

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09466

研究課題名(和文)ドーパミン作動神経下行性疼痛抑制系は運動療法による鎮痛機序に寄与するか

研究課題名(英文) Dopaminergic descending pain inhibitory system contributes to Excise-induced hypoalgesia

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：難治性慢性疼痛患者に対する運動療法が鎮痛効果(Excise-induced hypoalgesia: EIH)を有することは広く知られているものの、その鎮痛メカニズムは今なお不明な点が多い。EIHのメカニズムにドーパミン作動神経系下行性疼痛抑制系が強く寄与している可能性がある。本研究では神経障害性疼痛モデルに自動運動を行わせたラットの脊髄後角細胞に対して、電気生理学的手法であるパッチクランプ法を用いて、解析を行った。その結果、末梢神経中枢端のD1-1like受容体、D2-like受容体とともに賦活化することでシナプス前性に痛覚情報を抑制している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果から、EIHの作用機序には視床下部A11から脊髄後角細胞に投射しているドーパミン作動神経系による第3の下行性疼痛抑制系が強く寄与している可能性が示唆された。このことはこれまで研究されてきた脳内レベルでのエビデンスのみならず、脊髄レベルでも新たなエビデンスが追加されたと考える。これにより基礎レベルではエビデンスに乏しかったEIHの理論的裏付けが追加され、神経障害性疼痛など難治性慢性疼痛患者に対する治療法の一つとしてより確立されたものとなった。

研究成果の概要(英文)：Although it is well known that exercise therapy has analgesic effects (excise-induced hypoalgesia: EIH) for patients with intractable chronic pain, little is known about the mechanism of EIH. The present study investigated the possibility that the dopaminergic descending pain system may contribute to the mechanism of EIH. In this study, we analyzed the spinal dorsal horn neuron of rats that were subjected to automatic exercise in neuropathic pain model by using an electrophysiological technique, the patch-clamp technique. The results of this study suggest that exercise therapy may induce pre-synaptic actions by activating both D1-1like and D2-like receptors at the central ending of peripheral nerves, which inhibits pain information.

研究分野：整形外科学

キーワード：ドーパミン 運動療法 鎮痛 脊髄後角 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛など難治性慢性疼痛への治療方法は様々なアプローチがあるが、近年開発された新規鎮痛薬を含めた薬物療法には著効例がある一方で、無効例も多く存在し、限界がある。一方、非薬物治療法の一つに運動療法がある。しかし、運動療法がどのような機序で慢性疼痛患者に有効であるのかは未だ不明な点が多い。ヒトを対象とした臨床現場で効果は十分実証済みであるが、基礎研究によるメカニズムに関してエビデンスレベルの高い報告はまだ少ないのが現状である。近年の運動療法による鎮痛 (Excise-induced hypoalgesia: EIH) のメカニズムの基礎研究は主に脳内機序に焦点が当てられている。とくに、中脳辺縁系におけるドーパミン作動神経系が注目されつつある。一方で、脳より下位の脊髄内における EIH のメカニズムに関しては現在報告がほとんど無い。しかし、一般的に慢性疼痛患者の治療困難例の多くには下行性疼痛抑制系の低下・破綻がその一因とされているため、EIH は下行性疼痛抑制系の回復や賦活に寄与している可能性があると考えても矛盾はない。下行性疼痛抑制系にはノルアドレナリン作動神経系、セロトニン作動神経系がよく知られているが、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、さらに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¹⁾。そこで我々は EIH のメカニズムに関して、第3の下行性疼痛抑制系というべきドーパミン作動神経系との関係性に着目した。

2. 研究の目的

本研究では EIH のメカニズムには脳内のみならず、ドーパミン作動神経系による下行性疼痛抑制系が脊髄後角内で強く作用し、鎮痛作用を有しているのではないかと考え、解析を行った。このドーパミン下行性疼痛抑制系の作用機序には、健常体においてドーパミン受容体のサブタイプのうち、脊髄後角内の D2,3,4 からなる D2-like 受容体がドーパミンにより活性化することで脊髄後角細胞膜を過分極させるシナプス後の作用と脊髄後角に投射する末梢神経中枢端でのグルタミン酸放出を抑制するシナプス前の作用の2つの鎮痛作用が存在することが分かっている¹⁾。一方、神経障害性疼痛モデルラットにおいては D2-like 受容体選択的作動薬による作用のうち、痛みを抑制する過分極に作用する脊髄後角細胞の割合が減少し、痛みを賦活する脱分極の作用を呈する反応率が増加、またその膜電流自体も増強するというドーパミン作動神経系の変調が起きていることを過去の研究で報告した²⁾。本研究の目的は神経障害性疼痛モデルに自動運動を行わせたモデルラットを作成し、その脊髄スライスに対してパッチクランプ法を用いた電気生理学的手法を適応することで EIH とドーパミン作動神経下行性疼痛抑制系の関係について解析を行うこと、さらに神経障害性モデルラットで見られたドーパミン作動神経系の変調に与える影響についても解析を行うことである。

