

論 文 要 旨

Actions of brain-derived neurotrophic factor on the spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat.

炎症ラットにおける脊髄痛覚伝達系可塑的变化に対する
脳由来神経栄養因子の作用解析

又 吉 達

【序論および目的】

脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、海馬におけるシナプス伝達を修飾する事から学習や記憶の形成に関与する事が広く知られているが、脊髄における作用については不明な点が多い。現在まで免疫組織化学的研究から、脊髄後角表層において炎症初期に BDNF の発現が増大する事が観察されている。また、その後一週間が経過すると後角表層の痛覚伝達系に可塑的变化が起こり、触を伝える A β 線維が痛覚回路に入力してアロディニア (異痛症) が生じると考えられている。しかし、炎症初期に発現が増大する BDNF が、痛覚伝達系やその可塑的变化の発現 (アロディニアの発現) に如何なる役割を果たすかは未だに明らかにされていない。本研究では、電気生理学的手法を用いて炎症時脊髄痛覚伝達系に対する BDNF の作用機序の解析を行った。

【材料および方法】

7~9週齢の雄性 Sprague-Dawley ラット後肢足底に、Freund's のアジュバントを注入して炎症モデルを作製した。炎症および正常ラットから L4-5 レベルの脊髄横断スライスを作製し、後角表層の第 II 層、痛みの伝達や修飾に重要な役割を果たす膠様質細胞からパッチクランプ記録を行った。炎症時に興奮する膠様質細胞の部位を免疫組織化学的手法 (C-fos の発現観察) により同定した。膠様質細胞に誘起される自発性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) および一次求心性線維の後根刺激によって誘起された EPSC を記録した。BDNF など種々の薬物を脊髄スライスに投与して EPSC の発生頻度および振幅の変化を解析した。また、抗 BDNF 抗体を投与した炎症ラットにおいても同様に EPSC の記録・解析を行った。Von Frey ファイラメントを用いた行動薬理的解析も併せて行なった。

【結果】

正常ラットでは何ら作用を示さなかったが、BDNF は炎症初期 (2-4 日後) のラット膠様質細胞に誘起される自発性 EPSC の発生頻度を著明に増大させた。この作用は C-fos の発現

が多くみられた膠様質内側部の細胞で特に観察された。一方、一週間を経過した炎症モデルでは BDNF の作用は消失した。BDNF による EPSC の発生頻度増大は、BDNF の高親和性受容体である TrkB タイロシンカイネースのインヒビター、K252a によって抑制された。さらに、テトロドトキシン (TTX) や PLC のインヒビター存在下では抑制されなかったが、TTX 非感受性 Na チャンネルを抑制するリドカインで抑制された。後根誘起の単シナプス性 EPSC の振幅に BDNF 投与による変化は認められなかった。

炎症一週間を経過したラットに予め抗 BDNF 抗体を投与すると、膠様質細胞への A β 線維の EPSC の入力増大は観察されなかった。行動学的解析から、このラットでは痛覚閾値が有意に減弱し、アロディニアが抑制された。

【結論及び考察】

脊髄痛覚伝達系に対する BDNF の作用をシナプスレベルで解析し、BDNF は正常では作用を示さなかったが、炎症初期に膠様質における興奮性シナプス伝達を増強する事を見出した。また、抗 BDNF 抗体を用いて BDNF の作用を抑制すると、痛覚伝達系の可塑的变化 (A α 線維の痛覚回路への入力) が阻止され、アロディニアが減弱する事を明らかにした。

炎症初期における BDNF の産生増大は、まず、炎症部から産生された神経成長因子 (NGF) が、その高親和性受容体である TrkA を発現した求心性線維の末梢自由終末から取り込まれ、軸索流に乗って後根神経節に運ばれる。次いで、それをトリガーに遺伝子発現に変化が起こって BDNF が産生され、順行性軸索流で脊髄終末部に運ばれ BDNF が後角表層に放出されると考えられている。BDNF が痛覚伝達系における興奮性シナプス伝達を増強させた事から、BDNF は炎症初期に脊髄において痛みの伝達を助長させ、痛覚過敏の程度を増大させると考えられる。現在までの報告から BDNF は TrkB を活性化し、カチオンチャンネルである TRPC3 チャンネル、あるいは TTX 非感受性 Na チャンネル (Nav1.9) を活性化する事が報告されている。本研究で BDNF の作用が、K252a やリドカインにより抑制された事から、BDNF は神経終末部に発現する TrkB を活性化し、次いで TTX 非感受性 Na チャンネルを活性化する。その結果、神経終末部が脱分極してグルタミン酸の放出が促進されたと考えられる。

炎症一週間後に、痛覚伝達系への A β 線維の入力が増加した。これは触覚情報が痛覚伝達系を活性化する事を示しており、触刺激に対して痛みを感じるアロディニアの発現機序を説明するものである。予め抗 BDNF 抗体を投与すると A β 線維の入力が抑制された事から、BDNF は痛覚伝達系可塑性発現の責任分子であると考えられる。炎症時、特に炎症初期に BDNF とその受容体、TrkB との結合を抑制する、あるいは膠様質における興奮性の増大を減弱する事が、アロディニアや種々の慢性疼痛の治療に有効である可能性が示された。

(Journal of Physiology (London). Vol. 569, No. 2, 2005 年 掲載)

論文審査の要旨

報告番号	医研第	608号	氏名	又吉達
審査委員	主査	亀山正樹		
	副査	納光弘		反町勝

Actions of brain-derived neurotrophic factor on the spinal nociceptive transmission during inflammation in the rat.

