

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791610

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛モデル動物におけるシナプス可塑性の解析

研究課題名(英文) Analysis of synaptic plasticity of the neuropathic pain model

研究代表者

宮崎 智之 (MIYAZAKI, Tomoyuki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30580724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：SNL術後早期に、脊髄後角第 2 層においてpCREBの一時的な低下が生じ、7日目以降正常化する。この変化を調べるため、GAD67-GFPマウスを使用して解析を行ったところ、有意差は認めなかったものの、抑制性神経に強くpCREBの発現を認めた。この現象はCCIモデルでも同様に確認された。このことから、SNL術後早期には、抑制性の神経細胞の活動性が低下することで、興奮性細胞の相対的な活性化が生じ、その結果疼痛閾値が低下するのではないかと推察された。その後、in vivoパッチを立ち上げることに成功し、マウス右後肢を筆で刺激することによってEPSCが増強する範囲を記録した。

研究成果の概要(英文)：SNL induced the elevation of pCREB-staining in lamina2 of spinal dorsal horn, while this change return to basal level 7 days after SNL. This change was true to GAD67-GFP mice. This suggested SNL activated excitatory neurons via the reduction of inhibitory input from GAD67 positive neurons.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛 pCREB 電気生理 脊髄

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛を含むいわゆる慢性痛は現在に至るまでその治療は困難を極め、疼痛メカニズムの解明が治療法の開拓という観点から急務である。痛みの伝達はグルタミン酸による興奮性シナプスを介したものであるが、痛覚伝達経路の解剖学的な複雑さゆえその解析は中枢神経に比し遅れているのが現状である。興奮性グルタミン酸受容体の一種である AMPA 受容体は記憶学習を司る主要分子であるだけでなく (Rumpel S, et al. Science. 2005;308(5718):83-8, Hu H, et al. Cell. 2007;131(1):160-73)、近年は正常または疾患モデルにおける神経回路形成においても中心的役割を果たしていることが明らかになってきている (Takahashi T, et al. Science. 2003;299(5612):1585-8, Conrad KL, et al. Nature. 2008;454(7200):118-21, Greer PL, et al. Cell. 2010;140(5):704-16)。脊髄レベルにおいても正常な痛覚伝達の神経回路形成だけでなく、神経障害時に起こる神経回路再編成にも AMPA 受容体が関与していることが報告されている (Galan A, et al. Pain. 2004;112(2004):315-23, Vikman KS, et al. J Physiol. 2008;586(2):515-27, Gangadharan V, et al. J Clin Invest. 2011;121(4):1608-23)。しかしそれら神経障害の変化が生じた具体的な解剖学的情報やどの細胞群において見られる変化なのか、また神経障害発生時点からのシナプス可塑性の経時的変化については未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者は大学院生時代より一貫して AMPA 受容体のシナプスレベルでの機能解析を行っており、幼若時のストレスが学習依存的シナプス可塑性に影響をあたえることを明らかにしてきた。一方神経因性疼痛の成立段階で一見疼痛とは無関係な神経ガイドランス因子であるセマフォリン 3A が疼痛抑制効果を有すること (Hayashi M, et al. Neurosci Res. 2011;69(1):17-24) を明らかにしてきた。

その一連の研究において、SNL (spinal nerve ligation; 脊髄神経結紮) 施行 3 日後のラットの患側脊髄後角第 1 層において、疼痛が発生し始めているにも関わらず神経活性化の指標である pCREB の発現が低下し、SNL 施行後 7 日目にかけて正常化することを発見した。痛覚伝播は主にはグルタミン酸を介した興奮性情報の上位中枢への伝達によるものであるため、疼痛発生時にその痛覚伝達経路である脊髄後角第 1 層で神経の興奮性の低下を認めたことは大きな驚きであった。解

剖学的には脊髄第 1 層は抑制性の神経細胞が多くを占めており、SNL 施行 3 日後にそれら抑制性の細胞群が神経障害に続く二次的な機転により抑制されることで脊髄第 1 層の興奮性細胞への抑制性入力が低下し、引いては疼痛閾値を低下させるのではないかと仮説を立て、そのメカニズムを明らかにすることを目的として実験を行った。

3. 研究の方法

本研究では、生後 4 週の GAD67-GFP マウスを用いて神経障害性疼痛モデル (SNL) を作成し、障害に伴いシナプス活動が上昇する部位や細胞種 (興奮性細胞、抑制性細胞) を組織染色により経時的に評価する。その後、電気生理学的手法を用いて AMPA 受容体に焦点を絞ってシナプス機能の評価を行う。

