

令和 元年 6 月 24 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16725

研究課題名（和文）アラニンの脊髄後角における鎮痛作用機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of analgesic mechanism in spinal dorsal horn of beta-alanine

研究代表者

清野 豊 (Seino, Yutaka)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：50771200

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではラットを用いて、アラニンの脊髄後角における電気生理学的実験を行った。アラニンが脊髄後角において抑制性シナプス伝達に関与していることを突き止めた。またこの作用には、濃度依存性があることをつきとめた。関与している受容体についても調査を行い、アラニンはCl⁻イオンチャネルを介して作用する点、GABA_A受容体には関与せず、グリシン受容体を介している点を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、アラニンが抑制性シナプス伝達に関与しており、脊髄後角において鎮痛制御に関与している可能性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed electrophysiological experiments in the spinal dorsal horn of β -alanine. We found that β -alanine is involved in inhibitory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. We also found that this effect was concentration dependent. We also investigated the receptors involved, and revealed that β -alanine acts through the Cl⁻ channel, and that it is not involved in the GABA_A receptor but through the glycine receptor.

研究分野：麻酔科学

キーワード：アラニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みや痒みは、時に日常生活を大きく障害する不快な感覚である。これまで、多くの痛みや痒みに関連した機序や関与する受容体が解明され、治療薬が開発されてきた。しかしその全ての機序は解明されておらず、現在も原因不明の痛みや痒みで苦しんでいる患者は多数存在する。

アラニンは、近年新たな痒みの発生機序に深く関与していることがわかった、Mas 関連 G 蛋白共役型受容体 (Mas-Related G Protein Coupled Receptor: Mrgpcr) ファミリーのうち、MrgpcrD の内因性リガンドである。Mrgpcr ファミリーは、脊髄後根神経節 (DRG) 内に特異的に存在し、ヒスタミン受容体を介さない新規の機序で、痒みに関与していることが発見されたが、この中でも特に、アラニンを内因性リガンドにもつ MrgpcrD は、皮膚の顆粒細胞層に特異的に発現しており、表皮の痒みと深く関連することがわかった。実際に人の表皮にアラニンを皮下注射すると痒みを誘発することも報告され、アラニンは表皮での新たな鎮痒薬開発の起点として注目されているアミノ酸である。

一方で、Mrgpcr ファミリーを発現する一次求心性感覚ニューロンは、脊髄後角に神経終末をもつ。脊髄後角は、痛みの伝達経路として重要な機能を果たす場所であり、Mrgpcr ファミリーは、痒みだけでなく痛みの調節にも関与していることが推察される。実際に一部の Mrgpcr ファミリーの内因性リガンドを脊髄内に投与すると、鎮痛作用を得られたとする動物実験の報告もあることから、Mrgpcr ファミリーの中には、脊髄後角へ直接作用し、鎮痛効果を発揮するものがあることがわかってきている。つまり、MrgpcrD の内因性リガンドであるアラニンも、脊髄内で直接の鎮痛作用を発揮している可能性がある。

アラニンが脊髄伝導路において、痛覚制御に関与している可能性は、構造学的な面からも推察される。構造学的に、アミノ酸であるアラニンは、アミノ酸であるグリシンと、アミノ酪酸である GABA の中間体である。グリシンと GABA は、中枢神経系において重要な抑制性シナプス伝達物質であり、両者の中間に位置するアラニンも抑制性シナプス伝達物質として関与していることが推察される。更に、アラニンは人の体内に天然に存在し、脳脊髄液中にも広く分布している。海馬や小脳では特にアラニンの分布が多いといった報告や、動物実験で脳内にアラニントランスポーターの存在も確認されている。海馬では抑制性シナプス伝達物質に関与しているといった報告もあり、中枢神経系において、アラニンが神経伝達物質として関与している可能性を示している。

以上の様々な研究結果から、アラニンは脊髄後角で鎮痛制御に関与している可能性があると考えられるが、現在のところアラニンが脊髄内の痛覚伝導路へ作用し、鎮痛制御に関与しているかどうかは明らかになっていない。

申請者の教室では、これまで多くの薬物の痛覚伝導路における作用機序を、電気生理学的手法を用いて解明してきた。上記の経過から、申請者はアラニンが脊髄痛覚伝導路において痛覚制御に作用しているのではないかと考え、電気生理学的な予備的実験を行った。ラットの脊髄後角第 1 層ニューロンへアラニンを灌流投与したところ、0 mV の膜電位固定下において外向き電流を誘起するがわかった。この結果から、アラニンは脊髄後角において抑制性シナプス伝達に関与していることが推察された。

2. 研究の目的

本研究は、アラニンの脊髄後角における鎮痛制御作用を詳細に解明することを目的とする。行動学的実験と電気生理学実験を用い、アラニンの新たな側面として、脊髄痛覚伝導路の鎮痛制御に関与しているかどうかを解明することを目的とした。

