

(第3号様式)

学 位 論 文 要 旨

氏 名 山岡 慎大朗

論 文 名 ラット神経障害性疼痛モデルに対する運動負荷は脊髄後角における Rnf34 と PACAP 発現を抑制することにより鎮痛効果をもたらす

学位論文要旨

【背景】神経の圧迫や変性による痛みである神経障害性疼痛では、筋骨格系の炎症性病変のような非ステロイド性抗炎症薬の効果は弱く、オピオイド受容体作動薬やカルシウムチャネル阻害剤などが使用されるが、痛みはしばしば遷延し、難治性の疼痛となることがある。近年、運動療法により神経障害性疼痛が軽減したとの報告が散見されるが、そのメカニズムは未だ解明されていない。

【目的】神経障害性疼痛モデルを用いて、疼痛のシグナル入力部である脊髄後角浅層での遺伝子発現解析を網羅的に行い、神経障害性疼痛における運動療法による除痛のメカニズムを解明することである。

【方法】6~8週齢の雌 Wister rat を用いて神経因性疼痛モデル Spinal nerve ligation(SNL) model を作製した。全身麻酔下に第5腰椎から第1仙椎レベルで皮膚を正中縦切開し、右 L6 横突起を切除して右 L5 根を結紮し閉創した。SNL model に運動を負荷させた群を exercise 群、運動を負荷しない群を control 群、神経根を結紮しない Sham operation を行った群を Sham 群とした。術後翌日より treadmill による運動負荷を開始した。速度は 10 m/min から開始し、一日 10 分、一日に 1m/min ずつ 20m/min まで速度を増加させ、週に 5 回、術後最大 6 週まで行った。疼痛閾値は von Frey test にて、術前・術後 3 日・1 週、以後 1 週おきに 6 週まで行った。術後 1 週、3 週、6 週に、第 3~5 腰椎レベルの脊髄組織を採取し凍結標本を作製した。レーザーマイクロダイセクション法により脊髄後角浅層を切り出して RNA 抽出を行い、RNA シークエンス(exercise/control, 6w; n=3)および定量的 PCR (exercise/control, 1w. 3w. 6w; n=6) による解析を行った。

【結果】control 群においては、両下肢に疼痛閾値の低下がみられたが、損傷側(右)の疼痛閾値は反対側(左)と比較し術後 3 日目より 6 週目まで有意に低下していた。一方 Sham 群では疼痛閾値の低下を認めなかった。運動負荷の効果としては、exercise 群、control 群ともに損傷側において術後 3 日目より疼痛閾値の低下を認め、control 群では 6 週まで同じレベルの疼痛閾値低下が継続していたが、exercise 群においては術後 3 週目以後で疼痛閾値の有意な改善がみられた。術後 6 週目の RNA シークエンスの結果、17314 遺伝子の RNA 配列が同定された。そのうち、Exercise 群において control 群よりも有意に発現上昇していたものが 241 遺伝子、有意に減少していたものが 258 遺伝子であった。Exercise 群において発現上昇がみら

れた遺伝子のうち、海馬・脊髄に関連するものが 17 遺伝子、発現減少を示したもののうち脳に関連するものが 49 遺伝子であった。これらの遺伝子のうち、運動療法による疼痛改善に関与すると考えられる候補遺伝子として Rnf34 と Pacap に着目し、RT-PCR によって両群間の遺伝子発現変化を定量した。Rnf34 の発現は、術後 1 週目では両群間で有意差は認めなかったが、術後 3 週目において exercise 群で有意な減少を認めた。術後 6 週では両群間に差は認めなかった。Pacap の発現は、1 週目で exercise 群での発現量は有意に上昇したが、3 週目では逆に有意に減少した。6 週目においても exercise 群で発現量は減少していたが、両群間に有意な差は認めなかった。

【考察】SNL ラットの脊髄後角において運動負荷は RNF34 と PACAP の mRNA の発現低下をもたらした。RNF34 はユビキチン化を介して GABAA 受容体の $\gamma 2$ サブユニットの分解を促進して GABA の鎮痛作用を弱め、痛みを増強することが報告されている。本研究で示した RNF34 発現抑制は、痛みのシグナルを抑制する GABA の作用を増強することとなり、運動療法の鎮痛作用のメカニズムの一部を説明しうるものである。また PACAP は、脊髄後角や DRG に存在し、神経障害モデルで発現上昇し、さらに PACAP の阻害剤が痛みを抑制することが報告されている。本研究で運動負荷により 3 週間以後で PACAP の遺伝子発現が低下していることは、PACAP の抑制が運動負荷の鎮痛効果に関与した可能性が示唆された。

脊髄後角における Rnf34 と Pacap 発現低下は、運動療法の効果メカニズムに関与している事が示唆された。

キーワード (3~5)	神経障害性疼痛 SNLモデル 運動療法 レーザーマイクロダイセクション RNAシーケンス
-------------	--