

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380170

研究課題名(和文) 遺伝子改変マウスにおける痛覚反射と運動反射の定量的解析

研究課題名(英文) Quantitative analysis of nociceptive and motor reflexes in genetically modified mice

研究代表者

伊藤 茂男 (ITO, Shigeo)

北海道大学・(連合)獣医学研究科・特任教授

研究者番号：40109509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：2受容体作動薬デクスメトミジンとキシラジンは、脊髄の運動及び痛覚反射電位を抑制した。2A受容体機能的欠損D79Nマウスでは、両薬物の痛覚反射電位の抑制は減弱したが、運動反射電位の抑制は変わらなかった。2作動薬の鎮痛効果には2A受容体が、運動反射の抑制にはそれ以外の機序が関与していると考えられる。脊髄神経活動に影響を与えるアデノシンは、アデノシン代謝酵素阻害薬によってアストロサイトから放出されること、またCa²⁺除去ではATPが放出されアデノシンに代謝されることが示された、一方、硫化水素はニューロンに発現する合成酵素CST/MPSTで産生され、神経活動に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：alpha-Adrenoceptor agonists, dexmedetomidine and xylazine inhibited spinal motor and nociceptive reflex potentials. In the alpha2A receptor-functional deficient D79N mice, the inhibitory effect on nociceptive but not motor reflex potentials by these agonists was attenuated. alpha2A-Receptors are suggested to be involved in the alpha2-agonist-evoked analgesia but not the inhibition of motor reflex. Adenosine and hydrogen sulfide (H2S) influence spinal neuronal activity. In the spinal astrocytes, the adenosine metabolic inhibitors released adenosine, while Ca²⁺-removal released ATP, which was degraded to adenosine. In the neurons, H2S is produced by the synthase CST/MPST.

研究分野：獣医薬理学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学，基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：脊髄 新生仔マウス 鎮痛薬 反射電位 キシラジン 2受容体 デクスメトミジン

1. 研究開始当初の背景

(1) 動物の疼痛管理は、獣医診療のみならず動物愛護の観点からも極めて重要であるが、その疼痛管理の理論的な根拠はしっかりしていない。獣医療では鎮静・鎮痛薬として多用される α_2 受容体作動薬は、受容体サブタイプ特異的な作動薬・拮抗薬に乏しく、その作用メカニズムの解析が進んでいない。現在、遺伝子改変マウスが多数作出され、行動異常に関わる遺伝子が報告されているが定性的な行動解析に基づいているものが多く、定量性にかけてその結論は曖昧なものが多い。遺伝子改変マウスを用いて痛覚反射と運動反射に必須な遺伝子の機能をそれぞれ分離して電気生理学的に検討することができれば、すなわち定量的解析による詳細なメカニズムの検討が可能になる。

(2) 痛覚反射と運動反射の定量的な解析により新たな鎮痛薬など脊髄に作用する薬物の開発が可能となるが、その候補化合物としてアデノシンや硫化水素が挙げられる。アデノシンは虚血などの病態で細胞外に蓄積し、神経活動を抑制することが知られているが、鎮痛作用をもたらすことも報告されている。中枢神経におけるアデノシンの主要な産生源はアストロサイトと考えられているが、その放出機序は不明である。また、硫化水素の産生細胞は特定されていない。アデノシンや硫化水素の放出機構を明らかにすることで、新規鎮痛薬の開発につなげることができる。

2. 研究の目的

(1) 新生仔マウス摘出脊髄標本から反射電位を記録し、 α_2 受容体作動薬の効果を解析することが可能な実験系を構築する。各種 α_2 受容体作動薬や関連薬物を適用し、痛覚反射と運動反射に対する効果を検討する。

(2) α_2 受容体に変異を持つ遺伝子改変マウスを導入し、痛覚反射と運動反射を定量的に解析することで、 α_2 受容体作動薬の作用機構を明らかにする。

(3) アデノシンはグリア伝達物質の候補の一つであり、脊髄神経に対する抑制効果を示すことで、鎮痛作用をもたらすことが知られている。そこで、脊髄アストロサイトからのアデノシン放出機構を明らかにする。

(4) 硫化水素の神経系細胞における産生・放出機構を検討し、その性質を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 摘出脊髄の反射電位測定

