

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 <b>375</b> 号	学位申請者	用皆正文
審査委員	主査	武田 泰生	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	桑木 共之	副査 乾 明夫
	副査	古川 龍彦	副査 有田 和徳

主査および副査の5名は、平成28年4月21日、学位申請者用皆正文君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 視床痛モデルではマイクログリアが活性化するが、PACAP/maxadilan (Max) 髄腔内投与モデルではなぜ、マイクログリアが活性化しないのか？

(回答) 視床痛モデルでは視床にコラゲナーゼを注入する際、組織損傷を伴うが、PACAP/Max 髄腔内投与モデルでは脊髄に直接的な損傷が加わらなかったこと、正常マウス脊髄マイクログリアにはPAC<sub>1</sub>受容体を発現していなかったこと、in vitro でPACAPは培養マイクログリア活性を抑制することなどから、マイクログリアが活性化されなかったと考えられる。しかし、ニューロンおよびアストロサイト活性化に伴う間接的な早期マイクログリア活性化の可能性は残るため、PACAP/Max投与後21日以前の脊髄マイクログリア活性化の有無の検討が必要であると考ええる。

質問2) GFAP発現上昇は、慢性疼痛発症に関与するのか？

(回答) アストロサイト活性化によりGFAPの発現が上昇すると、JNK経路の活性化とサイトカイン(TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ )等の放出が誘発されるため、脊髄後角二次ニューロンの中樞感作が生じ、慢性疼痛を惹起することが示唆されている。

質問3) 髄腔内投与により機械的アロディニアは発症するが、なぜ熱性痛覚過敏は発症しないのか？

(回答) PACAP髄腔内投与は、有意なaversive behaviorを誘発しない用量で、熱性痛覚過敏を投与後数十分間誘発し、またPACAP KOマウスは末梢神経障害モデルにて機械的アロディニアと熱性痛覚過敏を軽減することが報告されていることから、PACAPは両徴候の発症に関与していると考えるが、両徴候の発症時間の相違のメカニズムは更なる検討が必要と考える。

質問4) 機械的アロディニア発症に用いたPACAP投与量は適正量なのか？

(回答) 齧歯類末梢神経障害モデルにおけるPACAP増加量に関する報告は無いが、健常成人ヒト脳脊髄液中のPACAP濃度は16.1 pMと報告されている。また、ラットにおいては、カプサイシン皮下投与後10分以降に脳脊髄液中のPACAP濃度が2倍以上に増加する。今回のマウス髄腔内投与(100 pmol/5  $\mu$ L)後の脳脊髄液中の濃度は、マウス脳脊髄液量を30-40  $\mu$ Lであると仮定すると、数 $\mu$ M程度になると計算されるが、ペプチダーゼ等による分解、投与時の漏出等を考慮すると、機械的アロディニア発症に関与するシナプス近傍における実質濃度は相当低くなることが考えられる。末梢神経障害等によりPACAPはDRGニューロンにおいて著明な発現上昇をすることから、非現実的な用量であるとは考えていない。

質問5) MEK阻害剤投与後にGFAPの発現を見れば、アストロサイトに対する直接的効果が見られるのでは？

(回答) 今後、検討する必要がある。

質問6) 末梢神経障害性疼痛モデルで、ERK および JNK の各阻害薬、L- $\alpha$ -AA および max.d.4 は、疼痛を減弱する効果があるのか？

(回答) 末梢神経障害性疼痛が、ERK および JNK 阻害薬、L- $\alpha$ -AA によって抑制されることは、報告されている。また、我々は予備的検討において、max.d.4 (100 pmol) の連日投与 (1回 / 1日、7日間) により、末梢神経障害により誘発される機械的アロディニア発症を抑制することを見出している。

質問7) なぜ、PACAP は生理的疼痛の際は放出されずに、神経障害性や炎症性疼痛モデルで放出されるのか？

(回答) PACAP は通常、ペプチド作動性一次求心性 C 線維に含まれており、生理的疼痛の際も SP、CGRP 同様、放出されると考えられるが、神経障害時や組織炎症時では神経成長因子 (NGF) 等の作用により、後根神経節でその発現が増加し、脊髄後角内において、生理的疼痛時より多量に放出されると考えている。

質問8) L- $\alpha$ -AA がアストロサイトを抑制する作用機構と作用時間は？

(回答) L- $\alpha$ -AA はアストロサイト選択的にグルタミン酸トランスポーター (XAG<sup>-</sup>) によって取り込まれ、細胞内でシステイン・グルタミン酸交換体 (XC<sup>-</sup>) によるシステインの取り込みを阻害し、グルタチオン合成を減少させる。そのため、アストロサイトは活性酸素種を除去できなくなり、機能的に阻害されると考えられている。本研究において L- $\alpha$ -AA (300 pmol) は、投与2時間後にアストロサイト活性化の指標である GFAP の発現上昇を顕著に抑制し、アストロサイト活性に付随する機械的アロディニアも投与後3時間、顕著に抑制されたことから、作用時間は3時間前後と考える。

質問9) PACAP/Max 髄腔内投与によって、JNK 等の下流シグナルがどこまで活性化されれば、機械的アロディニアは長期持続するのか？

(回答) 現時点では検討していないので詳細は分からないが、今後更なる検討が必要と考える。

質問10) L- $\alpha$ -AA 効果消失後、一時的に抑制された GFAP 発現レベルは再び上昇するのか、もし上昇するのであれば、そのメカニズムは？

(回答) 現時点では検討していないので詳細は不明であるが、今後検討が必要であると考える。

質問11) PACAP/Max 髄腔内投与による疼痛に関して、アストロサイトのグルタミン酸の寄与をどのように考えているのか？

(回答) NMDA (1 nmol) を髄腔内投与しても、短期の機械的アロディニアのみを引き起こすことから、少なくとも NMDA 受容体の関与は少ないと予測されるが、他のグルタミン酸受容体の関与についても今後検討を行う必要がある。

質問12) PACAP/Max 髄腔内投与後、アストロサイトが長期活性しているが、どのタイミングでもアストロサイトを抑制したら、aversive behavior や機械的アロディニアが軽減するのか？

(回答) Aversive behavior や機械的アロディニアは、アストロサイト阻害剤 (L- $\alpha$ -AA) の同時投与や後投与 (Day 84) により、顕著に抑制されたため、他の時点でも L- $\alpha$ -AA により抑制される可能性がある。

質問13) PACAP/Max 投与マウスに情動変化は認められたか？

(回答) 今回、情動関連検査は実施していないが、疼痛行動試験時の観察では、目立って落ち着きがないなどの行動異常は認められなかった。

質問14) ERK や JNK の阻害剤を PACAP/Max 投与後の慢性期に投与しても回復がみられるか？

(回答) 今回は、ERK/JNK 阻害剤を PACAP/Max と同時投与を行ったのみであり、後投与の効果は、今後検討していく必要がある。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。