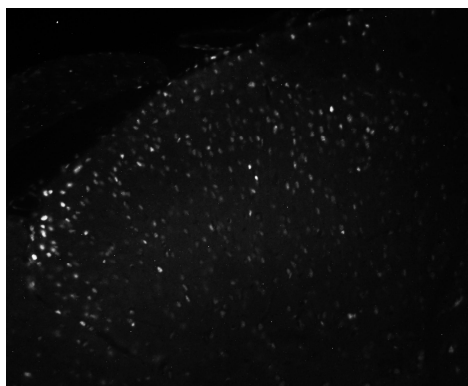
4. 研究成果

SNL モデルの作成

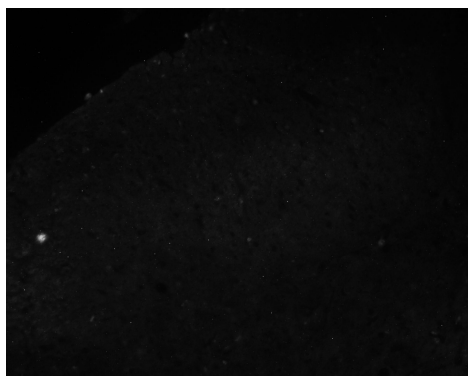
生後 4 週の GAD67-GFP マウスに対して、左第 5 腰神経結紮による神経障害性疼痛モデル (SNL モデル) を作成し、腰髄単離標本を用いたブラインドスライスパッチを行った。SNL モデルの作成法は以下のとおりである。エーテルによる予備麻酔の後、イソフルレン 2% による麻酔下に GAD67-GFP マウスを伏臥位にし、上後腸骨棘を結ぶ線を中心に約 1cm の正中縦切開をおく。椎体と左側の腸骨の間を剥離し、L5 の棘突起を露出後丁寧に除去する。直下に見える L4 及び L5 腰神経を確認後、L5 のみを 4-0 絹糸を用いて結紮・切断し、消毒後皮膚縫合を行う。術後 1 週間後に von Frey 法を用いて機械的刺激に対する逃避閾値が低下していることを確認した後標本を作成する。

SNL モデルにおける経時的な pCREB の発現

SNL モデルラットの脊髄後角第 1 層において、術後 3 日目に pCREB の一時的な低下があり、その後発現は正常化した。同様の実験を GAD67-GFP マウスに対しても行ったところ、やはり同様の結果が得られた。詳細に解析すると、pCREB の発現は GFP (GAD67 発現細胞) と merge している傾向にあったが、統計的に有意な差は認められなかった。このことから、SNL 術後早期には、抑制性の神経細胞の活動性が低下することで、興奮性細胞の相対的な活性化が生じ、その結果疼痛閾値が低下するのではないかと推察された。同様の結果は、CCI モデルにおいても観察され、神経因性疼痛モデルに共通した変化であることも明らかにすることができた。



SNL 術後 3 日目の pCREB(後角第 層)



SNL 術後 7 日目の pCREB(後角第 層)

電気生理学的検証

SNL 術後 1 週間後に von Frey 法を用いて機械的刺激に対する逃避閾値が低下したマウスに対し、ウレタン水溶液 1g/kg を腹腔内投与し、酸素投与 (1L/min) する。十分な麻酔深度が得られた後に、脊髄を傷つけないように椎弓切除し、L3~L6 の後根を含む腰髄膨大部を摘出、氷冷リンゲル液に浸し冷却する。実体顕微鏡下に後根を損傷しないように髄膜を剥離し、記録用チャンバーに移す。37 度に加温されたリンゲル液を 10mL/min の速度で還流しながら実体顕微鏡を用いて記録用ガラス電極を脊髄後角に近づけ、電極抵抗をモニターしながらホールセルパッチクランプの状態を形成する。実際にモデル動物は安定的に作成できていたものの、新規に立ち上げた記録装置の電気的ノイズが除去できず、2 ヶ月ほど施行したものの最終的に当研究室で脊髄の電気生理を行うことは断念した。

研究代表者の以前の同僚が新潟大学麻酔科に転出し、そちらでは盛んに脊髄の電気生理を行っていることから電気生理実験を依頼することにした。新潟大学麻酔科ではスライス標本ではなく、生きたままのラットを用いた in vivo パッチクランプ法を恒常的に行っているため、先方の都合もあり、in vivo パッチクランプ法で電気生理学的検討を行うことと変更した。