C57BL/6J 及び α_2A 受容体機能を著しく欠損した D79N (B6.129S2-Adra2a^{tm1Lel}/J) マウスを使用した。D79N マウスは変異をホモで持つ親マウスの交配により生まれた仔マウスをジェノタイピングで D79N ($\alpha_2A^{-/-}$) 及び野生型 ($\alpha_2A^{+/+}$) に分類した。

生後 1 週間以内の新生仔マウスより脊髄を摘出し、半裁脊髄標本作製した。酸素 (95%) + 二酸化炭素 (5%) で通気した人工脳脊髄液で灌流した実験槽内 (27 ± 2) に標本を設置した。脊髄後根に刺激電極を、脊髄前根には記録電極をそれぞれ取り付け付けた。後根の電気刺激により前根から痛覚反射電位 (sVRP: 遅発性前根電位) と運動反射電位 (MSR: 単シナプス反射電位) を記録した。痛覚反射電位 sVRP は曲線下面積を、運動反射電位 MSR は振幅を測定した (図 1)。各薬物は人工脳脊髄液に加え、脊髄へ適用した。

生後 1 週間以内の新生仔マウスより脊髄を摘出し、半裁脊髄標本作製した。酸素 (95%) + 二酸化炭素 (5%) で通気した人工脳脊髄液で灌流した実験槽内 (27 ± 2) に標本を設置した。脊髄後根に刺激電極を、脊髄前根には記録電極をそれぞれ取り付け付けた。後根の電気刺激により前根から痛覚反射電位 (sVRP: 遅発性前根電位) と運動反射電位 (MSR: 単シナプス反射電位) を記録した。痛覚反射電位 sVRP は曲線下面積を、運動反射電位 MSR は振幅を測定した (図 1)。各薬物は人工脳脊髄液に加え、脊髄へ適用した。

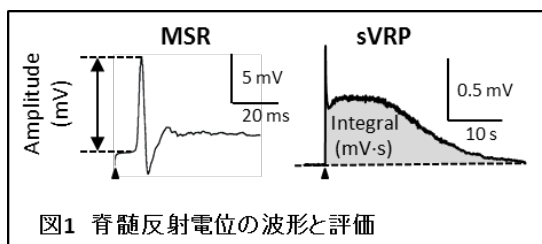


図1 脊髄反射電位の波形と評価

(2) 脊髄アストロサイトのアデノシン放出

新生仔ラットより脊髄を摘出し、酵素処理により脊髄細胞を分離・培養した。約 1 週間培養の後に、250 rpm で 12 時間以上振盪し培養フラスコ底面に付着したまま残るアストロサイトを選別培養した。アストロサイトマーカーである抗 GFAP 抗体を用い、ほぼ全てが GFAP 陽性細胞であることを免疫染色法で確認した (図 2)。

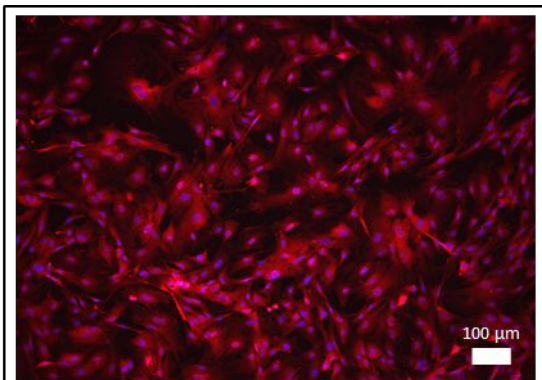


図2 脊髄アストロサイトの抗GFAP抗体染色像

脊髄アストロサイトを各種薬物や低 Ca^{2+} 溶液に暴露し、溶液中に放出されるアデノシン及びアデニンヌクレオチド量をエテノ化した後、HPLC 法によって蛍光検出器で測定した。また ATP 量はルシフェリン/ルシフェラーゼ法でも測定した。アストロサイトのタンパク質量当たりの放出量として算出した。

脊髄アストロサイトにおけるヌクレオシドトランスポーターの発現は、RT-PCR 法で検出した。

(3) 神経細胞における硫化水素産生

神経細胞モデル PC12 細胞，ラット後根神経節及び脳をホモゲナイズした。酵素反応による硫化水素産生経路として知られている CSE (cystathionine γ -lyase)，CBS (cystathionine β -synthase) 及び CAT (cysteine aminotransferase)/MPST (mercaptopyruvate sulfurtransferase) を介した 3 経路について，それぞれの硫化水素合成酵素の基質を添加し，産生される硫化水素をメチレンブルー法で測定した。

