

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16648

研究課題名(和文) 脊髄損傷回復期に重要なモノアミンの脊髄前角運動ニューロンに対する作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of noradrenergic modulation of synaptic transmission and neuronal excitability in ventral horn neurons of the rat spinal cord

研究代表者

庄司 寛和 (Shoji, Hirokazu)

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：60783347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄前角細胞に対するノルアドレナリン(NA)の作用機序を電気生理学的実験により調査した。NAは興奮性、抑制性ともにシナプス伝達を促進したが、静止膜電位の結果からNAは総合的に興奮性に働くことを確認した。NAによるシナプス伝達の促進がテトロドトキシンにより抑制されたことから、シナプス前終末への直接作用はなく、神経回路網を形成する介在ニューロンを介して生じたといえる。また、アゴニストとアンタゴニスト投与の結果より、NAによる興奮性の変化は  $\alpha_1$  および  $\alpha_2$  受容体を介した作用であった。NAを用いた脊髄運動神経回路網の活性化において基礎的かつ新規の知見が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄前角細胞に対しノルアドレナリンは、 $\alpha_1$  および  $\alpha_2$  受容体を介し神経回路網を活性化することで、興奮性に作用することが明らかとなった。これら結果は脊髄損傷回復期に重要な運動神経の神経回路網の活性化において、モノアミンの1つであるノルアドレナリンを介した方策において重要な知見である。過去に筋攣縮との関連を示した  $\alpha_2$  受容体作用の報告はあるものの  $\alpha_1$  受容体作用に関する報告はなく、 $\alpha_1$  受容体を介した適度な神経回路網活性化の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Noradrenaline (NA) modulates the spinal motor networks for locomotion and facilitates neuroplasticity. However, neither the effects nor the mechanisms of NA on synaptic transmission and neuronal excitability in spinal ventral horn (VH) neurons are well characterized. We used a whole-cell patch-clamp approach to spinal cord slice of late neonatal rats. NA increased the frequency and amplitude of excitatory postsynaptic currents via the activation of somatic  $\alpha_1$ - and  $\alpha_2$ -adrenoceptors of presynaptic neurons. Although NA also activated inhibitory synaptic transmission, we confirmed that NA enhances the excitability of VH neurons by cause of the resting membrane potentials depolarized by NA and the increased firing frequency of action potentials. Our findings provide new insights that establish NA-based pharmacological therapy as an effective method to activate neuronal networks of the spinal VH in the recovery phase of spinal cord injuries.

研究分野：整形外科

キーワード：脊髄前角細胞 モノアミン ノルアドレナリン 脊髄損傷 電気生理 パッチクランプ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷の亜急性期から慢性期に生じる神経の回復においては神経可塑性が重要とされる。神経可塑性とは、神経細胞の軸索が発芽、伸長、再分布することにより新たな神経回路網を形成し、機能的・構造的な変化を生じることである。この神経可塑性を促進する方策として、薬物療法ではセロトニン、ノルアドレナリン (NA) などのモノアミンの可能性が挙げられている。このモノアミンのうち、NA 系神経は脊髄運動神経系において、神経回路網を修飾し、運動神経系の調節に重要な役割を果たす。脊髄における NA について神経修飾や反応経路に関する報告は数多く認めるが、脊髄前角ニューロンに対するシナプス伝達や細胞興奮性に対する NA の作用や作用機序は十分に検討されていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて、脊髄前角ニューロンに対する NA のシナプス伝達や細胞興奮性に対する作用と作用機序を解明することである。また、脊髄損傷回復期におけるモノアミンの脊髄神経機能回復への効果と適切な投与方法を検討することである。

3. 研究の方法

幼若ラット (第 7-15 生日) の脊髄を麻酔下に摘出し、マイクロスライサーを用いて脊髄横断スライス (厚さ 500 $\mu$ m) を作成した。脊髄スライスを記録用チャンパー内に固定し、人工脳脊髄液で灌流した。顕微鏡視下に脊髄第 IX 層に位置し、25 $\mu$ m 以上の大きな細胞体をもつ細胞に対し、微小ガラス電極を誘導し、ホールセル・パッチクランプ記録を行った。膜電位固定法を適用し、NA やその選択的受容体拮抗薬または作動薬を投与し、膜電流の変化や興奮性シナプス後電流 (EPSC)・抑制性シナプス後電流 (IPSC) の頻度、振幅の変化を記録・解析した。また電流固定法にて、静止膜電位や、活動電位発生頻度の変化を検討した。