3. 研究の方法

【平成 29 年度】

神経障害性疼痛モデルラットを用いた行動学的実験により、アラニンの脊髄も膜下投与により痛み行動が低下することを確認する。続いて、正常ラットの脊髄スライス標本を用いて、脊髄後角ニューロンからホールセルパッチクランプ法で電気生理学的記録を行い、アラニン誘起電流について、どの受容体やイオンチャネルを介した反応かを解析する。更に、一次求心性繊維からの疼痛伝達への関与を検討する。

【平成 30 年度以降】神経障害性痛モデルラットを用い、正常ラットと同様の電気生理学実験を行い、違いについて検討する。

【平成 29 年度】

神経障害性疼痛モデルラットを用いた行動学的実験

<方法>

まず、神経障害性疼痛モデルラットを用いて、アラニンに鎮痛作用があることを行動学的に証明する。

○神経障害性疼痛モデルラットの作成

雄性成熟ラット (生後 6 週以上) を使用する。神経障害性痛モデルとして坐骨神経絞扼モデル (chronic constriction injury: CCI モデル) を作成する。イソフルラン麻酔下に、皮膚を大腿骨下縁に沿って約 1 cm 切開し、坐骨神経を露出する。実体顕微鏡下に 4 カ所、4-0 絹糸で軽く結紮する。術後に患肢と健常肢それぞれに von Frey テストを施行し、神経障害性疼痛モデルラッ

トであることを確認する。

○行動学的実験

上記の手順で作成した神経障害性疼痛モデルラットを用いる。ラットに アラニンをくも膜下投与し、自発痛及び誘発痛の変化を解析する。

<計画>

くも膜下投与は、吸入麻酔下に腰部(L4/5)からポリエチレンカテーテルを留置する。カテーテルより アラニンを投与し、投与前、投与 15 分、30 分、60 分、120 分の各時点で、自発痛、誘発痛を計測する。対照群(生理食塩水をくも膜下カテーテルから同量注入したもの)でも同様の実験を行い比較検討する。

自発痛に対する評価は、足をなめる、足を振り回すといった行動の回数や持続時間で行う。誘発痛に対する評価は、von Frey 法による機械的刺激、hot plate 法による熱刺激に対する痛み閾値を測定することで行う。

脊髄標本スライスを用いた電気生理学的実験

<方法>

○脊髄スライス標本の作製とパッチクランプ記録

雄性成熟ラット(生後 6 週以上)をウレタン麻酔下(1.5g/kg, 腹腔内投与)に腰仙部脊髄を摘出する。溝を設けた寒天ブロックに脊髄を移し、マイクロスライサーを用いて厚さ約 650 μm の脊髄横断スライス標本を作成する。ガラス微小電極を脊髄後角ニューロンに誘導し、ホールセルパッチクランプ記録を行う。得られた電流は、パッチクランプ用増幅器:Axopatch 200B により増幅し、コンピュータに記録後、データ解析用ソフトウェア:pCLAMP10.4(Molecular Devices)を用いて解析する。

○電気生理学的実験

<計画>

容量反応曲線の解析

アラニンの指摘濃度決定のため、用量反応曲線を作成する。膜電位を 0 mV に固定して、投与する アラニンの濃度を 0.01 mM ~ 30 mM まで変化させ、用量反応曲線を作成する。

関与するイオンチャネルの特定

保持膜電位を -90 mV から -70 mV まで変化させ、アラニン誘起電流の逆転電位を検討し、関与するイオンチャネルを特定する。

関与する受容体の特定

アラニン誘起電流が、GABA_A 受容体、グリシン受容体を介した反応であることが予想されるため、膜電位を 0 mV に固定し、GABA_A 受容体、グリシン受容体アンタゴニスト投与によってアラニン誘起電流の変化を観察することで、関与する受容体の特定を行う。

誘発性 EPSC に対する影響

関与する一次求心性繊維を同定するため、保持膜電位を静止膜電位付近に固定し、吸引電極による脊髄後根電気刺激で誘発される誘発性興奮性シナプス後電流に対して、アラニンが与える影響を検討する。

【平成 30 年度以降】

前項の手順で作成した神経障害性疼痛モデルラットを用いて、上記の ~ と同様の電気生理学的実験を行い、比較検討する。

4 . 研究成果

アラニンは脊髄後角において、グリシン受容体を選択的に活性化させ、Cl⁻チャネルを開口させる。それにより、後角ニューロンは過分極し、膜の興奮性を低下させることが明らかになった。アラニンはグリシンと同じく抑制性神経伝達的作用を有しており、脊髄痛覚伝導路において鎮痛作用に関与している可能性を明らかにした。

5 . 主な発表論文等

Seino Yutaka, Ohashi Nobuko, Kohno Tatsuro

The endogenous agonist, beta-alanine, activates glycine receptors in rat spinal dorsal horn
Biochemical and Biophysical Research Communications 2018, volume 500, 897-901

{ 雑誌論文 }(計 2 件)

{ 学会発表 }(計 2 件)

{ 図書 }(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大橋 宣子
河野 達郎
ローマ字氏名：Ohashi Nobuko
Kohno Tatsuro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。