

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791394

研究課題名（和文） *in vivo* パッチクランプ法を用いたドーパミン下行性疼痛抑制系の解明研究課題名（英文） Elucidation of dopaminergic descending inhibitory passway
by *in vivo* patch-clamp methods

研究代表者

谷口 亘（TANIGUCHI WATARU）

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：20453194

研究成果の概要（和文）：ドーパミンの下行性疼痛抑制系としての作用を脊髄後角レベルにおいて *in vivo* パッチクランプ法を用いて解析した。ドーパミンの灌流投与により脊髄膠様質ニューロンにおいて、細胞膜の過分極を示す外向き電流の発生と興奮性シナプス後電流の抑制作用を認めた。また、ドーパミンは脊髄レベルで末梢皮膚刺激に対する抑制効果も認めた。さらにドーパミンを脊髄に投射する起始核である視床下部 A11 領域を電気刺激するとドーパミンを灌流投与したときと同様の反応が得られた。

研究成果の概要（英文）： We investigated the descending antinociceptive actions of dopamine (DA) on substantia gelatinosa(SG) neurons by *in vivo* whole-cell patch-clamp methods. The application of DA induced outward currents and suppressed the frequency and amplitude of excitatory postsynaptic currents (EPSCs). And it was showed that DA produced direct inhibitory effects in SG neurons to both noxious and innocuous stimuli to the skin. Furthermore, electrical stimulation of A11 neurons, which project to the spinal cord, induced outward current and suppressed of EPSCs. This effect is similar to the case of DA application to SG neurons.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：ドーパミン, *in vivo* パッチクランプ, 脊髄膠様質, D2-like 受容体, 下行性疼痛抑制系, A11, 電気刺激, Dopamine

1. 研究開始当初の背景

下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。しかしながら、ノルアドレナリンの前駆物質であるドーパ

ミンが知覚に関してどのような作用を及ぼすか未だ明らかではない。ドーパミンは脳内に広範囲に分布する主要な神経伝達物質である。ドーパミン受容体は7回膜貫通型のペプチド構造を有し、G蛋白と共役している。サブタイプにはD1からD5が存在し、D1,D5

の D1-like 受容体、D2,D3,D4 の D2-like 受容体に大別できる。ドーパミンは脳レベルにおいて運動、認知、感情、動機強化、食欲、内分泌調整など多彩な生理活性作用を有する。また、近年、脳レベルにおいてドーパミンが疼痛に関連することを示唆する研究報告が散見されるようになり、各領域でドーパミンが直接の疼痛抑制作用を有することが指摘されている。しかしながら、脊髄レベルでのドーパミン作動性神経系の役割については依然不明な点が多い。ドーパミン作動性神経系として、黒質線条体路、中脳辺縁路、視床下部下垂体路、そして視床下部脊髄路の4経路が知られている。視床下部脊髄路は視床下部の後部 A11 から脊髄に投射されていることが比較的早くから知られていたが、他の経路と違ってその機能は不明である。過去に視床下部 A11 電気刺激で鎮痛効果が得られることや、ドーパミンあるいはドーパミン作動薬の髄腔内投与での鎮痛効果が行動学的に報告されていることから、ドーパミン作動神経系には既知のセロトニン作動神経系やノルアドレナリン作動神経系と同様に下行性疼痛抑制系としての機能を有する可能性がある。

2. 研究の目的

ドーパミン作動神経系が下行性疼痛抑制系の作用を有することを脊髄レベルで電気生理学的に証明したい。脊髄膠様質ニューロンは末梢組織に存在する侵害受容器からの痛み情報を C 線維、A δ 線維を介してシナプス結合により受け取り、より中枢に情報伝達する。この際、痛み情報は種々の内因性神経伝達物質により修飾を受ける。セロトニンやノルアドレナリンは下行性疼痛抑制系として脊髄レベルで興奮性を抑制する作用を有している。ドーパミンも同様の作用を有していると思われるが、それを証明するには起始核である視床下部 A11 領域と脊髄後角、侵害刺激を受容する末梢皮膚組織が断絶していない *in vivo* 標本が必要である。本研究の目的は *in vivo* パッチクランプ法を用いて脊髄膠様質細胞でのドーパミンのメカニズムを明らかにし、ドーパミン作動神経系が下行性疼痛抑制系の作用を有することを証明することである。

