

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10939

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における下行性ドーパミン作動神経系の変調

研究課題名(英文) Modulation of descending dopaminergic nerve system in the neuropathic pain

研究代表者

谷口 亘 (Taniguchi, Wataru)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20453194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経障害性疼痛モデルラットにおける脊髄後角の興奮性シナプス伝達に対するドーパミンの影響をホールセル・パッチクランプ法を用いて検討した。神経障害性疼痛モデルラットではD2-like受容体作動薬であるキンピロールを投与すると、正常ラットに比べて内向きの電流が生じる確率が増加した。この内向き電流は脊髄後角細胞の脱分極が痛みの促進につながることを示している。今回の研究成果から神経障害性疼痛時にはD2-like受容体の役割が本来の疼痛抑制を担う細胞の過分極から疼痛賦活になる細胞脱分極を形成するように何らかの変調を来している可能性があると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A11領域から脊髄後角に投射しているドーパミン作動神経系は本来生理的条件下では下行性疼痛抑制系を形成しているが、今回の研究成果から神経障害性疼痛時にはD2-like受容体の役割が本来の疼痛抑制を担う細胞の過分極から疼痛賦活になる細胞脱分極を形成するように何らかの変調を来している可能性があると考えられる。このことは神経障害性疼痛の状況下では、生理的に備わる下行性疼痛抑制を賦活する方法での疼痛コントロールが難しい側面を有していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The periventricular, posterior region (A11) of the hypothalamus is the principle source of descending dopaminergic pathways. Previously, we reported the actions of dopamine (DA) on dorsal horn neurons as a descending inhibitory system based on in vivo whole-cell patch-clamp methods. However, some studies have recently demonstrated that DA facilitates pain in the neuropathic pain model. In the present study, we investigated the effect of DA on excitatory synaptic transmission in the dorsal horn of the rat spinal cord using whole-cell patch-clamp methods. In the neuropathic pain model rats, quinpirole, a D2-like receptor agonist, frequently produced inward currents compared to that in normal rats. Inward currents indicate that depolarization of the dorsal horn neurons lead the pain facilitation. These results suggest that DA-induced effects in the dorsal horn might modulate the descending inhibitory system to the descending facilitatory system in neuropathic pain.

研究分野：疼痛医学

キーワード：ドーパミン 脊髄後角 パッチクランプ法 D1-like受容体 D2-like受容体 神経障害性疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

内因性鎮痛機構の一つに下行性疼痛抑制系があり、ノルアドレナリン作動神経系、セロトニン作動神経系がその役割を担っていることはよく知られている^{1,2,3)}。さらにノルアドレナリンの前駆物質であるドーパミンにも脊髄後角内において疼痛の抑制効果があることをこれまで我々の研究グループは報告してきた。この作用は視床下部 A11 から脊髄に投射される視床下部脊髄路からなるドーパミン作動神経系によるものであり、第3の下行性疼痛抑制系の機能を有することを以前に報告した⁴⁾。脊髄膠様質細胞に *in vivo* パッチクランプ法を適用し、ドーパミンを脊髄に灌流投与すると外向き電流の発生ならびに興奮性シナプス後電流の抑制が観察されること、末梢皮膚刺激に対して抑制効果を有すること、これらの効果は D2-like 受容体の活性化を介することを明らかにした。さらにこれらの効果は視床下部の後部 A11 を電気刺激することで再現されることを確認している。近年、ドーパミン作動神経系による下行性疼痛抑制系は既知のノルアドレナリンやセロトニン作動神経系のものとは違い、いまだ教科書レベルには採用されていないが、徐々に第3の下行性疼痛抑制系として認識されてきて、この経路が新たな鎮痛ターゲットになりえるというレビュー⁵⁾が報告された。一方で、近年、神経障害性疼痛においてドーパミン受容体のうち、D1,5 からなるもう一つのサブタイプ D1-like 受容体がドーパミンに反応し、正常時とは異なり、疼痛を増強させているという報告^{6,7,8)}も散見されるようになった。

2. 研究の目的

前述のように本来、生理的条件下では下行性疼痛抑制系を形成すべきドーパミン作動神経系が神経障害性疼痛時には D2-like 受容体から D1-like 受容体が優位になることで疼痛賦活系に変調をきたしている可能性がある。そこで今回、我々は神経障害性疼痛モデルラットを作成し、このモデルラットから取り出した脊髄スライスにパッチクランプ法を適用し、脊髄膠様質ニューロンのドーパミン、D1-like 受容体選択的作動薬、D2-like 受容体選択的作動薬に対する反応でどのように膜電位が変化したか解析を行った。さらに同様に正常ラットにおけるドーパミン、D1-like 受容体選択的作動薬、D2-like 受容体選択的作動薬に対する反応も解析し、神経傷害性疼痛モデルラットと比較することでドーパミン作動神経系がどのように変調したのかを解析した。

