

学位論文審査結果の要旨

氏名	山岡 慎大朗
審査委員	主査 大八木 保政 副査 國枝 武治 副査 松井 誠司 副査 西川 典子 副査 林 康人

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
審査結果の要旨 (2,000 字以内)

神経の圧迫や変性による神経障害性疼痛では、一般的な非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)の効果は乏しく、しばしば難治性疼痛が持続する。近年、運動療法による神経障害性疼痛の軽減の報告が散見されるが、その有効性のメカニズムは不明である。本研究は、ラットの神経障害性疼痛モデルを作成し、疼痛のシグナル入力部である脊髄後角浅層の遺伝子発現を網羅的に解析し、運動療法による疼痛の軽減メカニズムの解明を試みるものである。

6~8 週齢の雌 Wistar rat を用いて神経因性疼痛モデルである Spinal nerve ligation (SNL) を作製した。全身麻酔下に第 5 腰椎から第 1 仙椎レベルで切開し、右 L5 神経根を結紮し閉創した。SNL モデルに運動負荷を加えた exercise 群、運動負荷のない control 群、神経根結紮のない Sham operation (Sham) 群に分けた。手術翌日よりトレッドミル運動負荷を開始し、5 回/週で最大 6 週まで実施した。疼痛閾値は von Frey test にて経時的に解析し、術後 1 週、3 週、6 週に、第 3~5 腰椎レベルの脊髄組織の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 を抽出し、RNA シークエンス法および定量的 RT-PCR 法による解析を行った。

control 群では両下肢の疼痛閾値の低下が見られ、損傷側(右)は反対側(左)と比べて有意に低下していた。Sham 群では疼痛閾値の低下はなかった。また、exercise 群では術後 3 週目以降で疼痛閾値の有意な改善が見られた。さらに、術後 6 週目の RNA シークエンスの結果、同定された 17314 遺伝子のうち、exercise 群で 241 遺伝子の発現上昇および 258 遺伝子の発現低

下が認められた。これらのうち、その機能から疼痛改善に関与する候補遺伝子として Rnf34 と Pacap に着目し、RT-PCR でその発現を定量的に解析した。両者とも術後 3 週目の exercise 群で有意な低下が認められた。

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、GABA の鎮痛作用を弱めることで疼痛を増強する可能性が推察される。また、Pacap は脊髄後角や後根神経節に存在するが、その拮抗薬はアロディニアを抑制することが報告されている。したがって、運動療法による疼痛緩和効果には、脊髄後角における Rnf34 および Pacap の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

審査会は平成 29 年 1 月 10 日に開催され、本研究の発表において、審査員から以下の質問が出された。

1. 手術直後に疼痛の閾値が急に下がるのはラットがその刺激に慣れていないためではないのか。
2. 脊髄後角組織を採取しているのは、二次ニューロンを解析するためか。
3. RNF34 の発現低下は GABA 作動性ニューロンへの影響が考えられるのか。
4. この疼痛モデルは短期に生じるアロディニアを想定しているのか。
5. 運動療法は脊髄神経の過敏性を抑制しているのではないか。
6. さらに末梢神経側の要因も解析する必要はないか。
7. 運動療法としては、自動的運動や他動的運動による違いはないか。
8. 神経根の結紮の程度は一定しているのか。手技的に個体差などはないか。
9. 手術直後に疼痛閾値が下がるのは手術侵襲による影響ではないか。その点の考察も必要では。
10. トレッドミル以外の運動療法の手段はないのか。
11. 刺激を与えて閾値を測定するだけでなく、自発痛の評価は可能か。
12. 動物実験の倫理的配慮をどう考えているか。
13. 遺伝子発現の低下に、手術側と非手術側の左右差がないのはなぜか。
14. 運動負荷療法は、人間で考えるとどの程度の運動刺激と考えられるのか。
15. RT-PCR 以外にも免疫染色や *in situ hybridization* など別の方法で確認する必要はないか。
16. 運動療法の負荷量や治療期間の違う群で、治療効果の程度を比較することは可能か。
17. 脊髄性の疼痛にはミクログリアやサイトカインも関係する可能性があるが、本モデルの既報告などではミクログリアの変化などは調べられてないのか。

以上、各審査委員は論文内容のみならず、その関連領域を含めた幅広い質問を行い、申請者は各質問に対して明確に回答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。