

## 論文内容の要旨

論文提出者氏名 山口 陽輔

論文題目 Endoplasmic reticulum stress in the dorsal root ganglion contributes to the development of pain hypersensitivity after nerve injury

### 論文内容の要旨

【背景】末梢神経の機械的損傷は神経障害性疼痛の原因の一つである。障害神経ならびに隣接する障害されていない神経に生じる過剰な神経興奮は神経損傷による痛覚過敏の発症に寄与する。

細胞に機械的、代謝的な障害が生じると、小胞体(ER)では unfolded protein response とよばれる ER ストレス反応を生じる。中枢神経系では、ER ストレスが神経変性疾患の発症に関与し、末梢神経系では糖尿病性ニューロパチーや軸索損傷後の神経再生に係わっている。

一方、ER ストレスが神経損傷後の痛覚過敏の発症に果たす役割についてはよく知られていない。今回我々は、末梢神経の損傷により ER ストレスが一次知覚神経に生じ、痛覚過敏の発症に関与するという仮説を立てた。この仮説を検証するため、末梢神経損傷後痛覚過敏のモデルであるラット Spinal nerve ligation (SNL) モデルにおける第 4 および第 5 腰髄後根神経節 (L4, L5-DRG) における ER ストレスマーカーの発現を調査した。また ER ストレス阻害剤または ER ストレス誘導剤を使用し、疼痛閾値に変化が生じるか調査した。

【方法】雄性 Sprague-Dawley ラットを用い、第 6 腰椎横突起を切除、L4, L5 神経を露出し、L5 神経を絹糸で結紮する SNL モデルを作成した。

SNL 処置前(day0)、SNL 処置後 1、3、7 日 (day1、day3、day7) における L4、L5 DRG における ER ストレスマーカー (GRP78、CHOP、XBP-1) の mRNA 発現を Real time-(RT) PCR で定量した。また ER ストレスマーカータンパクの発現を免疫組織化学法および Western Blotting 法により調査した。

また、SNL モデルラットに ER ストレス阻害剤である Salubrinal を腹腔内投与し、CHOP mRNA の発現の変化と痛覚閾値の変化を調べた。また ER ストレスを誘導する Tunicamycin を L5 DRG に局所投与し、GRP78 の発現変化と痛覚閾値を調べた。痛覚閾値は、Von Frey フィラメント (機械刺激) と、Radiant heat (熱刺激) およびアセトン刺激 (冷刺激) に対する逃避行動を観察し評価した。

【結果】RT-PCRの結果、L5 DRG では day1 において GRP78 と CHOP mRNA の発現が有意に増加し、day3 では前値まで低下した。XBP-1 mRNA は day3 で有意な発現の増加を認め、day7 では前値まで低下した。L4 DRG における GRP78、CHOP および XBP-1 の発現は変化を認めなかった。免疫組織化学法では GRP78、CHOP の発現は day1 において有意に増加し、XBP-1 は day1 day3 で有意に増加した。Day1 における GRP78 の発現増加は Western Blotting 法による解析においても認められた。

行動解析の結果、SNL 作成後 day3-7 で機械刺激に対する痛覚閾値の低下を認めた。SNL モデルに Salubrinal を投与した群では、SNL に Vehicle を投与した群に比べ day3-7 において痛覚過敏は抑制された。熱刺激、冷刺激では SNL 作成後 day1-7 において痛覚閾値が低下したが、Salubrinal 投与群では day1-5 において SNL による閾値の低下は認めなかった。Salubrinal 群では CHOP mRNA の発現は有意に低下していた。

Tunicamycin の DRG への局所投与では投与後 2 時間で機械刺激、熱刺激、冷刺激ともに痛覚閾値が低下した。また、Tunicamycin 投与により DRG では GRP78 mRNA の発現が増加し、ER ストレスが誘導されることを確認した。

【考察】本研究では SNL モデルにおいて神経損傷後に一過性の ER ストレスが生じることが明らかにされた。SNL モデルでは L5 だけでなく L4 DRG ニューロンでも神経活動に変化が認められるが、ER ストレスマーカーの増加は L5 でのみ確認され、L4 では変化を認めなかった。これは L5 DRG ニューロンは直接損傷されているのに対し、L4 DRG では炎症性の変化が生じているという刺激の違いを表していると考えられる。

また Salubrinal により ER ストレスを抑制すると SNL モデルにおける痛覚過敏は軽減され、DRG に ER ストレスを誘導すると痛覚過敏を生じることから、神経損傷後に DRG に生じた ER ストレスは痛覚過敏を引き起こし、神経障害性疼痛の発症に関与している可能性を示している。しかしながら、Salubrinal は神経損傷後の痛覚過敏を完全には抑制しなかった。これは、神経損傷後の ER ストレスが一過性であること、L4 DRG では ER ストレスは生じず、L4 における神経活動の亢進には ER ストレスが関与しないこと、脊髄後角に生じるグリア細胞の活性化など、より上位の知覚神経系に生じる変化には ER ストレスが関与しない可能性があることなどが理由として考えられる。

【結語】神経損傷により、一過性の ER ストレスが一次知覚神経に生じることが示された。一次知覚神経の ER ストレスは神経損傷後の痛覚過敏の発症に関与しており、ER ストレスを制御することが神経障害性疼痛の治療法となりうる可能性が示された。