3. 研究の方法

本実験計画は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

(1) 脊髄横断スライス標本の作製

脊髄横断スライス標本は、Nakatsuka らの方法⁹⁾に従って作成した。5~6 週齢の Sprague Dawley 系成熟雄性ラットにウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg) で深麻酔後、背側の胸腰椎部に皮切を行った。エピネフリン添加 0.5%キシロカイン液を棘突起の両側に局注後、傍脊筋筋群を切離し脊椎を露出した。中位胸椎から下位腰椎まで椎弓切除を行った。神経根を切離しながら脊髄を摘出し、酸素負荷した 2~4 の人工脳脊髄液に浸した。摘出した脊髄を実体顕微鏡下に硬膜、前根、後根、クモ膜及び軟膜を除去し、溝を設けた寒天ブロックに設置した。マイクロスライサー (堂阪イーエム社 DTK 1000) を用いて厚さ約 650 μm の脊髄横断スライス標本を作製した。腰膨大部の脊髄スライスを記録用チャンパーに移し、グリッドにて上方から軽く固定した後、酸素負荷した人工脳脊髄液で還流した。人工脳脊髄液の組成は、NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO₃ 25 mM であった。

(2) 脊髄膠様質ニューロンからのパッチクランプ記録

膠様質は、脊髄スライスに下方から透過光を当て、実体顕微鏡下 (20~40 倍) において観察すると後角の灰白質部表層に位置する半透明なバンド状として視認できる。膠様質細胞からブライントド・ホールセル・パッチクランプ法により膜電位固定下で膜電流記録を行った。ガラス電極は、入力抵抗が 8~15 M Ω のものを用い、その内液組成は potassium gluconate 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM, and HEPES-KOH 5 mM であった。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行った。記録は -70mV の保持膜電位で記録し、得られた応答はパッチクランプ用増幅器 (Molecular Devices 社 Axopatch200B) により増幅され、A/D 変換 (Molecular Devices 社 Digidata 1440A) 後、データ記録及び解析用ソフトウェア (Molecular Devices 社 pClamp10) を用いてコンピュータにより記録・解析した。5 pA 以上の膜電位の変化を有意とした。実験結果は平均 \pm 標準誤差で表した。各試薬に対する膜電位の反応の有無をカイ 2 乗検定で検定した。危険率 5% ($P < 0.05$) をもって有意と判定した。括弧内の n の値は記録した細胞数である。

(3) 末梢神経障害モデルの作製

末梢神経障害モデルには spare nerve injury (SNI) モデルを使用した。坐骨神経の分岐の内、腓腹神経を残し、総腓骨神経、脛骨神経を 6-0 絹糸で結紮、切断した。処置後、機械的刺激過敏が発生しているのを確認し、7-10 日後で実験に使用した。

4. 研究成果

正常ラットにおいて脊髄膠様質ニューロンにパッチクランプ法を適用し、-70mV の電位固定で

それぞれの薬剤に対する膜電位の変化を観察した。脊髄スライスに灌流投与する試薬にはそれぞれドーパミン (100 μ M)、D2-like 受容体選択的作動薬の quinpirole (100 μ M)、D1-like 受容体選択的作動薬の SKF38393 (100 μ M) を用いた。脊髄膠様質ニューロンにおいては典型的な場合、ドーパミンと quinpirole により細胞の過分極を示す外向き電流 (基線が山型に上方にはね上がる変化) を、SKF38393 により細胞の脱分極を示す内向き電流 (基線が谷型に下方に下がる変化) を示した。一方、ドーパミンによる内向き電流を示すパターンも約 26% に認められた。正常ラットにおいてドーパミン、quinpirole、SKF38393 に対して 5 pA 以上の外向き電流、内向き電流の反応を示した割合、おそびその振幅の平均は表 1 に示す通りであった。SNI ラットにおいてドーパミン、quinpirole、SKF38393 に対して 5 pA 以上の外向き電流、内向き電流の反応を示した割合、おそびその振幅の平均は表 2 に示す通りであった。この中で D2-like 受容体選択的作動薬の quinpirole に対する反応が正常ラットと比較すると外向き電流を発生するニューロンが減少し、内向き電流を発生する率が 21.4% から 42.3% にほぼ倍増し、その振幅も -13.4 pA から -29.7 pA に増強していたが、カイ 2 乗検定上は内向き電流の発生率に関して正常ラット群と SNI ラット群に有意差は生じなかった ($P = 0.40$)。この内向き電流は脊髄後角細胞の脱分極が痛みの促進につながることを示している。今回の研究成果から神経障害性疼痛時には D2-like 受容体の役割が本来の疼痛抑制を担う細胞の過分極から疼痛賦活になる細胞脱分極を形成するように何らかの変調を来している可能性があると考えられる。