(炎症ラットにおける脊髄痛覚伝達系可塑的変化に対する脳由来神経栄養因子の作用解析)
(Journal of Physiology (London). 2005, 569.2, 685-695)

脳由来神経栄養因子(BDNF)は、学習や記憶の形成に関与する事が知られているが、脊髄における作用については不明な点が多い。現在まで脊髄後角表層において炎症初期に BDNF の発現が増大し、一週間が経過すると後角表層の痛覚伝達系に可塑的変化が起こり、触を伝える A β 線維が痛覚回路に入力してアロディニア(異痛症)が生じると考えられている。しかし、その機序は未だに明らかにされていない。本研究では、電気生理学的手法を用いて炎症時脊髄痛覚伝達系に対する BDNF の作用機序の解析を目的としている。

本研究では7~9週齢の Sprague-Dawley ラット後肢に、Freunds のアジュバントを注入して作製した炎症モデルの L4-5 レベルの脊髄横断スライスを用いて、後角表層の第II層の膠様質細胞にパッチクランプ法を適用した。膠様質細胞に誘起される自発性の興奮性シナプス後電流(EPSC)および一次求心性線維の後根刺激によって誘起された EPSC を記録した。BDNF など種々の薬物を投与して EPSC の発生頻度および振幅の変化を解析した。また、抗 BDNF 抗体を投与した炎症ラットでも同様に EPSC の記録・解析を行った。Von Frey フィラメントを用いた行動薬理的解析も併せて行なった。

本研究で得られた新知見は次の点である。

1. 炎症初期(2~4日後)にのみ、膠様質内側部で自発性 EPSC の発生頻度の著明な増大が見られた。この作用の発現には BDNF の受容体である TrkB だけでなく、TTX 抵抗性 Na チャンネルである Nav1.9 の存在も必要であった。
2. 抗 BDNF 抗体により痛覚伝達系の可塑的変化(A β 線維の痛覚回路への入力)が阻止されアロディニアが減弱した。

本研究から BDNF は痛覚伝達系可塑性発現の責任分子であると考えられた。炎症初期に BDNF とその受容体、TrkB との結合を抑制する、あるいは膠様質における興奮性の増大を減弱する事がアロディニアや種々の慢性疼痛の治療に有効である可能性が示した。

よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研第	608	号	氏名	又吉 達
審査委員	主 査	亀山 正樹			
	副 査	納 光弘		反町 勝	
<p>主査および副査の3名は、平成18年2月6日、学位請求者 又吉 達に対して、論文の内容について質疑応答を行うとともに、関連事項についての試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、</p> <p>いずれについても満足すべき解答を得ることができた。</p> <p>質問 1) リドカインは Na チャンネルを選択的に抑制するものなのか？ (回答) テトロドトキシン(TTX)で抑制できないものを含めておそらく全ての Na チャンネルを抑制しているものであるため、今回の TTX 抵抗性の Na チャンネルのプロッカーとして使用した。</p> <p>質問 2) リドカイン存在下での miniature EPSCs の発生頻度が他と比べて多いが、リドカイン自体の反応ではないのか？ (回答) Na チャンネルをブロックしているので多少影響していると思われるが、リドカインの影響が安定してから BDNF を投与しているため BDNF の作用を見るには問題ないと考えられる。</p> <p>質問 3) リドカイン 10mM の濃度は濃すぎるのではないか。細胞内に入るのに必要なのか？ (回答) 実験系での灌流速度が速いために高濃度が必要であり、また以前の論文でこの濃度で使用していたため、今回の実験も 10mM の濃度で行った。おそらく細胞内に入るのに必要なためと思われる。</p> <p>質問 4) 触覚の線維である AB 線維が教科書的には痛覚の抑制に関与するとされることについては？ (回答) ゲートコントロールセオリーに関連して書いてあるものと思われる。現在も痛覚の仮説の一つとしては説明されるが、実際には否定的な考えが多い。</p> <p>質問 5) スライドの図には AB 線維の入力が膠様質に書いていないが、実際にはどの程度あるのか。 (回答) 正常状態において約 10% 以下程度の入力があるとされており、今回の実験でも 3.6% であった。</p> <p>質問 6) 炎症 2~4 日のラットを使用した miniature EPSCs では発生頻度が増加しているが、後根刺激でのシナプス性 EPSCs では反応が見られなかった理由はなぜか？ (回答) 反応が見られなかった理由として、伝達物質の release のメカニズムが異なることが考えられる。仮説ではあるが、シナプス終末にある Ca チャンネルが miniature EPSCs とシナプス性 EPSCs とでは関連しているタイプが違っていると考えられている。また miniature EPSCs はシナプスに局限したあるいは多くのシナプスによる反応であるのに対して、シナプス性 EPSCs は後根を刺激にして起こる活動電位の伝導によるものであるため、反応経路が異なることも関連している。</p> <p>質問 7) アジュバント (CFA) を使用した炎症モデルは確立しているものなのか？ (回答) 実験動物に炎症を起こす際に一般的に使用されている。抗原抗体反応によるもので、抗原と併用して体内に注射し、その作用を長期間継続できるとされている。臨床的には関節リウマチに近いモデルとされている。</p> <p>質問 8) 炎症部位でのリンパ球やマクロファージの浸潤はどうなっているのか？ (回答) 炎症を起こした後肢においては増加している。</p> <p>質問 9) 炎症初期において spontaneous EPSCs の増加に関与している神経線維は区別がついているのか？ (回答) 記録細胞全てにおいて spontaneous EPSCs の増加は認められており、その際には後根刺激はしていないために神経線維の分類は行っていなかった。しかし、シナプス性 EPSCs を記録する際の spontaneous EPSCs の増加は線維にかかわらず増加が認められており、特にどの線維という区別はないと判断している。</p>					