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) 神経障害性疼痛モデル作成

雄性 Sprague-Dawley ラットに5週齢の時点で末梢神経障害性疼痛 (Spared nerve injury: SNI) モデルを作成した。SNI モデルは坐骨神経から分岐する3枝のうち、腓骨神経を残し、総腓骨神経・脛骨神経を結紮・切断することによって作成した。疼痛は von Frey test で評価し、術後7~10日の時点で下肢に allodynia 様の反応が出現するかどうかの確認をとった。

(2) 自動運動

SNI モデル作成処置の1日前より運動を行わせ、環境に慣らせた。上記の SNI モデル処置ラットをランニングホイールを用いて自由運動が出来る環境下での飼育群と通常飼育群に分けた。ランニングホイールはケージに設置し、SNI 処置後10日間の飼育期間は特に制限なく自由に歩行させた。

(3) 脊髄横断スライス標本

脊髄横断スライス標本は、Nakatsuka らの方法³⁾に従って作成した。ラットに深麻酔後、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、傍脊柱筋群を切離し、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を用いて厚さ約 650 μm の脊髄横断スライス標本作製した。腰膨大部の脊髄スライスを記録用チャンバーに移し、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を灌流した。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。

(4) 神経細胞からのパッチクランプ記録法

先端電極抵抗 8~12 M の微小電極に電極内液を充填し、マイクロマニピュレーターで電極

を脊髄内に刺入し、ブラインド・ホールセル・パッチクランプ法によって記録を行なった。興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) を記録するときの電極内液の組成 (mM) は potassium gluconate, 135; KCl, 5; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 2; EGTA, 5; ATP-Mg, 5; HEPES, 5 とした。EPSC は -70 mV の保持膜電位で記録した。得られた応答はパッチクランプ用増幅器により増幅され、A/D 変換後、データ記録及び解析用ソフトウェアを用いてコンピュータにより記録・解析した。

(5) ドーパミン関連物質の灌流投与

薬液灌流投与による実験結果は膜電位の変化を 5 pA 以上の変化の場合で有意とした。EPSC の頻度、振幅は平均 ± 標準誤差で表した。検定は Student's t-test で行ない、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。

4. 研究成果

SNI 処置を導入したのち、ラットをランニングホイールを用いた自由運動が出来る環境下での飼育群 (運動群) と通常飼育群 (非運動群) にランダムに分けた。運動群はランニングホイールで 10 日間制限なく、運動させた。SNI 処置後 2-3 週経過した両群ラットから摘出作成した脊髄スライスにホールセルパッチクランプ法を適用した。記録膜電位を -70mV に固定し、脊髄後角ニューロンからドーパミンおよび各ドーパミン受容体作動薬による膜電流の変化をまずは解析した。その結果、運動群において、ドーパミンによる細胞膜の過分極を示す細胞は記録細胞中 28.6% で平均 12.8pA の過分極変化、脱分極を示したものは 42.9% で平均 -13.2pA の脱分極変化、反応なしは 28.5% であった。D2 受容体選択的作動薬である Quinpirole では過分極を示す細胞は 25.0% で平均 27.3pA の過分極変化、脱分極を示したものは 37.5% で平均 -42.4pA の過分極変化、反応なしは 37.5% であった。一方、D1 受容体選択的作動薬である SKF38393 では過分極を示す細胞は 12.5% で平均 5.4pA の過分極変化、脱分極を示したものは 87.5% で平均 -11.5pA 脱分極変化であった。