表1) Normal rats

	outward current (> 5 pA)	no response ($-5 \sim 5$ pA)	inward current (< -5 pA)
Dopamine (n = 19)	42.1% 11.1 \pm 1.7 pA	31.6% 0.35 \pm 1.2 pA	26.3% -13.1 \pm 2.4 pA
quinpirole (n = 14)	42.9% 10.6 \pm 3.1 pA	35.7% -2.1 \pm 0.7 pA	21.4% -13.4 \pm 4.8 pA
SKF38393 (n = 21)	19.0% 8.9 \pm 1.8 pA	19.0% -1.2 \pm 2.1 pA	62.0% -11.1 \pm 2.1 pA

表2) SNI rats

	outward current (> 5 pA)	no response ($-5 \sim 5$ pA)	inward current (< -5 pA)
Dopamine (n = 24)	45.8% 8.9 \pm 0.9 pA	20.8% 2.8 \pm 0.5 pA	33.3% -11.7 \pm 3.5 pA
quinpirole (n = 26)	30.8% 14.2 \pm 3.4 pA	26.9% -0.8 \pm 1.2 pA	42.3% -29.7 \pm 13.8 pA
SKF38393 (n = 23)	13.0% 11.0 \pm 4.4 pA	30.4% 1.8 \pm 0.7 pA	56.5% -20.0 \pm 6.6 pA

< 引用文献 >

【文献】

- 1) Millan MJ : Descending control of pain. Prog Neurobiol 66 : 355-474, 2002
- 2) Sandkuhler J : The organization and function of endogenous antinociceptive systems. Prog Neurobiol 50 : 49-81, 1996
- 3) Yoshimura M, Furue H : Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. J Pharmacol Sci 101 : 107-117, 2006
- 4) Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, et al : In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. Pain 152 : 95-105, 2011
- 5) Puopolo M : The hypothalamic-spinal dopaminergic system: a target for pain modulation. Neural Regen Res 14 : 925-930, 2019
- 6) Yang HW, Zhou LJ, Hu NW, et al : Activation of spinal d1/d5 receptors induces late-phase LTP of C-fiber-evoked field potentials in rat spinal dorsal horn. J Neurophysiol 94 : 961-967, 2005
- 7) Kim JY, Tillu DV, Quinn TL, et al : Spinal dopaminergic projections control the transition to pathological pain plasticity via a D1/D5-mediated mechanism. J Neurosci 35 6307-6317, 2015
- 8) Aira Z, Barrenetxea T, Buesa I, et al : Spinal D1-like dopamine receptors modulate NMDA receptor-induced hyperexcitability and NR1 subunit phosphorylation at serine 889. Neurosci Lett 618:152-158, 2016.
- 9) Nakatsuka T, Park JS, Kumamoto E, et al : Plastic changes in sensory inputs to rat substantia gelatinosa neurons following peripheral inflammation. Pain 47 : 82:39-47, 1999
- 10) 阪中淳也, 中塚映政, 宮崎展行, 他 : ドーパミンによる脊髄運動ニューロンの制御機構. 脊髄機能診断学 30 : 42-48, 2008

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 谷口亘, 中塚映政	4. 巻 6
2. 論文標題 【運動器疼痛update】 痛みと神経メカニズム	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 関節外科	6. 最初と最後の頁 37
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曽根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田	4. 巻 41
2. 論文標題 神経障害性疼痛モデルラットにおける脊髄後角内ドーパミン作動ニューロンの変調	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 脊髄機能診断	6. 最初と最後の頁 20-24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷口亘, 西尾尚子, 山中学, 曽根勝真弓, 太地良, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルラットにおける脊髄後角内ドーパミン作動ニューロンの変調
3. 学会等名 第41回脊髄機能診断研究会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	西尾 尚子 (Nishio Naoko) (40648359)	和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------