硫化水素合成酵素のタンパク発現をウエスタンブロット法と免疫細胞染色法により，検討した。

4. 研究成果

(1) マウス摘出脊髄の反射電位に対する α_2 受容体作動薬の効果

C57BL/6J 及び野生型 ($\alpha_2A^{+/+}$) マウスにおいて， α_2 受容体作動薬のデクスメトミジンとキシラジンは，痛覚反射電位と運動反射電位を濃度依存性に抑制した。両薬物とも運動反射電位よりも痛覚反射電位をより強く抑制し，デクスメトミジンの力価は，キシラジンよりも約 1000 倍強かった。

D79N ($\alpha_2A^{-/-}$) マウスでは，運動反射電位に対する抑制効果は，デクスメトミジンとキシラジンのどちらも野生型と差は見られなかった。一方，痛覚反射電位に対する抑制効果は，野生型に比べてデクスメトミジンで大きく，キシラジンではわずかに減弱した (図 3)。

非特異的 α_2 受容体拮抗薬アチパメゾールは，D79N マウスで生じたデクスメトミジンの痛覚反射抑制効果を回復させたが，運動反射電位は回復させなかった。一方，アチパメゾールはキシラジンによる両反射電位の抑制効果を回復させなかった。

α_2C 受容体拮抗薬 JP1302，イミダゾリン I1 受容体拮抗薬 efaroxin 及び I2 受容体拮抗薬 idazoxan は，D79N マウスで生じたデクスメトミジンとキシラジンの痛覚及び運動反射電位抑制効果に影響を与えなかった。

α_2 受容体作動薬のデクスメトミジンとキシラジンは，主に α_2A 受容体を介して痛覚反射電位を抑制することが明らかになった。 α_2 受容体作動薬の鎮痛作用発現には α_2A 受容体サブタイプの活性化が重要な役割を果

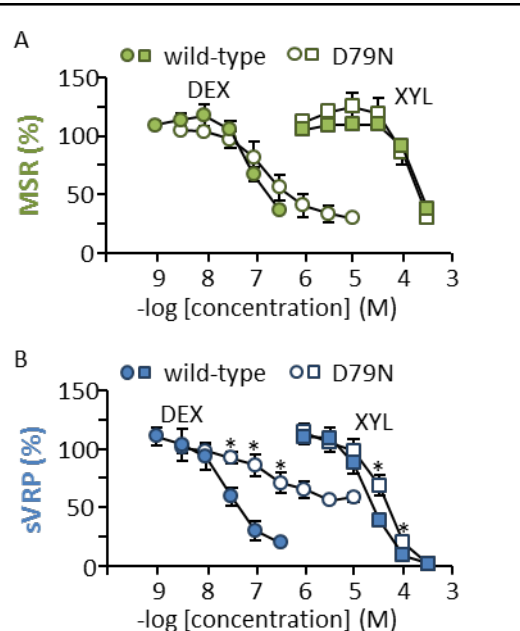


図3 D79N及び野生型マウスにおける α_2 受容体作動薬の反射電位抑制効果
デクスメトミジン (DEX) とキシラジン (XYL) による運動反射電位 (MSR: A) と痛覚反射電位 (sVRP: B) の抑制。

たしていると考えられる。また，キシラジンの痛覚反射抑制には α_2A 受容体を介さない機序が関与していることも示された。また，デクスメトミジンとキシラジンの運動反射抑制作用は， α_2 受容体活性化とは全く異なる機序が関与していることが示唆され，これらの効果が α_2 受容体作動薬の副作用などに関連している可能性がある。

(2) 脊髄アストロサイトからのアデノシン放出

ラット脊髄アストロサイトをアデノシンキナーゼ阻害薬 ABT-702 またはアデノシンデアミナーゼ阻害薬 EHNA で処置すると，濃度依存性に細胞外アデノシン量が増加した。このアデノシン増加効果は，両薬物の併用によって顕著に増強された (図 4)。この時，細胞外 ATP，ADP 及び AMP 量は変化しなかった。