3. 研究の方法

(1) ラット脊髄 *in vivo* 標本の作製

5~8 週齢の成熟 Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。ラットをウレタン（腹腔内投与：1.2~1.5g/kg）で麻酔後、呼吸管理はマスクによる酸素投与を行った。胸腰椎部で背側に皮切を行ない、傍脊柱筋群を切離した。脊椎を露出し、Th13 から L2 まで椎弓切除を行った。この状態でラットを脊髄固定器

に移す。まず、イヤバー及び中胸椎部と下位腰椎で3点固定し、皮切部の辺縁を錘で4方向に引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36°C の酸素負荷した人工脳脊髄液 (NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, and NaHCO₃ 25 mM) で灌流した。実体顕微鏡下に硬膜を縦切開・切除し、後根を露出し、腰傍大部レベルで後根を内外側に分け、電極刺入スペースを作成した。この時点で電極刺入部近くの頭側と尾側の脊椎固定を追加し、合計5点固定とする。呼吸による脊髄の振動が抑制できていることを確認した上で、クモ膜と軟膜に電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を行った。

(2) 神経細胞からのパッチクランプ法

マイクロマニピレーターで電極を脊髄内に刺入し、5mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成するいわゆるブラインドパッチクランプ法によって記録を行う。記録用電極には potassium gluconate 135mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM and HEPES-KOH 5 mM を充填した先端電極抵抗 8~12M Ω の微小電極を用いた。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行う。ドーパミンおよびその関連物質を灌流投与し、それらが脊髄後角感覚ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を検討する。

(3) 末梢皮膚刺激試験

記録ニューロンの皮膚受容野を同定した上で同部位に疼痛刺激と触刺激を加え、コントロール時とドーパミン存在下において興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic currents; EPSC) および興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potentials; EPSP)、活動電位 (action potential; AP) の大きさを比較した。疼痛刺激には有鉤鉗子、触刺激には定圧の空気を噴霧することにより、末梢刺激を定量的に行った。

(4) 視床下部 A11 電気刺激

ラットの頭蓋骨にスチールドリルを用いて事前に骨孔を作成し、頭部を固定する。次に座標軸を設定したのち、26 ゲージ (外径 0.46mm) のガイドカニューラを視床下部 A11 領域の 2mm 上方まで挿入し、歯科用セメントで固定する。微小刺激電極 (外径 0.2mm; model IMB-9002; インターメディカル社) をガイドカニューラに通して、A11 の座標軸 12) (stereotaxic coordinates: 3.0-3.5 mm posterior to the bregma and 0.5mm lateral, 8.0 mm ventral to the dura) に設置し、反復性に電気刺激することで脊髄膠様質ニューロンの EPSC にどのような効果を与えるか *in vivo* パッチクランプ法を用いて検討し

た。電気刺激は duration, 100 μ s; intensity, 100 μ A; frequency, 10 Hz の矩形波で行った。得られた記録電流はパッチクランプ用アンプ (Molecular Devices 社 Axopatch200B)、A/D 変換器 (Molecular Devices 社 Digidata 1440A)、データ記録・解析用ソフト (Molecular Devices 社 pClamp10、Synptosoft 社 Mini Analysis 6.0) を用いて記録および解析を行った。検定には paired t-test および t-test を用いた。危険率 5% ($P < 0.05$) をもって有意と判断した。