生後 7 週程度の GAD67-GFP マウスを用いて SNL ラットを本学と同様の方法で作成しても

らい、in vivo パッチクランプを行ってもらったが、SNL 作成時の手術の影響で脊髄近傍の癒着が著しく、脊髄を傷つけることなく椎弓切除を行うことが困難とのことであり、神経傷害モデルを坐骨神経絞扼モデル (CCI モデル) に変更し、記録している神経が感知しうる受容野の変化を計測するというように研究を変更した。SNL モデルと同様、イソフルレン麻酔下に右大腿外側に 2cm の皮切を加え、筋肉の分け目を鈍的に剥離し坐骨神経を露出・単離する。坐骨神経を 4-0 絹糸で 1mm 間隔で 4 回ゆるく結紮し、閉創する。手術 1 週間後に手術側の疼痛閾値が低下していることを確認後、術後 3 週間までの間で in vivo パッチクランプを行った。ウレタン麻酔 (1g/kg 腹腔内投与) の後、T10~L2 にかけての椎弓切除を行い、脊髄を露出する。実験台にマウスを固定し、37 度に加温されたリンゲル液を 10mL/min の速度で脊髄近傍に還流しながら実体顕微鏡を用いて記録用ガラス電極を L4 後根付近の脊髄後角に近づけ、電極抵抗をモニターしながらホールセルパッチクランプの状態を形成する。細胞は電位固定法により -70mV に固定し、興奮性シナプス後電流 (EPSC) を計測出来るようにし、マウス右後肢を筆で刺激することによって EPSC が増強する範囲を記録した (Fig.1)

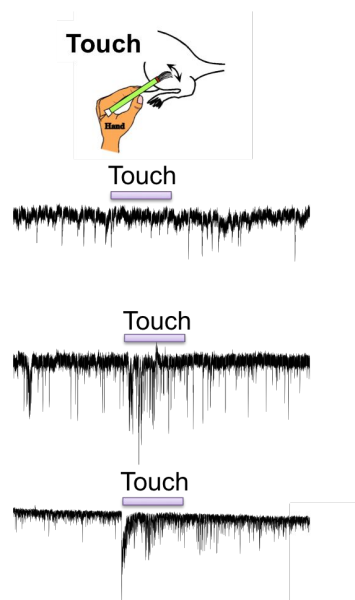


Fig.1

記録された神経が触刺激に対して反応する受容野は、CCI による神経障害によって、何も手術していない naïve マウスと比較すると約 3 倍に拡大していた (Fig.2)。この結果から、少なくとも脊髄後角においては神経障害によって、1 つの神経が受容する皮膚分節が大きく拡大することが生理学的に確認された。モデルは異なるが、この結果は末梢神経障害によって、脊髄後角において分節を縦

断する神経連絡が新たに形成されるという当初の仮説を支持する結果といえる。

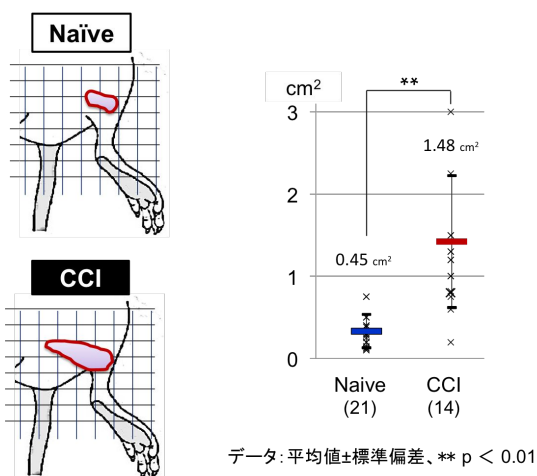


Fig.2

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 1 件)

Nakahashi Y, Kamiya Y, Funakoshi K, Miyazaki T, Uchimoto K, Tojo K, Ogawa K, Fukuoka T, Goto T.

Role of nerve growth factor-tyrosine kinase receptor A signaling in paclitaxel-induced peripheral neuropathy in rats.

BBRC. 2014. 444(3): 415-9. (Doi 10.1016)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

高瀬 堅吉、宮崎 智之 他、西村書店、The behavior of the Laboratory Rat: A Handbook with Tests、2014、p.69-80

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 智之 (MIYAZAKI Tomoyuki)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30580724

(2) 研究協力者

紙谷 義孝 (KAMIYA Yoshinori)

新潟大学・医学部・講師

研究者番号：90381491