4. 研究成果

保持膜電位 -70mV とし EPSC を記録し、NA 40  $\mu$ M の灌流投与により EPSC の頻度 (コントロール比、214%) と振幅 (184%) が有意に増加した ( $p < 0.01$ ) (図 1)。活動電位の発生を抑制する電位依存性 Na チャネル阻害薬・テトロドトキシン (TTX) 1 $\mu$ M 存在下では、EPSC に対する NA の効果は完全に抑制された。また膜電流の変化として、NA 投与によって記録細胞の興奮性増強を意味する内向き電流 (振幅平均 55.4 pA) を生じた。

脊髄前角ニューロンにおいて、NA は興奮性シナプス伝達を活性化した。この反応は TTX により遮断されることから、シナプス前終末への直接作用ではなく、興奮性介在ニューロンを介したものといえる。

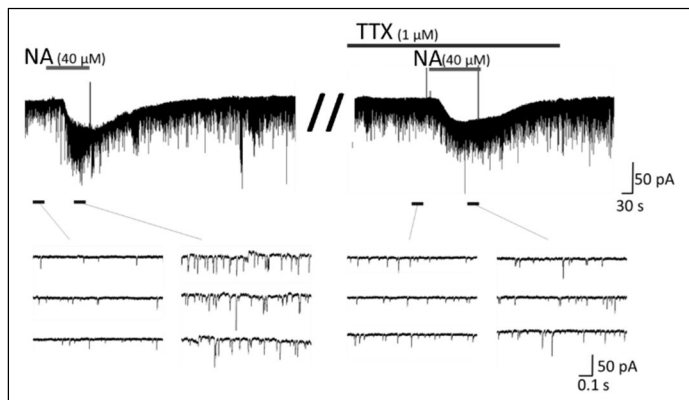


図 1 NA による EPSC の頻度・振幅の増加と TTX による NA 作用の遮断

NA 投与による EPSC の頻度の増加は、1 受容体拮抗薬・プラゾシン 1 $\mu$ M によって抑制されたが、2 受容体拮抗薬・ヨヒンビン 1 $\mu$ M では抑制されなかった (図 2 左)。受容体拮抗薬・プロプラノロール 1 $\mu$ M による抑制は部分的に認められた (図 2 右)。また NA による EPSC の振幅増加・内向き電流も同様に、1 と 受容体拮抗薬により抑制された。

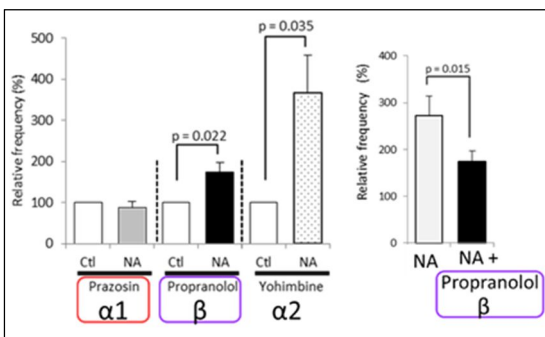
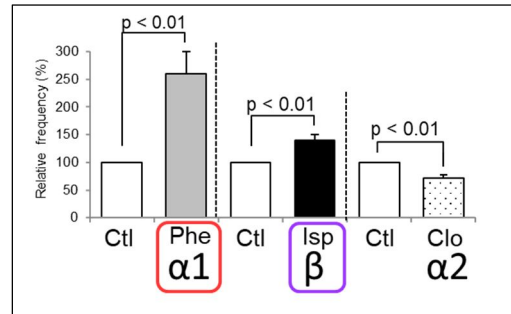


図 2 NA の EPSC 頻度増加に対する選択的 NA 受容体拮抗薬による抑制

NA 投与による EPSC の頻度の増加は、1 受容体拮抗薬・プラゾシン 1 $\mu$ M によって抑制されたが、2 受容体拮抗薬・ヨヒンビン 1 $\mu$ M では抑制されなかった (図 2 左)。受容体拮抗薬・プロプラノロール 1 $\mu$ M による抑制は部分的に認められた (図 2 右)。また NA による EPSC の振幅増加・内向き電流も同様に、1 と 受容体拮抗薬により抑制された。

1 受容体作動薬・フェニレフリン(Phe) 50 $\mu$ M、  
受容体作動薬・イソプロテレノール(Iso) 50 $\mu$ M 投  
与では NA 同様に EPSC の頻度・振幅の増加と内向き  
電流を認め、 2 受容体作動薬・クロニジン(Clo)  
1mM 投与では EPSC の頻度・振幅の減少を認めた( 図  
3 )

