

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：34438

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791558

研究課題名(和文)活性化ミクログリアが誘導する脊損後疼痛 - in vivoパッチクランプ法による解析

研究課題名(英文) Activated microglia induce neuropathic pain after spinal cord injury -in vivo patch-clamp analysis-

研究代表者

谷口 亘 (TANIGUCHI, WATARU)

関西医療大学・保健医療学部・准教授

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、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷(Spinal cord injury: SCI)後疼痛モデルラットを作成し、損傷レベルより下位の脊髄後角でin vivoパッチクランプ法により自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)の解析を行った。SCIモデル群はコントロール群よりsEPSCの頻度が増強していた。このことから、脊髄損傷後疼痛では損傷部より下位の非損傷脊髄内において、何らかの興奮性の神経可塑的变化が生じ、中枢性感作の状態になっていると考えられた。次にこのSCIモデルにミクログリア活性化阻害薬のミノサイクリンを灌流投与することでsEPSCの増強に抑制が得られるか検討したが、予想に反してsEPSCは減少を認めなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanisms of neuropathic pain after spinal cord injury (SCI) by in vivo patch-clamp methods. We analyzed the spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) of the dorsal horn neurons in below injury level. The average frequency of the sEPSCs in the SCI model rats was significantly larger than that in the sham model rats. This result suggests that the spinal excitatory synaptic plasticity was produced at the dorsal horn neurons in below injury level of the SCI pain model. Next, we examined the effect of the microglial activity inhibitor, Minocycline onto the excitatory synaptic transmission of SCI model rats. Contrary to our expectations, the application of Minocycline did not reduce the frequency of sEPSCs in the SCI model rats.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：脊髄損傷後疼痛 in vivo パッチクランプ法 ミクログリア 脊髄損傷 spinal cord injury 神経障害性疼痛 神経可塑性 中枢性感作

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は後遺症として損傷レベル以下の運動神経麻痺と感覚障害により ADL を著しく制限する。一方、脊髄損傷後疼痛は一般的にあまり注目されていないが、運動神経麻痺や感覚障害といった後遺症に匹敵するあるいはそれ以上の ADL 制限をもたらす。我が国においても脊髄損傷患者の約 70% が疼痛を有すると報告されている。脊髄損傷後疼痛は神経障害性難治性疼痛であり、程度の強いものはアロディニア様の異常知覚を生じる。一般的な NSAIDs やオピオイドといった鎮痛薬は効果が薄く、新たな作用機序の治療薬や治療法の開発が待たれている。しかしながら、脊髄損傷後疼痛が発生するメカニズムは複雑でいまだ不明な点が多い。近年、末梢神経損傷モデルを用いた動物実験において神経障害性疼痛にグリア細胞、特にミクログリアが大きく関与しているとの報告が散見されるようになり、中枢神経傷害性の脊髄損傷後疼痛の発生機序にもミクログリアが関与し、神経系の可塑的变化を惹起している可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の主な目的は脊髄損傷後難治性疼痛の発生機序にミクログリアが関与しているかどうかを電気生理学的に解析することにある。まず、脊髄損傷後疼痛の責任病巣を明らかにする。脊髄損傷後疼痛はその損傷レベルのみならず、むしろ損傷レベルとかけ離れた上位レベルや下位レベルでの痛みが強く、その機序は複雑である。つまり脊髄損傷レベルとは別の損傷のないレベルの脊髄後角が疼痛の原因であると考えがこのことを確認する。このような解析には、従来の脊髄スライス標本による解析では不十分であり、脊髄損傷モデルラットを作成し、これに *in vivo* パッチクランプ法を適用し、単一細胞の神経活動をリアルタイムに解析することで解析を行う。脊髄スライス標本では脊髄間の情報伝達は中断されるが、*in vivo* パッチクランプ法は個体を生かしたまま記録する方法であり、保存された状態で記録できる。つまり、脊髄損傷レベルからの影響を排除せずに、その他のレベルの脊髄後角感覚細胞の電気活動の記録が可能となる。脊髄損傷モデルラットを用いて、モデル群と Sham 群での興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic currents: EPSC) の発生頻度ならびに振幅を比較し、モデル群で脊髄後角感覚細胞に興奮性の神経可塑性が生じていることを *in vivo* パッチクランプ法を用いて確認する。次に、この興奮性の発現にミクログリアの活性化が関与するか検討する。そこでミクログリア活性化抑制剤であるミノサイクリンを脊髄損傷モデルラットの脊髄に灌流投与することで EPSC の興奮性を抑制しているか検討する。