4. 研究成果

(1) ドーパミンの脊髄膠様質ニューロンにおける作用機序

電圧固定法により記録膜電位を -70mV に固定し、EPSC を観察した。ドーパミン (100 μ M) を 2 分間灌流させると細胞膜の過分極を示す外向き電流の発生を認めた。外向き電流は記録した 219 細胞中 155 細胞 (70.8%) で認め、平均振幅は 19.5 ± 1.6 pA ($n = 64$) であった。また、記録したニューロン中で EPSC の頻度、振幅を解析したところ、頻度・振幅が有意に減少していた。次に、ドーパミンの作用が脱感作するかどうかを調べた。ドーパミンの反復投与や長時間投与にても外向き電流の減弱はなく、脱感作はみられなかった。ナトリウムチャンネル阻害薬であるテトロドトキシン (TTX, 1 μ M) 存在下では微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC; mEPSC) が観察できる。TTX 存在下にドーパミンを投与したところ、mEPSC は振幅に有意差はでなかったものの、頻度は有意に抑制されていた (73.6 ± 9.4 % of the controls; $n = 10$, $P < 0.05$)。本結果から、ドーパミンは脊髄後角感覚ニューロンの膜を過分極するとともに一次求心性線維から興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離を抑制することが判明した。また、TTX 存在下でも外向き電流は減弱しなかった ($n = 10$)。次に、グルタミン酸受容体拮抗薬の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, 10 μ M) 存在下でドーパミン投与を行うと EPSC は完全に消失したが、外向き電流は減弱しなかった ($n = 5$)。さらに、ドーパミンによって惹起される外向き電流に関与するイオンチャンネルを調べるため、非選択的カリウムチャンネル拮抗薬であるバリウム (1mM) 存在下でドーパミンの作用を観察した。バリウム非存在下と比較してバリウム存在下では有意に外向き電流は減少した (34.7 ± 7.8 % of the controls; $n = 8$, $P < 0.05$)。また、細胞膜 G タンパク質の活性を阻害する GDP- β S を電極内に混入して記録すると、記録当初はドーパミンによる外向き電流が発生したが、30 分以上において再度ドーパミン投与すると、その振幅は有意に減少した

(22.3 ± 8.9 % of the controls; $n = 8$, $P < 0.01$)。以上の結果から、ドーパミン受容体の活性化によって、細胞膜 G 蛋白質の活性化を介してカリウムチャンネルを開口し、抑制性電流が発生することが判明した。ドーパミンによって惹起される外向き電流がどのようなサブタイプの受容体によるものかを検討した。D1-like 受容体作動薬である SKF38393 (100 μ M) 投与を行ってもほとんど外向き電流は発生しなかったが (1.9 ± 0.6 pA; $n = 9$)、D2-like 受容体作動薬である quinpirole (100 μ M) を投与すると、ドーパミン投与時と同様の外向き電流が観察できた (15.7 ± 2.0 pA; $n = 9$)。また、D2-like 受容体拮抗薬の Sulpiride (30 μ M) 存在下ではドーパミンによって惹起される外向き電流は有意に阻害された (34.1 ± 10.0 % of the controls; $n = 6$, $P < 0.05$)。以上の結果から、脊髄後角感覚ニューロンには D2-like 受容体が発現していることが判明した。

(2) 末梢皮膚刺激試験

ラットの下肢に刺激を加えると EPSC が激しく連続して発火するが、その反応をドーパミン存在下と非存在下で比較し、末梢皮膚刺激に対するドーパミンの作用を検討した。触刺激は圧刺激装置を使用し、一定の圧で 5 秒間空気を吹き付けることで定量化した。空気を吹き付けると脊髄後角ニューロンにおいて EPSC の増加が記録された。ドーパミン投与下では非存在下と比較して触刺激による EPSC の発生頻度、基線と EPSC 波形の形成する面積は有意に減少した (発生頻度 [70.9 ± 11.0 % of control; $n = 18$, $P < 0.01$], 面積 [80.6 ± 6.3 % of control; $n = 18$, $P < 0.01$])。また、疼痛刺激を定量的に行うために有鉤鉗子で 5 から 10 秒間挟んだ。触刺激と同様にドーパミン存在下では非存在下と比較して疼痛刺激による EPSC の発生頻度、面積は有意に減少した (発生頻度 [74.6 ± 7.5 % of control; $n = 6$, $P < 0.05$], 面積 [78.0 ± 8.0 % of control; $n = 6$, $P < 0.05$])。また、電流固定法で AP, EPSP の発生を観察すると、ドーパミン存在下では非存在下と比較して AP, EPSP は発生頻度ならびに面積が有意に減少した (発生頻度 [70.2 ± 12.4 % of control; $n = 9$, $P < 0.05$], 面積 [42.7 ± 6.9 % of control; $n = 9$, $P < 0.01$])。

(3) 視床下部 A11 電気刺激試験

脊髄膠様質ニューロンで EPSC を記録しながら、視床下部 A11 領域を電気刺激すると、ドーパミンを灌流投与したときと同様に外向き電流の発生 (36 / 50 ニューロン (72%)) を認めた。この外向き電流の平均振幅は 7.5 ± 1.6 pA であった。また、視床下部 A11 電気刺激後に EPSC 発生頻度の減少 (39 / 46 ニューロン (84.7%)、コントロール比 61.9 ± 3.0 %) 及び振幅の減少 (24 / 46 ニューロン

