

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大西 毅
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 889 号
学位授与の日付 令和元年 9 月 20 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice
(マウス後肢の血流遮断によって生じる急性の神経活動増強は NO の拡散性によってもたらされる)

論文審査委員 主査 教授 長谷川 功
副査 教授 遠藤 直人
副査 講師 古谷 健太

博士論文の要旨

(背景と目的)

申請者らはこれまでの先行研究で、マウスの末梢の血流遮断後早期より中枢神経系に変化が生じ、神経興奮作用をもたらすことを発見した。この現象は一側の伝導遮断にも関わらず両側性に生じたため、脊髄で産生され、拡散性に富む一酸化窒素 (NO) の関与を想定し、本現象の作用機序を解明すること、またこの中枢神経系の興奮と神経障害性疼痛などの痛みとの関連性について調べることを本研究の目的とした。

(実験方法)

<実験モデルの作成>

マウスをウレタン麻酔後、右後肢に自家製の血圧計を装着し、250 mmHg にて持続的に加圧を行った。また、神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)の関連性を調べるために、nNOS ノックアウトマウスも適宜用いて実験を行った。

<視覚的イメージング法による検証>

ミトコンドリア構成蛋白であるフラビン蛋白が酸化型に変化した際に生じる自家蛍光を捕捉したフラビン蛋白蛍光イメージング法を主に用いて、大脳皮質体性感覚野と脊髄の神経活動を測定した。脊髄で産生された NO を視覚化した実験においてもフラビン蛋白蛍光イメージング法同様に 450-490 nm の青色波長を用いて測定した。

<行動実験による疼痛の検証>

NO 産生による疼痛出現の有無を確認するため、von Frey 試験による誘発痛の評価を行った。基準となる疼痛閾値を測定後に、NO ドナーである NOR3 を髄腔内投与し、閾値の変化を調べた。

<組織学的実験による検証>

申請者らが過去の実験で虚血時の神経活動の変化との関連性を明らかにした II 型代謝型グルタミン酸受容体 (Group II mGluR) と脊髄の nNOS の関連性を調べるため、二重蛍光免疫染色法及び In situ hybridization

法を行った。In situ hybridization では Group II mGluR を構成する受容体である mgluR2 と mgluR3 の RNA を抽出し、nNOS を抗体で染色して調べた。

(結果)

まず、血流遮断時に大脳皮質体性感覚野で起こる神経活動の変化と NO の関連について、フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて検証した。NOS 阻害薬である L-NAME を髄腔内投与したマウスは生理食塩水を投与したマウスと比較して非遮断側の後肢への振動刺激に対する応答が有意に抑制された。さらに、NO 産生に関与する酵素として、神経細胞系に存在する nNOS を想定し、nNOS ノックアウトマウスを用いて同様の実験を行った。その結果、非遮断側への刺激に対して、nNOS ノックアウトマウスでは Wild type マウスと比較して体性感覚野のフラビン蛋白の応答が有意に抑制された。また、同様の神経活動増強は、30 分の虚血後再灌流した後肢への振動刺激に対しても認められた。

次に、血流遮断時に脊髄で起こる神経活動の変化について観察するため、同様の血流遮断モデルを用いて脊髄でのフラビン蛋白蛍光イメージングを観察した。すると、非血流遮断側への振動刺激に対して L-NAME 投与マウスは、生理食塩水投与マウスと比較して有意に応答増強が抑制された。また、nNOS ノックアウトマウスは Wild type マウスと比較して応答増強を認めなかった。これらの結果から、末梢の血流遮断によって脊髄の nNOS 発現により NO が産生され、両側性に神経活動を増強させることが強く示唆された。

次に NO の産生を誘発した際に起こる神経活動について調べるため、NO ドナーである NOR3 を髄腔内投与してフラビン蛋白蛍光イメージング法を行ったところ、体性感覚野の応答増強を認めた。また、同条件において誘発痛を評価する von Frey test を行ったところ、NOR3 を投与したマウスで疼痛閾値が有意に低下した。これらより、NO の存在は神経活動増強と痛覚過敏を引き起こすことが示唆された。

産生された NO についての視覚化実験も行った。NO の蛍光色素である DAF-FM を脊髄固定用ゲルに混注し、マウスの後肢を血流遮断したところ、時間の経過と共に両側の脊髄で蛍光強度が増した。また各測定時間帯で虚血側の光度が非虚血側の光度より有意に強かった。この結果は、血流遮断後虚血側の脊髄で産生された NO が反対側にも拡散していくことを強く示唆した。

最後に、過去の研究で伝導遮断時にその発現が減弱するグループ II 代謝型グルタミン酸受容体(Group II mGluR)と nNOS の関連性について検討した。Group II mGluR のアゴニストである LY354790 を投与したマウスでは DAF-FM 投与後の脊髄の観察において血流遮断時の発光を認めなかった。更に組織学的検討を加えた結果、両物質は共に脊髄後角に存在し、密接に関連する可能性の高いことが蛍光免疫染色法及び In situ hybridization 法で示唆された。両物質の働きは、伝導遮断直後の神経変性や疼痛の誘発に関与する可能性が示唆された。

(考察)

末梢の虚血直後より脊髄で NO が産生され、中枢神経系全体の神経活動を増強させることが分かった。これは、個体サイズの小さいマウス特有の現象ではあるが、伝導遮断直後から生じる NO 拡散の様子を初めて in vivo で捕らえられたことや、処置を加えていない反対側への刺激でも神経活動増強が確認できた一連の流れは、脊髄由来の神経障害性疼痛の発症および作用機序の解明や、新たな疼痛モデル動物の作成につながる可能性があると考えられる。

審査結果の要旨

マウス後肢の血流を片側性に遮断するとその直後から、遮断側に加えて反対側の体性感覚刺激に対して

も過敏行動と脊髄・脳の過剰な応答が認められる。申請者は、この過剰な神経興奮に一酸化窒素(NO)が関与するという仮説を検証した。血流遮断直後から NO 由来の蛍光色素は脊髄で両側性に増加した。フラビン蛋白蛍光イメージングにて遮断後に観測される脳と脊髄の過剰な応答は、神経型 NO 合成酵素 (nNOS) 阻害薬の脊髄への投与や nNOS 遺伝子のノックアウトにより抑制された。さらに、神経障害性疼痛への関与が指摘されるグループ II 代謝型グルタミン酸受容体 (II 型 mGluR) は脊髄後角の浅層において nNOS と同一の細胞体に共局在しており、II 型 mGluR のアゴニスト投与により NO の産生も脊髄の神経応答増強も阻害された。これらの結果から、血流遮断後に II 型 mGluR の機能が失活すると nNOS が活性化、NO が産生され、拡散して脊髄や脳の体性感覚応答が増強する、という機序が示唆された。以上、病変部位を超えて広がる神経因性疼痛の病態に NO が関与する可能性を示した点に、本研究の学位論文としての価値を認める。