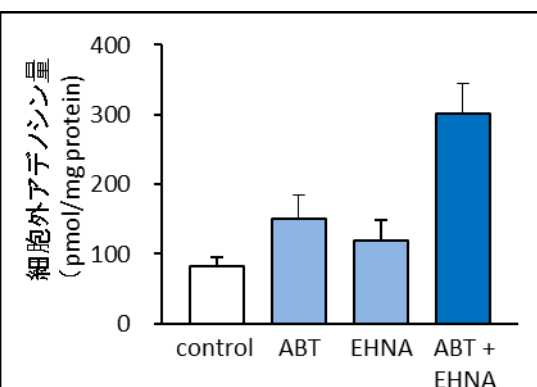


図4 アデノシン代謝阻害剤でのアデノシン放出

脊髄アストロサイトで、拡散型ヌクレオシドトランスポーター-ENT1, ENT2 及び濃縮型ヌクレオシドトランスポーター-CNT2 の発現が検出された。ABT-702/EHNA によるアデノシン増加反応は ENT2 阻害薬 NBTI/Dipyridamol で抑制された。

脊髄アストロサイトを Ca^{2+} 除去液で処置すると、細胞外アデノシン濃度は顕著に増加した。この時、細胞外 ATP, ADP 及び AMP 量も増加した。

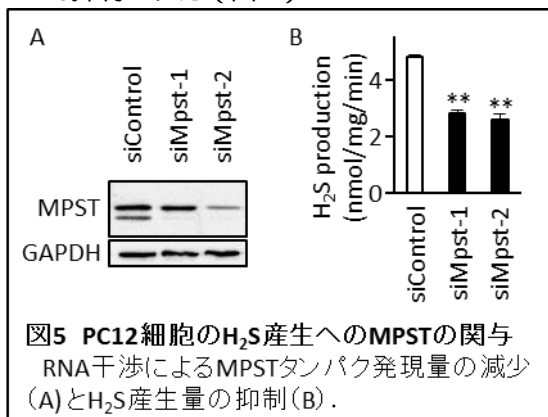
NBTI/Dipyridamol は Ca^{2+} 除去液によるアデノシン増加反応を増強した。Ecto-ATPase 阻害薬 POM-1 とギャップジャンクション阻害薬 carbenoxolone は、 Ca^{2+} 除去惹起アデノシン増加反応を抑制した。

アデノシン代謝阻害薬は、細胞外アデノシン量を増加されることが明らかとなった。アデノシンキナーゼ/デアミナーゼ活性が阻害されることで増加した細胞内アデノシンが、ENT2 を介して細胞外に放出されると考えられる。一方、細胞外 Ca^{2+} 除去下では、放出された ATP が細胞外で代謝されることで、結果的に細胞外アデノシン量が増加すると考えられる。ATP 放出経路として、ギャップジャンクションヘミチャネルの関与が示唆された。

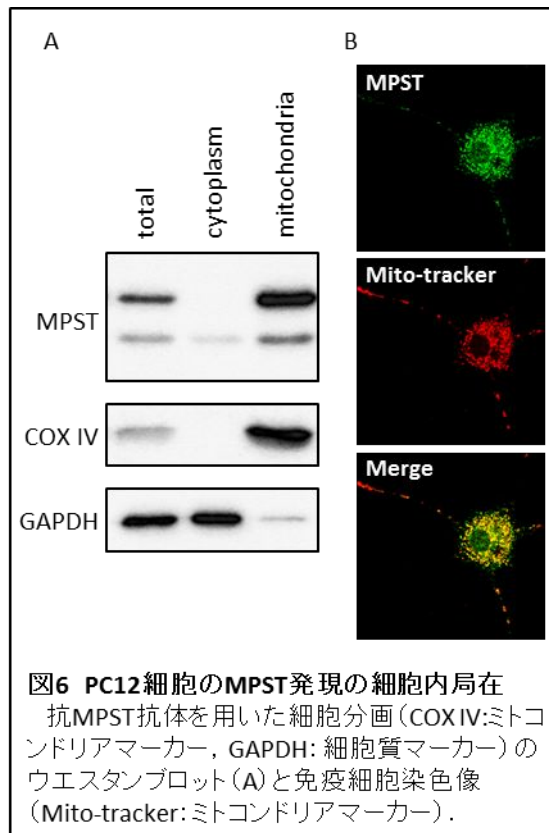
(3) 神経細胞における硫化水素合成酵素の発現と硫化水素産生能

中枢神経系組織である脳では、CBS と CST/MPST が発現していた。一方、末梢神経系組織である背根神経節と PC12 細胞では、CAT/MPST は発現していたが、CBS 発現量は低かった。CSE はどのサンプルでもほとんど発現が認められなかった。