(52.2%)、コントロール比 $82.2 \pm 1.5\%$) が観察された。また、A11 電気刺激によって発生する外向き電流と EPSC の抑制効果とともに D2-like 受容体拮抗薬である sulpiride にて阻害されるか検討した。脊髄に sulpiride ($100\mu\text{M}$) 灌流投与しながら、視床下部 A11 領域を電気刺激すると外向き電流は抑制され、その平均振幅は $1.6 \pm 0.6\text{ pA}$ であった ($n=16$)。また視床下部 A11 領域を電気刺激することで得られる EPSC の抑制効果も sulpiride 存在下では阻害された。頻度の抑止効果はコントロール時の平均 $91.3 \pm 4.7\%$ ($n=17$)、振幅の抑制効果はコントロール時の $98.7 \pm 3.3\%$ であり、これらは sulpiride 非存在下で得られた視床下部 A11 電気刺激による EPSC の抑制効果と比較すると有意に抑制されていた ($P < 0.01$)。

我々はドーパミン作動神経系に下行性疼痛抑制系としての作用があると仮説を立て、本研究を行った。今回、*in vivo* パッチクランプ法にてドーパミンは脊髄膠様質細胞の膜を過分極させる作用を有することを確認した。その機序として、脊髄膠様質細胞には D2-like 受容体が発現していて、ドーパミンによって活性化されると細胞膜 G 蛋白質の活性化を介してカリウムチャンネルが開くことで細胞膜が過分極することが判明した。このドーパミンによる膜過分極応答はシナプス後性作用であるが、EPSC の発生頻度も抑制されたことからシナプス前性にもドーパミンは作用していることが判明した。さらに、今回の *in vivo* 実験において、ドーパミンは脊髄レベルにおいて実際の皮膚侵害・非侵害刺激に対して抑制作用を有することが証明された。ドーパミンは脊髄、後根神経節において産生されないことから、脊髄に投射するドーパミン作動性神経系としては視床下部脊髄路が考えられたが、未だ不明のままであった。今回、視床下部 A11 領域を電気刺激するとドーパミンを脊髄に灌流したときと同様の応答が観察された。これらの結果から、末梢皮膚刺激が後根神経節を經由して後角感覚ニューロンに伝わるが、その刺激は視床下部 A11 ニューロンから投射されるドーパミンによってシナプス前性・後性に制御を受けている、つまり、ドーパミン作動性神経系は下行性疼痛抑制系として機能していることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Yamada H, Takeda D, Fujita T,

Kumamoto E, Yoshida M : *In vivo* patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. *Pain* 152 : 95-105 (2011) 査読あり

DOI: 10.1016/j.pain.2010.09.034

- ② Taniguchi W, Takiguchi N, Kaito Y, Nishio N, Kawasaki Y, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T : Cellular mechanism of dopaminergic inhibitory descending pathway activated by electrical stimulation of A11 in the hypothalamus —*in vivo* patch-clamp analysis—. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord* 33 : 30-35 (2011) 査読あり
- ③ Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Takiguchi N, Sugiura Y, Yoshida M : *In vivo* patch-clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on dorsal horn neurons in the spinal cord. *Pain Research* 26 : 137-144 (2011) 査読あり
- ④ 谷口 亘, 吉田宗人, 中塚映政 : 【疼痛性疾患に対する薬物療法—最近の進歩】鎮痛薬の作用機序—オピオイド—. *整形・災害外科* 54 : 1477-1483 (2011) 査読なし
- ⑤ 谷口 亘, 中塚映政, 瀧口登, 海戸弥恵, 西尾尚子, 吉田宗人 : 下行性疼痛抑制系として作用する脊髄内ドーパミン作動神経系—*in vivo* patch-clamp 法を用いた解析, *日本運動器疼痛学会誌* 3 : 36-40 (2011) 査読あり
- ⑥ Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Abe T, Mine N, Takiguchi N, Yamada H, Yoshida M : *In vivo* patch-clamp analysis of dopaminergic descending inhibitory pathway in the spinal dorsal horn. *ScienceMED* 2(2) : 137-142 (2011) 査読なし
- ⑦ 谷口 亘 : *In vivo* パッチクランプ法. *整形外科* 62(3) : 262 (2011) 査読なし
- ⑧ Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Abe T, Mine N, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M : *In vivo* patch-clamp analysis of dopaminergic nervous system in spinal substantia gelatinosa neurons. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord* 32 : 10-16 (2010) 査読あり

5.