次に両群における興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: sEPSC) の変化の解析を行った。ドーパミンを灌流投与すると運動群では投与前後で EPSC は頻度が投与前平均 3.5 ± 0.8 Hz から投与後平均 2.2 ± 0.8 Hz で有意差ありであった。振幅が投与前平均 9.8 ± 1.3 pA から投与後平均 8.8 ± 1.1 pA で有意差はなしであった。一方、非運動群ではドーパミン灌流投与において、EPSC は頻度が投与前平均 3.3 ± 1.0 Hz から投与後平均 2.1 ± 0.8 Hz に抑制で有意差があった。振幅が投与前平均 9.2 ± 1.2 pA から投与後平均 7.6 ± 0.9 pA に抑制で有意差はありの結果になった。D2 受容体選択的作動薬である Quinpirole 投与においては、運動群において EPSC は頻度が投与前平均 3.8 ± 1.6 Hz から投与後平均 2.2 ± 0.9 Hz で有意差はなかった。振幅が投与前平均 12.1 ± 0.1 pA から投与後平均 11.8 ± 0.1 pA で有意差はなしであった。一方、非運動群では Quinpirole 投与において、EPSC は頻度が投与前平均 2.1 ± 0.6 Hz から投与後平均 1.3 ± 0.5 Hz に抑制で有意差が生じた。振幅が投与前平均 12.4 ± 2.8 pA から投与後平均 10.4 ± 2.5 pA に抑制で有意差はありの結果になった。次に D1 受容体選択的作動薬である SKF38393 の灌流投与で解析を行った。運動群において EPSC は頻度が投与前平均 2.7 ± 0.8 Hz から投与後平均 1.2 ± 0.4 Hz に抑制で有意差が生じた。振幅が投与前平均 12.3 ± 3.1 pA から投与後平均 9.1 ± 4.6 pA で有意差はなしであった。一方、非運動群では SKF38393 投与において、EPSC は頻度が投与前平均 3.0 ± 0.6 Hz から投与後平均 1.8 ± 0.4 Hz に抑制で有意差はあり、振幅が投与前平均 11.3 ± 1.4 pA から投与後平均 9.5 ± 1.0 pA に抑制で有意差はありの結果になった。

我々の過去の研究結果では健常ラットの in vivo 標本では脊髄後角ではドーパミンに反応すると D2-like 受容体による強く過分極する外向き電流がほとんどで、内向き電流を示すニューロンは少数であった¹⁾。一方、脊髄スライスを用いた解析²⁾ではドーパミンや D1-like 受容体選択的作動薬に対する反応する割合は正常ラットでも SNI ラットでも大きな変化はなかった。さらに D2-like 受容体選択的作動薬である Quinpirole に対する反応をみると統計学的有意差は生じなかったが、痛みを抑制する過分極に作用するニューロンの割合が減少し、痛みを賦活する脱分極の作用を呈する割合が増加し、またその反応も増強していたことからシナプス後の D2-like 受容体の何らかの変調が示唆された。一方、過去の報告と比較して、今回の SNI モデルラットに自由運動を行わせた群 (運動群) の脊髄スライスを用いた解析ではドーパミン、D1-like 受容体作動薬、D2-like 受容体作動薬による膜電位の変化はいずれも過分極から脱分極に作用する脊髄後角細胞が多くなるというシフトをきたす変調が判明した。このことは仮説に反して、シナプス後反応としては末梢からの痛み情報を脊髄レベルで増強していることを示唆する結果となった。一方、シナプス前の作用としては運動群においてはドーパミン、D1-like 受容体作動薬、D2-like 受容体作動薬の灌流投与による EPSC の抑制効果は弱かったが、非運動群ではいずれも EPSC が有意差をもって抑制されることが判明した。このことは運動群ではすでにドーパミン下行性疼痛抑制系により、D1, D2 受容体がいずれも活性化されている可能性があること、健常体とは異なり、神経障害性疼痛時には運動療法により D2 のみならず D1-like 受容体もシナプス前に働いて、疼痛を抑制している可能性が示唆された。この検証には今後、各受容体の拮抗薬を灌流投与することで確認する必要がある。

以上のことから、運動療法によりドーパミン下行性疼痛抑制系は脊髄後角細胞に対してシナプス後性作用で痛覚情報を増強する可能性があるものの、脊髄後角に投射される末梢神経中枢の D1-like 受容体、D2-like 受容体とともに賦活化することでシナプス前性に痛覚情報を抑

制するという可能性が示唆された。

【参考文献】

1) 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

2) 谷口 亘, 西尾 尚子, 山中学, 曾根勝 真弓, 太地 良, 筒井 俊二, 中塚 映政, 山田 宏. 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. 脊髄機能診断学 41 巻 1 号: 20-24, 2021

3) 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

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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、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	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 脊髄機能診断学	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 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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	山中学 (Yamanaka Manabu) (30597084)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	
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
---------	---------