図 3 選択的 NA 受容体作動薬による EPSC の頻度



保持膜電位を 0mV とし、IPSC を記録した。NA 40 $\mu$ M にて IPSC の頻度(238%)と振幅(266%)が増  
加し、これら増加は TTX で遮断された。GABA 作動性・グリシン作動性 IPSC とともに NA により頻  
度・振幅が増加した。NA は興奮性シナプス伝達に加え、抑制性シナプス伝達も増強した。

NA の作用が細胞自体には総合的に興奮性または抑制性のどちらに働くかを確認する目的で、  
電流固定法( $I=0$ )にて静止膜電位の変化を調査した。NA によって静止膜電位が脱分極側に上昇  
した( 図 4 )。また、活動電位の発生頻度は NA によって増加した。これらより NA は前角ニュー  
ロンにとって興奮性に働くことを確認した。

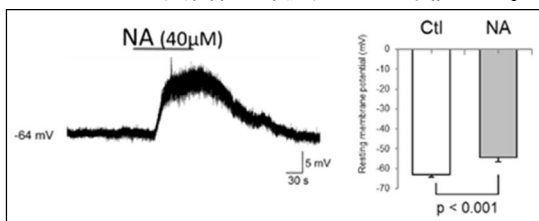


図 4 NA による脱分極側への静止膜電位の変化

【結論】 脊髄前角ニューロンにおいて、NA は神経回路網  
を形成する介在ニューロンの活性化により、興奮性神経  
伝達物質放出を促進している。この興奮性シナプス伝達  
活性化は 1 および 2 受容体を介した作用である( 図 5 )。  
NA は抑制性シナプス伝達も活性化するが、総合的には興奮  
性に作用することを確認した。

本研究にて脊髄前角ニューロンに対する NA の作用機序  
を明らかにした。これは、脊髄損傷回復期に重要な神経回  
路網の活性化を NA によって促進する方策の確立における  
基礎的な知見である。一般に 1 受容体の活性化は脊髄損  
傷後の痙性に関与するとされることがあり、 2 受容体へ  
の作用が神経回路網活性化の新たな治療標的となる可能  
性がある。今後は脊髄モデルラットを用いて、 2 受容体作  
動薬の他、モノアミン系薬物の脊髄神経機能回復への効果  
と適切な投与方法を解明することが課題である。

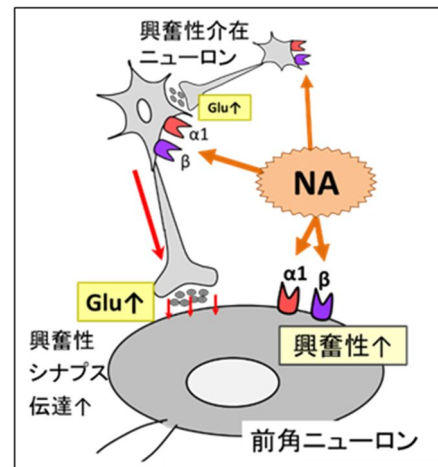


図 5 脊髄前角における NA の作用機序

本研究にて脊髄前角ニューロンに対する NA の作用機序を明らかにした。これは、脊髄損傷回  
復期に重要な神経回路網の活性化を NA によって促進する方策の確立における基礎的な知見であ  
る。一般に 1 受容体の活性化は脊髄損傷後の痙性に関与するとされることがあり、 2 受容体へ  
の作用が神経回路網活性化の新たな治療標的となる可能性がある。今後は脊髄モデルラットを  
用いて、 2 受容体作動薬の他、モノアミン系薬物の脊髄神経機能回復への効果と適切な投与方法を  
解明することが課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Hirokazu Shoji, Masayuki Ohashi, Toru Hirano, Kei Watanabe, Naoto Endo, Hiroshi Baba, Tatsuro Kohno	4. 巻 408
2. 論文標題 Mechanisms of noradrenergic modulation of synaptic transmission and neuronal excitability in ventral horn neurons of the rat spinal cord	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 161-176
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.026">https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.026</a>	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2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirokazu Shoji
2. 発表標題 Mechanisms of noradrenergic modulation of synaptic transmission and neuronal excitability in ventral horn neurons of the rat spinal cord
3. 学会等名 Neuroscience 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庄司寛和
2. 発表標題 脊髄前角運動ニューロンのシナプス伝達および細胞興奮性に対するノルアドレナリンの作用機序
3. 学会等名 第33回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----