[学会発表] (計 11 件)

- ① Taniguchi W, Takiguchi N, Kaito Y, Nishio N, Kawasaki Y, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T : Dopaminergic inhibitory descending

- pathway is activated by electrical stimulation of A11 in the hypothalamus. -in vivo patch-clamp analysis-. 41th Annual Meeting of Neuroscience, 2011.11.16, Washington D.C.
- ② 谷口亘、中塚映政、瀧口登、宮崎展行、阿部唯一、峰巨、吉田宗人：視床下部 A11 電気刺激によるドーパミン作動性下行性抑制系の活性化機構 -in vivo パッチクランプ法を用いた機能解析-. 第 26 回日本整形外科学会基礎学術集会 2011.10.21, 前橋
- ③ 谷口亘、瀧口登、海戸弥恵、西尾尚子、川崎康彦、中塚映政：視床下部 A11 電気刺激によりドーパミン作動性下行性抑制系は活性化する -in vivo パッチクランプ法を用いた機能解析-. 第 33 回日本疼痛学会 2011.7.22, 松山
- ④ 谷口亘、瀧口登、海戸弥恵、西尾尚子、川崎康彦、宮崎展行、吉田宗人、中塚映政：視床下部 A11 細胞電気刺激によるドーパミン神経作動性下行性疼痛抑制系の活性化 -in vivo パッチクランプ法を用いた機能解析. 第 33 回脊髄機能診断研究会. 2011.2.5, 東京
- ⑤ Taniguchi W, Nakatsuka T, Takiguchi N, Miyazaki N, Yamada H, Yoshida M : In Vivo Patch-Clamp Analysis of Dopaminergic Antinociceptive Actions in the Spinal Cord. 56th Annual Meeting of ORS, 2011.1.13-16, Long Beach
- ⑥ 谷口亘、中塚映政、瀧口登、海戸弥恵、西尾尚子、吉田宗人：脊髄内ドーパミン作動神経系の下行性疼痛抑制系として作用する - in vivo patch-clamp 法を用いた解析 -. 第 3 回日本運動器疼痛研究会. 2010. 11.27, 名古屋
- ⑦ Taniguchi W, Nishio N, Takiguchi N, Miyazaki N, Kawasaki Y, Takeda D, Yoshida M, Nakatsuka T : In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic descending inhibitory pathway in the spinal dorsal horn. 40th Annual Meeting of Neuroscience, 2010.11.16, San Diego
- ⑧ Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Abe T, Takiguchi N, Kawasaki Y, Takeda D, Yoshida M : In vivo patch-clamp analysis of dopaminergic descending inhibitory pathway in the spinal dorsal horn. 7th Combined Meeting of Orthopaedic Research Societies, 2010.10.16-20, Kyoto
- ⑨ 谷口亘、中塚映政、宮崎展行、阿部唯一、瀧口登、吉田宗人：脊髄後角におけるド

パミン疼痛抑制系の作用機序 -in vivo パッチクランプ法を用いた末梢刺激の解析-. 第 25 回日本整形外科学会基礎学術集会 2010.10.15, 京都

- ⑩ Taniguchi W, Nakatsuka T, Miyazaki N, Abe T, Takiguchi N, Kawasaki Y, Takeda D, Fujita T, Kumamoto E, Yoshida M : In vivo patch-clamp analysis of the actions of dopaminergic nervous system in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal cord. Neuro2010 (第 3 3 回日本神経科学大会). 2010.9.2, 神戸
- ⑪ 谷口亘、中塚映政、宮崎展行、藤田亜美、熊本栄一、吉田宗人：in vivo patch-clamp 法を用いた脊髄後角におけるドーパミン疼痛抑制作用機序の解析. 第 3 2 回日本疼痛学会. 2010. 7.2, 京都

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 亘 (TANIGUCHI WATARU)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：20453194

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：