

令和 4 年 4 月 30 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K17777

研究課題名(和文) 脊髄 層における慢性疼痛発症過程で生じるシナプス可塑性変化の病態解明

研究課題名(英文) Norepinephrine restores inhibitory tone of spinal lamina X circuitry, thus contributing to analgesia against inflammatory pain

研究代表者

大橋 宣子 (Ohashi, Nobuko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70706712

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)：本研究では慢性疼痛で生じるシナプス可塑性変化が脊髄 層においても生じているか、炎症性疼痛モデルを用い脊髄 層ニューロンにおけるノルアドレナリン (NA)の反応を検討した。痛み刺激により発現するリン酸化extracellular signal-regulated kinaseの増強をみとめ、in vivo脊髄細胞外記録による活動電位の発生頻度が増加したが、NAによりそれらの反応は抑制された。また脊髄後角におけるin vitroパッチクランプ記録では、NAは 層の抑制性ニューロンシナプス前終末の 1A 受容体、およびシナプス後膜の 2受容体を活性化することで、炎症性疼痛に対し鎮痛効果を発揮した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では慢性疼痛発症過程で生じるシナプス可塑性変化が脊髄 層においても生じているか、 層ニューロンに対する痛覚伝達に関与する神経伝達物質であるNAの反応を検討した。その結果、慢性疼痛として炎症性疼痛モデルラットを用いNAは脊髄X層の抑制性ニューロンに作用することで炎症性疼痛に対し鎮痛効果を発揮していることが示された。つまり本研究は慢性疼痛時の脊髄 層におけるNAの変化をシナプスレベルで検討した世界で最初の研究であるといえる。また本研究はin vivo脊髄細胞外記録およびin vitro脊髄パッチクランプ記録を用いたが、この手法が行える施設は世界的にも非常に数が少なく意義が高い研究といえる。

研究成果の概要(英文)：Noradrenaline (NA) is a neurotransmitter in descending pathways emanating from the brain stem and NA-containing fibers terminate in spinal lamina X, suggesting that NA may modulate nociceptive synaptic transmission in lamina X. We investigated this mechanism within inflammatory pain model rats.

Using immunohistochemical staining and in vivo extracellular recording, the increased number of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase profiles and increased frequency of spontaneous neuronal firing were significantly suppressed by the direct application of NA. Using in vitro patch-clamps recording, direct application of NA to spinal lamina X neurons facilitates frequency of miniature inhibitory postsynaptic current and induces an outward current, and these responses are inhibited by 1A- and 2-receptor antagonists. These mechanisms of NA on spinal lamina X might contribute to analgesia against inflammatory pain.

研究分野：疼痛

キーワード：脊髄 層 慢性疼痛 炎症性疼痛 ノルアドレナリン 免疫組織学実験 電気生理学実験

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛の発症には主に痛覚伝導路を有する脊髄IからVI層の後角ニューロンの可塑性変化が関与すると考えられている。しかし脊髄X層にも GABA、グリシンなどの痛覚伝達に関与する神経伝達物質が多く含まれており、また下行性抑制系ニューロンがX層へ投射することが明らかである。さらに我々はこれまでに、代表的な神経伝達物質であるノルアドレナリン (NA)が脊髄X層の抑制性シナプス伝達を有意に活性化させることを明らかにしている (Neuroscience 2019; 408: 214–225)。さらにこのX層の変化は生理的状态のみでなく、慢性疼痛モデルラットにおいても同様の反応が得られることを観察している (2019年度科学研究費助成事業 研究活動スタート支援 課題番号 19K24008)。つまり脊髄X層が慢性疼痛の発症に関与する可能性が示唆されるが、X層の機能について着目した報告はなく、慢性疼痛時のX層における変化をシナプスレベルで検討した報告はない。本研究では、慢性疼痛発症過程で生じるシナプス可塑性変化がX層においても生じているか、慢性疼痛モデルラットを用い、X層ニューロンに対する痛覚伝達に関与する神経伝達物質である NA の反応を検討した。

### 2. 研究の目的

慢性疼痛発症過程で生じるシナプス可塑性変化がX層においても生じているか、慢性疼痛モデルラットを用い、X層ニューロンに対する痛覚伝達に関与する神経伝達物質である NA の反応を免疫組織学および電気生理学実験により解析する。

### 3. 研究の方法

#### 慢性疼痛モデルラットの作製

慢性疼痛モデルラットとして炎症性疼痛モデルラットを作製する。左足底に Complete Freund's adjuvant (CFA)を 100  $\mu$ l 注入し、炎症性疼痛モデルラット (CFA ラット)を作製し、実験を行う。

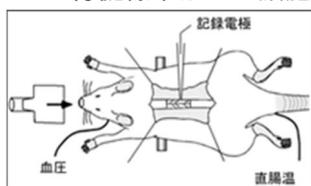
#### 免疫組織学実験

ウレタン麻酔下に正常および慢性疼痛モデルラットの脊髄横断スライス (L5)を作成し、NA をそれぞれ 5 分間灌流投与した後、痛み刺激により発現することが知られているリン酸化 extracellular signal-regulated kinase (pERK) 抗体を用いて免疫染色を行う。光学顕微鏡下にX層における pERK 陽性細胞数を計測し、pERK の発現の変化を観察する。

