

論文内容要旨

The role of connexin43-gap junction in rat spinal astrocytes
for the regulation of neuropathic pain

(神経因性疼痛に対する脊髄アストロサイト
connexin43-gap junction の役割に関する研究)

主指導教員：仲田 義啓教授
(応用生命科学部門 薬効解析科学)

副指導教員：太田 茂 教授
(応用生命科学部門 生体機能分子動態学)

副指導教員：森岡 徳光准教授
(応用生命科学部門 薬効解析科学)

張 芳芳

(医歯薬学総合研究科 薬学専攻)

神経因性疼痛に対する脊髄アストロサイト connexin43-gap junction の役割に関する研究

平成 23 年度入学 張 芳芳
主指導教員 仲田 義啓

【序論】

痛みの伝達において重要な役割を担う脊髄アストロサイトには、connexin43 (Cx43) タンパクで構成されたgap junctionネットワークが存在し、隣接する細胞を連結させている。これらを介してCa²⁺、cAMPなどの物質を移動させることで、細胞間情報伝達を行い、神経ネットワークに影響を及ぼしている。最近、アストロサイトのCx43-gap junction機能障害が、てんかんや多発性硬化症など様々な中枢神経系疾患と関連していることが示唆されてきた。一方で、神経因性疼痛に対するCx43-gap junction機能変化の関与はほとんど明らかにされていない。そこで、本研究では神経因性疼痛における脊髄アストロサイトCx43-gap junction機能の役割及び培養脊髄アストロサイトにおけるCx43-gap junction発現機能制御について検討を行った。

【実験方法】

- ①神経因性疼痛モデルの作製: 神経因性疼痛モデルマウスは Seltzer らの方法を準拠し、ddy 系雄性マウスの左側大腿部の坐骨神経を部分結紮することにより作製した。
- ②疼痛閾値の変化の測定: von-Frey test により解析した。マウスの足底部を von-Frey filament で刺激 (機械的刺激) することによる疼痛閾値の変化を測定した。
- ③タンパク発現量の解析: Cx43 及び β -actin のタンパク発現量は Western blotting 法により解析した。
- ④Gap junction 機能の測定: gap junction 選択的透過蛍光物質である Lucifer Yellow を用いて Scrape loading dye transfer assay (SLDT assay) により解析した。

【結果及び考察】

1. 神経因性疼痛時での脊髄後角における Cx43 発現変化の解析

神経因性疼痛モデルマウスの機械的刺激に対する疼痛閾値の変化を検討した結果、神経損傷した3日目より少なくとも3週間後まで著明な機械的刺激に対する疼痛閾値の低下(機械的アロディニア)が観察された。これらの脊髄腰髄部後角(結紮側)におけるCx43発現量変化をWestern blotにより検討した結果、結紮1-3週間後においてCx43発現量が無処置群と比較して、有意に低下することが観察された。これらの結果から、脊髄アストロサイトにおけるCx43-gap junction発現の低下が機械的アロディニア誘発に関与している可能性が示唆された。次に、Cx43発現発低下に関与している生体内因子を明らかにするために、神経因性疼痛の誘発因子であるTNF- α に着目した。そこで、神経因性疼痛モデルマウスにTNF- α 阻害剤であるetanercept (10 ng)を連続

投与（神経損傷直後、2、4、6日後）し、神経損傷後14日目における脊髄後角Cx43発現及び機械的アロディニアに対する影響を検討した。その結果、etanerceptにより脊髄後角におけるCx43発現低下及び機械的アロディニアが有意に改善された。さらに、健常マウスの脊髄くも膜下腔内へmouse recombinant TNF- α (20 ng)を投与後の24、48時間において、有意なCx43発現低下及び機械的アロディニアが引き起こされた。これらの結果から、神経損傷によって産生されたTNF- α が脊髄後角Cx43-gap junction発現低下に基づく疼痛感受性の低下に関与している可能性が示唆された。

2. 培養脊髄アストロサイトにおけるCx43-gap junction発現低下機構の解析

次に、培養脊髄アストロサイトを用いてCx43-gap junctionの発現低下メカニズムを明らかにするために、炎症性サイトカインTNF- α 及びIFN- γ の効果を検討した。その結果、TNF- α (10 ng/ml)とIFN- γ (5 ng/ml)の単独及び併用処置によりCx43発現及びgap junction機能が有意に抑制された。さらに、これらの反応はc-jun N-terminal kinase阻害剤であるSP600125 (10 μ M)及びproteasome阻害剤であるMG132 (0.5 μ M)並びにepoxomicin (25 nM)の前処置により抑制された。

【総論】

本研究から、坐骨神経損傷による神経因性疼痛時において脊髄後角で産生されるTNF- α がアストロサイトでのCx43-gap junction発現を低下させ、この反応が疼痛閾値の低下に関与している可能性が示唆された。