

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592330

研究課題名(和文) 副腎皮質ステロイドの非ゲノム作用を介する鎮痛作用

研究課題名(英文) Non-genomic antinociceptive effects of glucocorticoids on rat spinal cord

研究代表者

生駒 美穂 (ikoma, miho)

新潟大学・医歯(薬)学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30432082

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：副腎皮質ステロイドは術後痛や慢性疼痛に対し鎮痛効果をもつが、この主な機序は抗炎症作用と考えられてきた。この作用は核内の遺伝子転写を誘導するゲノム作用であるが、近年それより迅速な細胞膜上の受容体やイオンチャンネルに直接作用する非ゲノム作用もあると言われている。副腎皮質ステロイドの痛覚伝達に対する非ゲノム作用を明らかにすることであることを目的に、ヒドロコルチゾン、デキサメサゾンの作用をらっと脊髄スライス標本を用いたパッチクランプ法で調べた。その結果、それぞれの臨床使用濃度においては電気生理学的に変化を認めることはなかった。

研究成果の概要(英文)：Glucocorticoids play a significant role in the anti-inflammatory effects, however the mechanisms that systemic or epidural administrations of glucocorticoid reduce pain have not been clearly understood. Recent evidence shows that glucocorticoid might cause rapid effect through pathways other than the genomic pathway, which appears in seconds or a few minutes. Although these non-genomic effects have reported in many organs, there are few reports about the effect on sensory-related neuron until now. Glucocorticoid receptors have also been located in spinal cord dorsal horn neuron. To gain an understanding of the mechanisms, we investigated the rapid non-genomic effects of glucocorticoid, dexamethasone and hydrocortisone on excitatory synaptic transmission in the substantia gelatinosa (SG) neurons of the adult rat spinal cord. We found that dexamethasone and hydrocortisone did not alter presynaptic glutamate release.

研究分野：疼痛

キーワード：ステロイド 脊髄 疼痛 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

手術前または手術中にステロイド剤を投与しておくとして術後痛を抑えることが近年報告されている。また、脊椎疾患に起因する慢性痛に対してステロイド剤の硬膜外投与は鎮痛効果をもたらす。副腎皮質ステロイドには多種多様な生理作用があるが、鎮痛作用は主には抗炎症作用や抗浮腫作用に基づくと考えられる。しかし、副腎皮質ステロイドの疼痛反応への影響は本当にこれだけなのだろうか。1960年代に細胞内ステロイド受容体遺伝子が発見されてから、副腎皮質ステロイドの作用機序としてゲノム作用が広く知られてきた。副腎皮質ステロイドは容易に標的細胞の細胞膜を通過し、細胞質へと自由に拡散することができるため、細胞内ステロイド受容体と結合し複合体を作る。この複合体が細胞核に取り込まれ標的遺伝子の転写を誘導する結果、リポコルチンの生合成を促進する。リポコルチンがホスホリパーゼ A2 を阻害すると、プロスタグランジンとロイコトリエンの合成が抑制され抗炎症作用をもたらす。これが以前から知られているゲノム作用のひとつであるが、この反応が成立するには少なくとも 10 分以上かかる。一方、近年になって秒単位から数分以内に発現する副腎皮質ステロイドの非ゲノム作用も注目されている (図 1)。

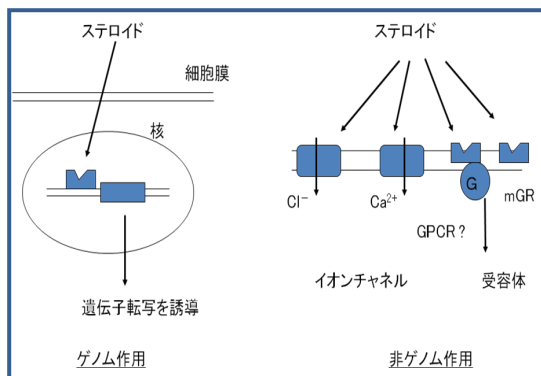


図1 ゲノム作用と非ゲノム作用 (概念図)

例えば中枢のストレス反応系 (視床下部、下垂体) では、副腎皮質ステロイドは細胞膜に

存在するグルココルチコイド受容体 (mGR) とミネラルコルチコイド受容体 (mMR) を介して、シナプス伝達の迅速な調節と膜イオン電流の調節をしている。このような非ゲノム反応が脊髄における痛覚伝達系にも存在するのではないかと推測される。過去の研究では脊髄のグルココルチコイド受容体を介する反応が神経障害性疼痛をかえって悪化させるという報告もあり、これが非ゲノム反応かどうか検証する必要がある。ストレス時に増加する副腎皮質ステロイドや治療に用いるステロイド剤に痛覚伝達を制御する作用があるかどうかは興味深い。

申請者はこれまでラット・マウスの脊髄標本を用いて電気生理学的手法 (パッチクランプ法) を行い、オピオイドや麻酔薬などが脊髄における痛覚伝達を制御することを報告してきた。したがってこの手法を用いることにより、副腎皮質ステロイドの脊髄後角の痛覚伝達に関する非ゲノム作用について解明できると考える。