質問 10) アロディニアには Aβ 線維の発芽のほかに元来存在している Aδ 線維と C 線維の作用が増強される系も考えられるがその点についてはどう考えるか？

(回答) C 線維の頻度としては炎症モデルも正常ラットも変わりはない。しかし、振幅の大きさを比較すると

有意差ははっきりしないが、以前の研究では炎症ラットのほうが大きかったようである。伝導速度で判断すると Aβ 線維の入力は増加しているが、Aδ 線維の入力の率が減少している。この原因については不明である。また、A 線維を染色する HRP を用いた研究では、炎症時に A 線維の発現量が増えているとされているが、炎症時やその他の損傷時などには HRP は C 線維をも染色するとの報告もあり、元来存在する線維が増強されている可能性は否定できない。

質問 11) 炎症時に BDNF の受容体である TrkB はラットのどの線維に発現しているのか？

(回答) 正常時には BDNF や TrkB は C 線維にのみ発現しているが、炎症時や神経損傷時には A 線維にも発現するとの報告がある。しかし、今回のシナプス性 EPSCs の実験において有意な変化を認めなかったため、実際にどの線維の TrkB に作用したかは断定できない。

質問 12) 線維に発現した TrkB に作用しているのであれば、炎症時に線維の入力の数が変わらないのは矛盾するのではないか？

(回答) 後根神経節(DRG)に TrkB が炎症初期に増加することはわかっているが、元来ある線維に増加しているのか、又は炎症によって惹起された線維に増加しているのかは不明である。

質問 13) 炎症時に末梢で発現した神経成長因子(NGF)はその後軸索流で DRG 細胞体に運ばれ、BDNF 等を産生し、さらに BDNF が神経終末に運ばれるが、NGF は末梢でどの線維に取り込まれているのか？

(回答) 侵害受容線維の中に取り込まれるとあり、おそらく A 線維に取り込まれているのではないかと考えている。

質問 14) アロディニアの機序としている Aβ 線維の発芽としているが、時間経過としてはかなりの時間を要するのではないか。

(回答) 今回の研究では単シナプスの Aβ 線維の入力増加までに一週間要しているが、多シナプス性の入力は炎症モデル作製後 2 日目より見られるとの報告もある。また、炎症後 14 日目には Aβ 線維の入力増加は認められなくなっている。ラットのため時間経過が短いのかもかもしれないが、シナプス線維の入力は 2 日目から起こっていると考えている。

質問 15) TTX 抵抗性の Na チャンネルについて？

(回答) 痛覚伝達に関与しているとされている電位依存性の Na チャンネルであり、TTX 感受性のものと比べてチャンネルの開口の閾値が高く、チャンネルの活性化及び不活性化が比較的遅いという特徴を持っている。Nav1.8 と Nav1.9 が現在知られており、主に DRG に存在されるとされている。しかし、Nav1.9 が痛覚と関係を主として持っていない海馬にも存在しているとあり今後の展開が注目されている。

質問 16) BDNF の作用の positive feedback とはどういうことか？

(回答) BDNF は DRG で末梢からの入力によって activity dependent に発現量が増加することがわかっている。そのため、産生された BDNF が神経前終末に作用してグルタミン酸の放出をさらに増加させているという系を考えている。

質問 17) 炎症時に TrkB が増える機序についてはわかっているのか？

(回答) RT-PCR を用いた研究において炎症 2~4 日に TrkB の発現量が増えることはわかっているが、そのメカニズムについてはわかっていない。

以上の結果から、3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力・識見を十分に具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認めた。