PC12 細胞における硫化水素産生は、CAT 阻害薬 AOAA 及び MPST の RNA 干渉によって抑制された(図5)。



PC12 細胞と後根神経節の CAT/MPST は主にミトコンドリアに発現していた(図6)。



神経細胞は主に CST/MPST を発現しており、硫化水素産生の場合としてミトコンドリアが重要な役割を果たしていることが示唆された。脳の CBS による硫化水素産生にはアストロサイトなど神経細胞以外の細胞が関与していると考えられる。

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3件)

Miyamoto R, Otsuguro K, Yamaguchi S, Ito S. Contribution of cysteine aminotransferase and mercaptopyruvate sulfurtransferase to hydrogen sulfide production in peripheral neurons. J. Neurochem., in press. 査読有
DOI: 10.1111/jnc.12698.

Iwasaki T, Otsuguro K, Kobayashi T, Ohta T, Ito S. Endogenously released 5-HT inhibits A and C fiber-evoked synaptic transmission in the rat spinal cord by the facilitation of GABA/glycine and 5-HT release via 5-HT_{2A} and 5-HT₃ receptors. Eur. J. Pharmacol. (2013) 702, 149-157. 査読有
DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.01.058.

Kawamoto K, Otsuguro K, Ishizuka M, Ito S. Inhibitory effects of dopamine on spinal synaptic transmission via dopamine D1-like receptors in

neonatal rats. Br. J. Pharmacol. (2012)
166, 788-800.査読有
DOI:
10.1111/j.1476-5381.2011.01815.x.

〔学会発表〕(計 13 件)

宮本亮, Contribution of CAT/MPST to H₂S production in peripheral neurons, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 20 日, 東北大学 (仙台市)

氏家絢子, Inhibitory and excitatory effects of hydrogen sulfide on RIN14B cells, 第 87 回日本薬理学会年会, 2014 年 3 月 19 日, 東北大学 (仙台市)

Ryo Miyamoto, H₂S is produced in neuron through the two enzymes AST and MPST, The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), September 26, 2013, Hokkaido University (Sapporo), Japan

Ayako Ujike, Hydrogen sulfide releases 5-HT via activation of TRPA1 in RIN14B cells, The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), September 26, 2013, Hokkaido University (Sapporo), Japan
Takeshi Kobayashi, Contribution α 2A adrenoceptor to effect of α 2 agonists on spinal reflex potential, The 1st Sapporo Summer Seminar for One Health (SaSSOH), September 26, 2013, Hokkaido University (Sapporo), Japan

小林武志, デクスメトミジンとキシラジンの脊髄シナプス伝達抑制における α 2A-アドレナリン受容体の関与の違い, 第 156 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月 20 日, 岐阜大学 (岐阜市)

氏家絢子, RIN14B 細胞の細胞内 Ca²⁺濃度及び 5-HT 放出に対する硫化水素の作用, 第 27 回北海道薬物作用談話会, 2013 年 7 月 20 日, 酪農学園大学 (江別市)

乙黒兼一, アデノシン代謝阻害薬と細胞外 Ca²⁺除去によるラット脊髄アストロサイトでの細胞外アデノシン蓄積について, 第 155 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 3 月 30 日, 東京大学 (東京)

増本早苗, ラット脊髄アストロサイトにおけるアデノシン代謝酵素阻害薬及び細胞外 Ca²⁺除去による細胞外アデノシン増加, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

小林武志, α 2 アドレナリン作動薬の脊髄反射電位抑制効果における α 2A 受容体の関与について, 第 86 回日本薬理学会年会, 2013 年 3 月 23 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

増本早苗, ラット脊髄アストロサイトにおける ENT によるアデノシン輸送, 第

154 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月 16 日, 岩手大学 (盛岡市)

小林武志, マウス摘出脊髄における反射電位の電気生理学的及び薬理学的解析, 第 154 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 9 月 16 日, 岩手大学 (盛岡市)

Ken-ichi Otsuguro, Effects of adenosine on spinal neuronal activities: its contribution to hypercapnia-evoked depression, The 14th Seoul National University-Hokkaido University Joint Symposium, November 18, 2011, Seoul National University (Seoul), South Korea

〔その他〕

研究室ホームページ:

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/departmentnew/detail/basic/pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 茂男 (ITO, Shigeo)

北海道大学・大学院獣医学研究科・特任教授

研究者番号: 40109509

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

乙黒 兼一 (OTSUGURO, Ken-ichi)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授
研究者番号: 40344494