3. 研究の方法

《脊髄損傷後疼痛モデル作成》

ラット脊髄損傷後疼痛モデルを作成した。脊髄損傷後疼痛は受傷レベルの上下位レベルいずれにも生じるが中下位胸髄レベルで損傷後の腰椎レベルで発生する below level の疼痛が強いため、モデルは below level を作成した。雄性 Sprague-Dawley ラットを 5 週齢の時点で不全脊髄損傷モデルを作成した。均質なモデルを作成するため、機械的圧迫モデルを IH Impactor を用いて Th9 レベルで 200 kdyn で 1 秒間圧迫することによって作成する。疼痛は von Frey test で評価し、術後 1 週 (6 週齢) の時点で下肢に allodynia 様の反応が出現するのを確認して電気生理学的実験に使用した。本研究では Th9 椎弓切除のみを Sham ラット群とする。脊髄損傷レベル (Th9) は術後癒着が強いが、*in vivo* パッチクランプ法で記録するレベル (Th12-L2) とは異なるため、展開・記録が可能である。

《*in vivo* パッチクランプ法》

In vivo パッチクランプ法に関しては Taniguchi (Pain, 2011) による。ラットをウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5g/kg) で麻酔後、胸腰椎部に縦切開を行い、Th12 から L2 まで椎弓切除術を行う。次にラットを脊髄固定器で固定し、皮切部の辺縁を引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36 の酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流する。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、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、クモ膜と軟膜に微細ハサミ、鑷子を用いて電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を終える。マイクロマニピュ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。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行う。記録細胞は第 1 層の膠様質を狙うが、記録電極を刺入する深さからある程度の同定は可能である (脊髄表面から約 150 μm 以内)。

4. 研究成果

1) 脊髄損傷後疼痛の責任病巣、神経可塑性の解析

脊髄損傷後疼痛の責任病変が脊髄損傷レベルとはかけ離れた下位レベルの脊髄後角であることを確認する。脊髄損傷モデル群 (Spinal cord injury モデル: SCI モデル) と Sham 群で EPSC の発生頻度ならびに振幅を比較、神経系の興奮性の可塑的变化が生じているかを検討した。腰膨大部レベルで脊髄膠様質ニューロンから *in vivo* パッチクランプ法により sEPSC を記録すると、SCI モデル群における sEPSC の平均頻度は $14.3 \pm 1.4\text{Hz}$ で、

平均振幅は 16.0 ± 1.6 pA であった ($n=30$)。一方、Sham 群の sEPSC の平均頻度は 9.0 ± 1.0 Hz で、平均振幅は 12.3 ± 0.6 pA であり ($n=30$)、両群間において頻度に関して統計学的に有意差を認めた。これらの結果から脊髄損傷後疼痛 below level 型は損傷部より下位の正常脊髄内において、何らかの興奮性の可塑的变化が生じていると考えられた。

2) ミクログリア活性化抑制剤ミノサイクリン投与による解析

SCI モデルの sEPSC の増強にミクログリアが関与しているか、ミクログリア活性化阻害薬のミノサイクリンを灌流投与することで解析を行なった。SCI モデルにおけるミノサイクリンの灌流投与前後での sEPSC の変化率は頻度が $115.4 \pm 22.4\%$ で、平均振幅は $107.3 \pm 14.8\%$ であった ($n=9$)。当初の仮説では抑制がかかると予想していたが、仮説に反してこれらの結果は増強傾向を認めた。今後、この増強傾向が有意差をもった反応であるのか、さらに n 数を増やし、検討を行いたい。また、灌流投与のみでなく、SCI 作成時にミノサイクリンを脊髄内注、静注するモデルを作成することで SCI 単独群と比較して sEPSC の変化を解析する予定である。