#### *in vivo* 脊髄標本からの細胞外記録

ウレタン麻酔下に正常および慢性疼痛モデルラットの椎弓切除を行い、ガラス微小記録電極を顕微鏡下にマニピュレーターを用いてX層に誘導しパッチクランプ記録を行う (図 1)。脊髄表面に NA を灌流し、細胞外記録を用いて活動電位の発生頻度の変化を観察する。

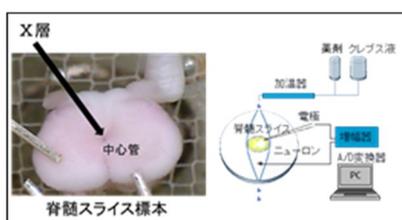
図 1: *in vivo* 脊髄標本からの細胞外記録



#### *in vitro* 脊髄標本からのパッチクランプ記録

ウレタン麻酔下に正常および慢性疼痛モデルラットの脊髄横断スライス (L5)を作成し、ガラス微小記録電極を顕微鏡下にマニピュレーターを用いてX層に誘導しパッチクランプ記録を行う (図 2)。脊髄表面に NA を灌流し、テトロドトキシン存在下に記録される興奮性ニューロンにおける微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC)および抑制性ニューロンにおける微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC)の反応を観察する。

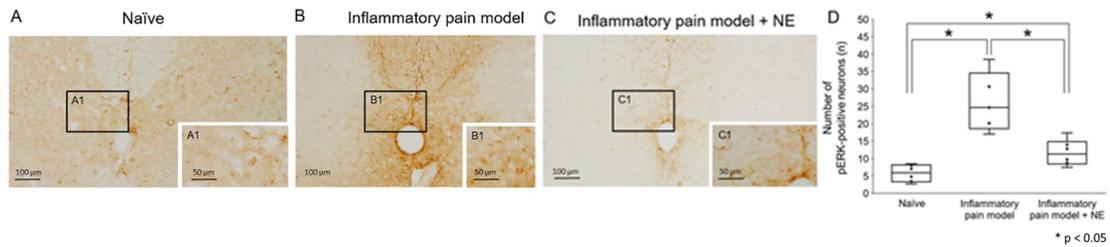
図 2: *in vitro* 脊髄標本からのパッチクランプ記録



#### 4. 研究成果

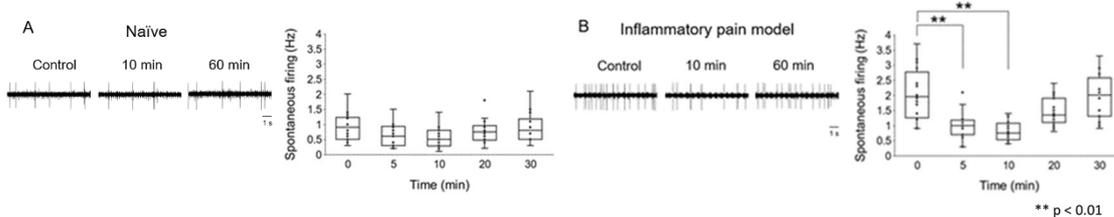
脊髄X層では炎症性疼痛によりリン酸化 ERK の発現が増加し、NA の投与により改善する。脊髄X層におけるリン酸化 ERK 陽性細胞数は naïve ラットでは  $5.7 \pm 2.4$  ( $n = 6$ )であったが、CFA ラットでは  $26.2 \pm 8.6$  ( $n = 5$ )と有意に増加していた。この CFA ラットの脊髄に NA を灌流投与するとリン酸化 ERK 陽性細胞数は  $14.4 \pm 4.0$  ( $n = 6$ )と有意に減少していた。

図 3: リン酸化 ERK 陽性細胞数



脊髄X層では炎症性疼痛により活動電位の発生頻度が増加し、NA の投与により改善する。脊髄X層における *in vivo* 脊髄標本からの細胞外記録による活動電位の発生頻度は、naïve ラットでは  $0.91 \pm 0.47$  Hz ( $n = 14$ )であったが、CFA ラットでは  $2.1 \pm 0.85$  Hz ( $n = 16$ )と有意に増加していた。この CFA ラットの脊髄に NA を灌流投与すると活動電位の発生は有意に減少していた。

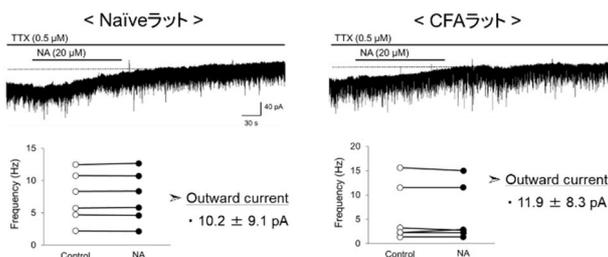
図 4: *in vivo* 脊髄標本からの細胞外記録による活動電位の発生頻度



脊髄X層では NA の投与により mEPSC に変化を与えない。

脊髄X層における *in vitro* 脊髄標本からのパッチクランプ記録により、NA は mEPSC の振幅に影響を与えず、NA は興奮性ニューロンのシナプス伝達には関与しないことが明らかになった。