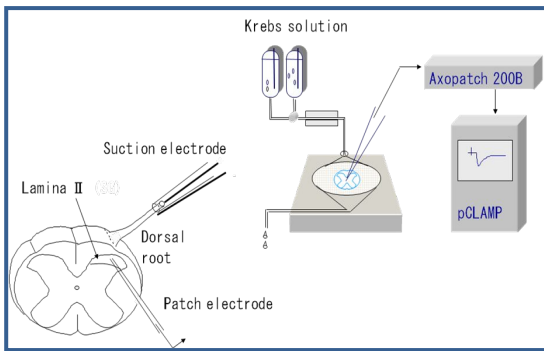
2. 研究の目的

脊髄スライス標本を用いた *in vitro* パッチクランプ法では一つの生きた脊髄後角ニューロンから電気活動を記録し、痛覚伝達における詳細なメカニズムを調べることができる。正常ラットにおいて、副腎皮質ステロイドが脊髄後角における痛覚伝達に対しどのような影響を及ぼすか調べることを目的とした。

3. 研究の方法

正常ラットにおける脊髄スライス標本の作成およびパッチクランプ記録 (図 2)

成熟ラットより腰仙部脊髄を摘出し後根を付した厚さ約 600 μm の脊髄横断スライス標本を作成する。ガラス微小電極を脊髄後角ニューロンに誘導し、ホールセルパッチクランプ記録を行う。得られた電流は、パッチクランプ用増幅器: Axopatch 200B (Molecular



Devices)により増幅し、コンピュータに記録後、データ解析用ソフトウェア：pCLAMP10 (Molecular Devices)を用いて解析する。

(1) 興奮性シナプス電流の解析

保持膜電位を静止膜電位付近に固定し、吸引電極による脊髄後根電気刺激により、記録細胞に刺激誘起の興奮性シナプス後電流 (e-EPSC) が観察される。ヒドロコルチゾン、デキサメサゾン灌流投与すると e-EPSC がどのような影響を受けるか観察記録する。

(2) 抑制性シナプス電流の解析

0mV 付近に膜電位固定し、記録細胞に電気刺激による抑制性シナプス後電流 (e-IPSC) を誘起し、副腎皮質ステロイドのヒドロコルチゾン、デキサメサゾン、によって e-IPSC がどのような影響を受けるか観察記録する。

(3) 自発性シナプス後電流の解析

シナプス伝達の変化が認められ場合、自発性の興奮性シナプス後電流 (s-EPSC) および抑制性シナプス後電流 (s-IPSC) が、ヒドロコルチゾン、デキサメサゾンの灌流投与でこれらの発生頻度と大きさがどのような変化を受けるか観察する。発生頻度と振幅の解析によってそれがシナプス伝達のどの段階 (シナプス前かシナプス後か) での作用であるか判定することが可能となる。

(4) 脊髄後角ニューロンに対する直接作用

ヒドロコルチゾン、デキサメサゾンの作用によってイオンチャネルを介して流れる電流の有無を観察する。膜電位を変化させ、どのイオンチャネルを介するか検索する。

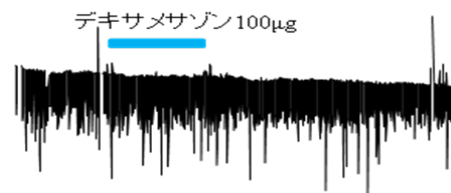
4. 研究成果

(1) ヒドロコルチゾンを灌流投与すると

e-EPSC がどのような影響を受けるか観察記録した。ヒドロコルチゾンの濃度を 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、e-EPSC の振幅は変化しなかった。またデキサメサゾンも 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、e-EPSC の振幅は変化しなかった。

(2) ヒドロコルチゾンを灌流投与すると e-IPSC がどのような影響を受けるか観察記録した。ヒドロコルチゾンの濃度を 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、e-EPSC の振幅は変化しなかった。またデキサメサゾンも 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、e-IPSC の振幅は変化しなかった。

(3) シナプス伝達の変化は認められなかったが、自発性の興奮性シナプス後電流 (s-EPSC) および抑制性シナプス後電流 (s-IPSC) が、ヒドロコルチゾン、デキサメサゾンの灌流投与でこれらの発生頻度と大きさがどのような変化を受けるか観察した。その結果、ヒドロコルチゾンの濃度を 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、それぞれの電流の発生頻度と振幅は変化しなかった。デキサメサゾンの濃度を 10 μ M、30 μ M、100 μ M、300 μ M と変化させて灌流投与したが、それぞれの電流の発生頻度と振幅は変化しなかった。



5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 山本豪, 佐々木美佳, 生駒美穂, 紙谷義孝, 馬場洋, 河野達郎 神経ステロイド DHEAS はラット脊髄後角ニューロンのシナプス伝達を修飾し痛覚伝達を増強する 日本麻酔科学会第 62 回学術総会 2015 年 5 月

28～30日 神戸ポートピアホテル（神戸市）
（2）山本豪，生駒美穂，紙谷義孝，馬場洋，河野達郎 神経ステロイド DHEAS はラット脊髄後角においてシグマ1受容体とNMDA受容体を介して痛覚増強作用を発揮する 日本麻酔科学会第62回学術総会 2014年5月15～17日 パシフィコ横浜（横浜市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

生駒 美穂（IKOMA Miho）

新潟大学・医歯（薬）学総合研究科・特任准教授

研究者番号：30432082

(2) 研究分担者

河野 達郎（KOHNO Tatsuro）

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：00313536