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 6 件)

1. 谷口 亘, 吉田 宗人, 中塚 映政. 【慢性疼痛と原因療法】P2X 受容体を介した慢性疼痛メカニズムと鎮痛. 臨床整形外科 2013; 48(12) 1169-1174
2. Taniguchi W, Nishio N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Sonekatsu M, Yoshida M, Nakatsuka T. TRPV1 channels induce Knee osteoarthritis pain -in vivo patch-clamp analysis- Pain Res 2014 29 (3) (in press)
3. Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T: Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. Neuroscience. 2013. 247: 201-12 doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.023.
4. 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. The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord 33, 30-35, 2013

5. 谷口 亘, 吉田 宗人, 中塚 映政: 脊髄メカニズム. Bone Joint Nerve, 5, 17-22, 2012
6. Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W, Hashizume H, Yamada H, Miyazaki N, Nishio N, Nakatsuka T: Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. Mol Pain, 2012

[学会発表](計 17 件)

1. Taniguchi W, Nishio N, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Sakurai Y, Abe T, Mine N, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T: Activation of TRPV1 channels is involved in knee osteoarthritis pain -in vivo patch-clamp analysis-. 43rd Annual Meeting of Society for Neuroscience, San Diego, 2013.11.9-13
2. 谷口 亘, 瀧口 登, 山 中 学, 西 尾 尚 子, 清 行 康 邦, 櫻 井 悠 加, 吉 田 宗 人, 中 塚 映 政: TRPV1 チャネルを介した変形性膝関節症性疼痛-in vivo パッチクランプ法を用いた解析-. 第 35 回日本疼痛学会, 大宮, 2013. 07. 12-13
3. 谷口 亘, 瀧口 登, 山 中 学, 西 尾 尚 子, 峰 巨, 阿 部 唯 一, 宮 崎 展 行, 吉 田 宗 人, 中 塚 映 政: TRPV1 チャネルは変形性膝関節症性疼痛を増強する-in vivo パッチクランプ法を用いた解析-. 第 28 回日本整形外科学会基礎学術集会, 千葉, 2013. 10. 16-18
4. 谷口 亘, 杉 村 弥 恵, 山 中 学, 西 尾 尚 子, 曾 根 勝 真 弓, 吉 田 宗 人, 中 塚 映 政: 情 動 中 枢 の 帯 状 回 は 脊 髄 後 角 に 下 行 性 疼 痛 賦 活 系 を 形 成 す る. 第 6 回 日 本 運 動 器 疼 痛 学 会, 神 戸, 2013. 12. 7-8
5. 谷口 亘, 瀧口 登, 山 中 学, 西 尾 尚 子, 吉 田 宗 人, 中 塚 映 政: TRPV1 は 変 形 性 膝 関 節 症 を 増 強 す る -in vivo パッチクランプ法を用いた解析-. 第 11 回整形外科痛みを語る会, 郡山, 2013. 07. 6-7
6. 西 尾 尚 子, 谷 口 亘, 三 宅 悠 介, 清 行 康 邦, 山 中 学, 曾 根 勝 真 弓, 阿 部 唯 一, 瀧 口 登, 吉 田 宗 人, 中 塚 映 政. ラット脊髄膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼす CGRP の作用. 第 35 回脊髄機能診断研究会, 東京, 2014. 02. 1
7. 前 中 悠 加, 谷 口 亘, 瀧 口 登, 杉 村 弥 恵, 宮 崎 展 行, 吉 田 宗 人, 西 尾 尚 子, 清 行 康 邦, 松 川 澄, 中 塚 映 政: 脊 髄 膠 様 質 細 胞 に お け る 抑 制 性 シ ナ プ ス 伝 達 に 対 す る 活 性 酸 素 の 作 用. 第 34 回 脊 髄 機 能 診 断 研 究 会, 東 京, 2012. 02
8. 瀧 口 登, 谷 口 亘, 山 田 宏, 橋 爪 洋, 宮 崎 展 行, 峰 巨, 中 塚 映 政, 吉 田 宗 人: 腰 神 経 根 傷 害 部 位 で 根 性 疼 痛 の 発 現 強 度 に 差 は 生 じ る の か -動 物 モ デ ル を 用 い た 行 動 学, 組 織 学, 電 気 生 理 学 的 解 析 -. 第 41 回