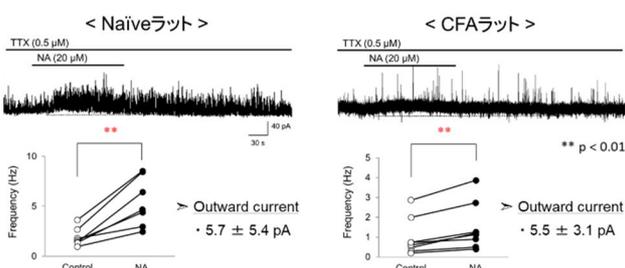
図 5: *in vitro* パッチクランプ記録による mEPSC



脊髄X層では NA の投与により mIPSC の頻度を増加させ、outward current を発生させる。

脊髄X層における *in vitro* 脊髄標本からのパッチクランプ記録により、NA は mIPSCs の頻度を増加させ、outward current を発生させた。このことから、NA は脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末に作用し、GABA・グリシンといった抑制性神経伝達物質の放出を増加させる作用があること、また NA はシナプス後膜の過分極を発生させる作用があることが明らかになった。

図 6: *in vitro* パッチクランプ記録による mIPSC

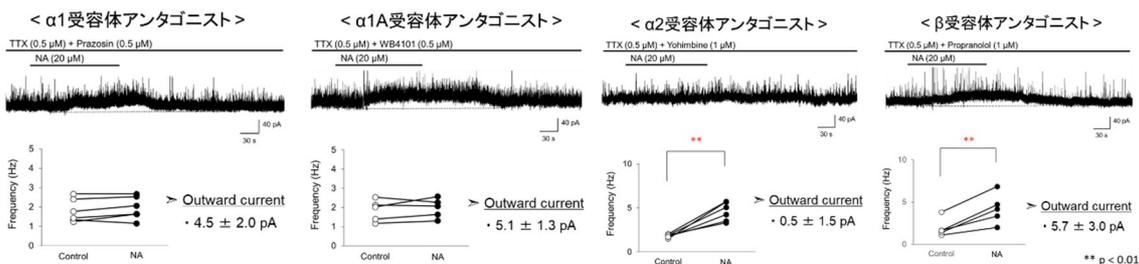


脊髄X層では NA は抑制性ニューロンのシナプス前終末の  $\alpha 1A$  受容体に作用し抑制性神経伝

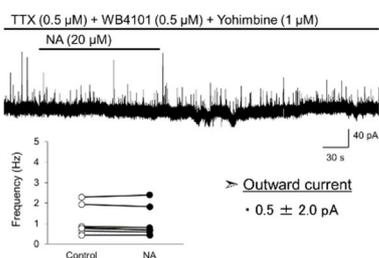
達物質の放出を増加させ、シナプス後膜の  $\alpha_2$  受容体に作用し過分極を発生させる。

これまでに観察された NA の反応が  $\alpha$  受容体、 $\beta$  受容体を介する反応が検討するため、 $\alpha_1$  受容体アンタゴニスト (Prazosin)、 $\alpha_1A$  受容体アンタゴニスト (WB4101)、 $\alpha_2$  受容体アンタゴニスト (yohimbine)、 $\beta$  受容体アンタゴニスト (propranolol) 存在下に記録したところ、NA による mIPSCs の頻度増加作用は  $\alpha_1$  および  $\alpha_1A$  受容体アンタゴニストで拮抗された。また、NA による mIPSCs の outward current は  $\alpha_2$  受容体アンタゴニストで拮抗された。このことから、NA は脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末の  $\alpha_1A$  受容体に作用し、抑制性神経伝達物質の放出を増加させる作用があること、また NA はシナプス後膜の  $\alpha_2$  受容体に作用し過分極を発生させる作用があることが明らかになった。

< Naiveラット >



< CFAラット >



以上の結果より、炎症性疼痛による慢性疼痛の発症過程における脊髄X層では痛み刺激による反応が増強しており、その炎症性疼痛存在下において NA は、脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末の  $\alpha_1A$  受容体に作用し抑制性神経伝達物質の放出を増加させる、およびシナプス後膜の  $\alpha_2$  受容体に作用し過分極を発生させることで鎮痛効果を発揮させることが示された。

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 Nobuko Ohashi, Daisuke Uta, Masayuki Ohashi, Hiroshi Baba	4. 巻 490
2. 論文標題 Norepinephrine Restores Inhibitory Tone of Spinal Lamina X Circuitry, thus Contributing to Analgesia Against Inflammatory Pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 224-235
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2022.03.023	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 大橋 宣子、大橋 正幸、馬場 洋
2. 発表標題 脊髄 層におけるノルアドレナリンの鎮痛機序
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第67回学術集会
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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------