

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 歯 学 )	氏名	堀江 佳代
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論 文 題 目			
ウシ由来ラクトフェリンによる顎顔面領域異所性疼痛の抑制機構			
論文審査担当者			
主 査	教授	柴 秀樹	印
審査委員	教授	高田 隆	
審査委員	教授	宿南 知佐	
〔論文審査の要旨〕			
<p>歯科臨床では、顎顔面・口腔領域の慢性疼痛とこれに伴う異所性疼痛が散見される。異所性疼痛は通常使用される鎮痛薬の効果が低いのに加えて原因疾患部位と疼痛発生部位が異なることから、治療がきわめて困難であり、その発生機序も不明である。そこで、異所性疼痛発生機序の解明を目的として、三叉神経切断動物モデルが開発された。一方、慢性疼痛の発生と持続には中枢神経系の支持細胞である神経膠細胞、特に小膠細胞の役割が注目されている。小膠細胞には Toll 様受容体や ATP 受容体を含む様々な膜型受容体が発現している。末梢神経傷害後に、これらの受容体を介して、中枢神経における小膠細胞の細胞内シグナル伝達経路を活性化し、炎症性サイトカインを含む様々な分子を放出することで、慢性疼痛に関与していると考えられている。</p> <p>ラクトフェリンは、母乳、涙、汗、唾液など外分泌液中に含まれる鉄結合性の糖タンパクで、多様な生物学的作用を持つことが知られている。その一つが抗炎症作用であるが、ウシ由来ラクトフェリン (BLF) は低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 1 (LRP1) によって細胞内へ担体輸送され、MAPK p38, NFκB p65 伝達経路を阻害することによって、炎症性サイトカインの分泌を抑制することが報告されている。</p> <p>そこで本研究において、ラットオトガイ神経切断モデルを用いて、BLF の異所性疼痛への鎮痛効果を検証するとともに、その作用機序を明らかにするために、以下の実験が行われた。</p>			

実験動物として、8 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットを用いた。麻酔下にて左側オトガイ神経を切断した。また、薬剤を髄腔内投与するためポリエチレンチューブを髄腔内に留置した。von Frey filament を用いて whisker pad における機械的疼痛逃避行動試験を行い、疼痛閾値を評価した。断頭後、三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Vc) を含む脳組織を摘出しウエスタンプロットで解析した。BLF (20 or 200  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) を髄腔内投与し、疼痛抑制の効果を機械的逃避行動試験で、また p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現変化をウエスタンプロットによって調べた。BLF が細胞内で TRAF6 と結合しているかを確認するために、BLF (200  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) を髄腔内投与後に脳組織を摘出し、TRAF6 で免疫沈降を行った後、BLF の発現を検討した。TLR4 antagonist である LPS-RS (0.02 or 0.2  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ), NF $\kappa$ B p65 阻害薬である Withaferin A (6.3 or 63  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ), p38 阻害薬である SB203580 (1 or 10  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ), IL-18 binding protein (BP; 0.2 or 2  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ) を髄腔内投与し、疼痛抑制の効果を機械的逃避行動試験で調べるとともに、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 等の発現変化をウエスタンプロットで解析した。本研究から得られた結果は下記の 1 から 6 である。

1. BLF を髄腔内投与すると、濃度依存的に異所性疼痛は抑制され、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現増加も抑制された。
2. BLF 髄腔内投与したラットの脳組織に対して抗 TRAF6 抗体で免疫沈降を行ったところ、BLF の発現が認められた。
3. LPS-RS を髄腔内投与すると、濃度依存的に異所性疼痛は抑制され、p-p38, IL-18 の発現増加も抑制された。
4. Withaferin A を髄腔内投与すると、濃度依存的に異所性疼痛は抑制され、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現増加も抑制された。
5. SB203580 を髄腔内投与すると、濃度依存的に異所性疼痛は抑制され、p-p38, IL-18 の発現増加も抑制された。
6. IL-18 BP を髄腔内投与すると、濃度依存的に異所性疼痛は抑制され、IL-18 の発現増加も抑制された。

これらの結果から、オトガイ神経切断後に BLF を髄腔内投与すると、BLF は細胞内に取り込まれた後で TRAF6 と結合することが明らかとなった。この結合によって、TRAF6 より下流の MAPK p38 のシグナル伝達が阻害され、IL-18 の産生が抑制されることが示唆された。BLF は IL-18 の産生を抑制することにより、異所性疼痛を抑制すると考えられた。

以上、BLF は異所性疼痛の有効な治療薬になる可能性が示唆されたことから、審査委員全員は、本論文が博士（歯学）の学位を授与するに十分な価値があることを認めた。