- 日本脊椎脊髄病学会, 久留米, 2012. 04
9. 瀧口登, 吉田宗人, 谷口亘, 杉村弥恵, 西尾尚子, 中塚映政: 末梢神経傷害部位の違いから生じる根性疼痛の発現について. 第 34 回日本疼痛学会, 熊本, 2012. 07
 10. 谷口亘, 吉田宗人, 中塚映政: シンポジウム 痛み研究の最前線 慢性痛分子メカニズム 慢性疼痛における脊髄シナプス伝達の可塑性. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10
 11. 谷口亘, 杉村弥恵, 瀧口登, 宮崎展行, 峰巨, 阿部唯一, 西尾尚子, 吉田宗人, 中塚映政: 前帯状回皮質の電気刺激による脊髄後角ニューロンの興奮性の増強. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10
 12. 瀧口登, 谷口亘, 山田宏, 橋爪洋, 宮崎展行, 峰巨, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神経の傷害部位の違いは神経障害性疼痛の発現にいかなる影響を与えるか. 第 27 回日本整形外科学会基礎学術集会, 名古屋, 2012. 10
 13. 谷口亘, 中塚映政: シンポジウム 脊髄由来の難治性疼痛病態解明と各種治療法 脊髄後角における慢性疼痛の発生機序について. 第 47 回日本脊髄障害病医学会, 静岡, 2012. 10
 14. 谷口亘, 松村伸治, 伊藤誠二, 中塚映政: シンポジウム 痛みを可視化する 脊髄後角神経細胞のリアルタイムイメージング. 第 5 回日本運動器疼痛学会, 東京, 2012. 11
 15. 瀧口登, 谷口亘, 橋爪洋, 峰巨, 阿部唯一, 宮崎展行, 西尾尚子, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人: 腰神経傷害部位の違いによる根性疼痛発現強度の検討. 第 5 回日本運動器疼痛学会 東京, 2012. 11
 16. 谷口亘, 西尾尚子, 櫻井悠加, 瀧口登, 峰巨, 阿部唯一, 宮崎展行, 吉田宗人, 中塚映政: 活性酸素種(ROS)は TRPA1 チャネルを介して脊髄後角ニューロンを興奮させる. 第 1 回和歌山ニューロカンファレンス, 和歌山, 2012. 12
 17. Takiguchi N, Yoshida M, Taniguchi W, Hashizume H, Miyazaki N, Nishio N, Nakatsuka T: Distinct degree of radiculopathy at different levels of peripheral nerve injury. 42th Annual Meeting of Society for Neuroscience, New Orleans, 2012

〔図書〕(計 7 件)

1. Wataru Taniguchi, Terumasa Nakatsuka. Chaptor31. Spinal synaptic plasticity in chronic pain. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014; 387-398, Springer Japan, Tokyo
2. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 A. 基礎知識

12. 痛みの研究手法-パッチクランプ法 痛みの Science &Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.14, 文光堂, 東京
3. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 C. 脊髄 1. 脊髄後角 痛みの Science &Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.41 文光堂, 東京
4. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 D. 脳 2. 神経可塑性 痛みの Science &Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.60 文光堂, 東京
5. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 D. 脳 3. 中枢性感作 痛みの Science &Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.61 文光堂, 東京
6. 谷口亘, 中塚映政. 第 2 章 痛みのメカニズムと最新治療 1. 痛みのメカニズム 「先端医療シリーズ 44 臨床医のための最新整形外科」2013; 51-54, 先端医療技術研究所, 東京
7. 谷口亘, 中塚映政. 1 章総論 5. 炎症痛のメカニズム 痛みの Science &Practice シリーズ 2 「痛みの薬物治療」2013; 58-66, 文光堂, 東京

〔産業財産権〕

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)

関西医療大学・保健医療学部・准教授

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: