

論文内容要旨

論文題目 異所性疼痛に対するウシ由来ラクトフェリンの効果と機序について

学位申請者 堀江 佳代

異所性疼痛とは、原因の神経領域以外での部位に疼痛を発症することである。歯科临床上において、顎顔面領域での異所性疼痛は決して稀ではない。異所性疼痛は慢性疼痛化し、通常の鎮痛薬が奏効しないため、治療がきわめて困難である。慢性疼痛の発生と維持については、中枢神経系の支持細胞である神経膠細胞、とくにマイクログリアが末梢神経損傷後、三叉神経脊髄路核における二次ニューロン付近で活性化することが原因と考えられている。活性化したマイクログリアは炎症性サイトカインなどを分泌誘導し、これら伝達物質が周囲のニューロンの脱分極を調節することで、疼痛伝達に修飾を加えていると考えられている。一方で、ウシ由来ラクトフェリン (BLF) は、細胞内に内分泌したのち、内在性のタンパクである TRAF6 と結合することで、その下流である MAPK p38, NF $\kappa$ B p65 のカスケードを阻害することで、炎症性サイトカインの分泌誘導を抑制し、慢性炎症にたいして有効であるという報告が、2012 年犬伏らによって報告されている。本研究では、BLF の異所性疼痛への効果を明らかにし、その疼痛抑制機序について解明することを目的とし、MAPK p38 経路と、NF $\kappa$ B 経路と IL-1 ファミリーの一つである IL-18 に着目し、解析を行った。

実験動物として、8 週齢 Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、オトガイ神経切断モデルを作成した (MNT)。さらに薬剤髄腔内投与のために、MNT1 週間前に PE-tube を髄腔内に留置した。機械的疼痛逃避行動試験は、von Frey filament を用い、wisker pad を刺激した。この試験は、BASE, post-tube, pre-Drug, 2 hrs, 5 hrs, 24 hrs, 2 days, 3 days, 4 days と予備実験に基づいて疼痛抑制効果が消失するまでの各タイムポイントで行った。また、Vc 付近の p-p65, p-IKKb, p-p38, IL-18, それぞれのタンパク発現を解析するため Westernblot を用いた。最初に、MNT 後 24 hrs, 3 days, 1wks, 3wks, 6wks の各タイムポイントにおいて、p-p65, p-p38, IL-18, LRP1 の発現を確認した。その後、BLF (200  $\mu$ g/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、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 についての発現変化を westernblot 解析にて検討した。

次に、NF $\kappa$ B p65 阻害薬である WWithaferin A (63  $\mu$ g/rat), p38 阻害薬である SB203580 (10  $\mu$ g/rat), IL-18 binding protein (BP) (2  $\mu$ g/rat), TLR4 antagonist である LPS-RS (0.2  $\mu$ g/rat), を髄腔内投与し、同様に疼痛抑制効果を機械的逃避行動試験、タンパク発現の変化を westernblot 解析にて検討した。最後に、脳内での BLF が細胞内で TRAF6 に結合しているかを確認するため

に、BLF (200  $\mu$ g/rat) 髄腔内投与した間脳から延髄までの組織を用い、TRAF6 で免疫沈降を行い、BLF の発現を検討した。

1. MNT 後、24 hrs から 6 wks の長期にわたり、p-p65, p-p38, IL-18 は発現増加しており、LRP1 は全ての条件下で発現確認された。
2. MNT 後の BLF の髄腔内投与は、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現が saline, albumin 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。
3. MNT 後の withaferin A の髄腔内投与は、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。
4. MNT 後の SB203580 の髄腔内投与は p-p38, IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。
5. MNT 後の IL-18 BP の髄腔内投与は、IL-18 の発現が PBS 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。
6. MNT 後の LPS-RS の髄腔内投与は、p-IKKb, p-p65, p-p38, IL-18 の発現が saline 髄腔内投与条件下で増加しているのを抑制し、疼痛抑制効果を認めた。
7. BLF は髄腔内投与後、細胞内に取り込まれ TRAF6 と結合していることが示された。

以上の結果より、MNT 後の異所性疼痛モデルラットに BLF を髄腔内投与すると、BLF は細胞内に取り込まれた後、TRAF6 と複合体を形成し、それより下流の MAPK p38 と NF  $\kappa$  B p65 のシグナル伝達を阻害することで、IL-18 の分泌増加を抑制し、慢性疼痛を抑制すると考えられ、将来的に異所性疼痛の強力な治療薬として有効である可能性が示唆された。