異的な IB4 結合神経は機械性痛覚過敏に、ペプチド作動性ニューロンに特異的な TRPV1 陽性神経は熱性痛覚過敏に関与していることが知られている。今回の免疫染色実験と行動学的実験との結果は矛盾しないことが示唆された。PLCβ3 は非炎症時における痛覚閾値には関与していなかった。また、PLCβ3 は炎症時にアップレギュレーションすることなく、ノックダウンによって PLCβ3 たんぱくが減少することにより熱性および機械性痛覚過敏が抑制された。PLCβ3 は炎症によって活性化され、痛覚過敏の発症に関与することが示唆された。PLCβ3 のノックダウンは炎症性モデルおよび術後痛モデルの両方で痛覚過敏を抑制したことから、PLCβ3 は痛覚過敏の治療ターゲットになりうるとことが示唆された。

【結論】マウス DRG に発現する PLCβ3 は炎症性疼痛及び術後性疼痛に関与した。