

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460730

研究課題名(和文) ソマトスタチンが関与する脊髄電気刺激療法のメカニズムの解明

研究課題名(英文) A mechanism of spinal cord electrical stimulation-induced analgesia related to somatostatin

研究代表者

中塚 映政 (Nakatsuka, Terumasa)

関西医療大学・保健医療学部・客員教授

研究者番号：30380752

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)：脊髄電気刺激療法は、難治性慢性疼痛に対して、数少ない有効な治療法の一つであるが、その詳細なメカニズムは未だ明らかでない。本研究ではラット脊髄後角にパッチクランプ法を適用し、脊髄電位刺激による鎮痛機序を解析した。脊髄電気刺激により緩徐な抑制性シナプス後電流が発生したが、これはソマトスタチン受容体を介したGIRKチャンネルの活性化が関与している可能性が示唆された。さらにin vivoパッチクランプ法を用いて、脊髄電気刺激による最適な刺激強度を動物実験的データという限界はあるが算出した。

研究成果の概要(英文)：Spinal cord electrical stimulation (SCS) is a kind of the effective treatments for a chronic pain. However, mechanisms of SCS-evoked analgesia have been poorly understood. In this study, whole-cell patch-clamp recordings were performed from dorsal horn neurons in rat spinal cord slices to investigate SCS-induced effects. SCS produced slow inhibitory postsynaptic currents (IPSCs). This action was suggested that activation of GIRK channels induced slow IPSCs via somatostatin receptors. Moreover, we analyzed the stimulation condition to get the largest slow IPSCs by SCS, although this study has a limitation because it was animal experiment.

研究分野：神経生理学

キーワード：脊髄電気刺激 パッチクランプ法 in vivo パッチクランプ法 外向き電流 SCS slow IPSC outward current シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

脊髄電気刺激による治療法(脊髄電気刺激療法)は、鎮痛薬や神経ブロック療法に対して抵抗性の難治性慢性疼痛に対して臨床応用されており、数少ない有効な治療法の一つである。脊髄電気刺激療法は非ステロイド性消炎鎮痛薬(NSAIDs)やモルヒネなどの鎮痛薬が無効な症例に対して有効であることから、その鎮痛作用は従来の鎮痛薬とは全く異なることが示唆されてきた。しかし、その詳細なメカニズムは未だ明らかでない。

2. 研究の目的

研究代表者は以前、ラット脊髄横断スライスにパッチクランプ法を用いて、記録ニューロン近傍の脊髄後角に局所電極を留置し、刺激することでどのような効果が得られるか解析を行った。その結果、電位固定下で脊髄を電気刺激すると、緩徐な抑制性シナプス後電流(slow inhibitory postsynaptic current: slow IPSC)を認めた(Nakatsuka, J Physiol 2008)。さらに薬理的な解析を加え、このslow IPSCはG蛋白質共役型内向き整流性K⁺チャネル(G-protein-coupled, inwardly-rectifying K⁺チャネル:GIRKチャネル)を活性化することにより発生するものであることが判明した。近年、神経ペプチドであるソマトスタチンはG蛋白共役型K⁺チャネルを介して脊髄後角ニューロンの膜を過分極することが報告されている。そこで、電気刺激によって遊離するソマトスタチンが脊髄後角ニューロンのソマトスタチン受容体を活性化し、その結果、G蛋白質を介してGIRKチャネルを活性化することが脊髄電気刺激療法の機序に関与しているのではないかと仮説を立てた。今回、本研究では脊髄後角ニューロンに対して、脊髄横断スライスおよびin vivo標本を用いて、パッチクランプ法により、脊髄電気刺激療法の分子的メカニズムを解析するとともに、脊髄電気刺激療法にはソマトスタチンが関与するという仮説を検討した。

3. 研究の方法

《ラット脊髄横断スライスからのパッチクランプ記録》

5~6週齢の雄性ラットをウレタン(1.2~1.5g/kgを腹腔内投与)で深麻酔した後、L1~S3レベルの脊髄を摘出し、酸素飽和した人工脳脊髄液(2~4)に浸した。実体顕微鏡下で硬膜を除去した後、後根、前根をすべて切除し、その後、クモ膜と軟膜を除去した。脊髄を寒天ブロックに設けた浅い溝の上に置き、マイクロスライサーを用いて厚さ650μmの脊髄横断スライス標本作製した。切り出したスライスを直ちに記録用チャンバーに移し、酸素付加、加温(36)した人工脳脊髄液により、15~20ml/分の速度で灌流した。人工脳脊髄液の組成(mM)は、NaCl, 117; KCl, 3.6; CaCl₂, 2.5; MgCl₂, 1.2; NaH₂PO₄, 1.2;

glucose, 11; NaHCO₃, 25(pH=7.4)であった。パッチ電極を脊髄後角表層に刺入し、ギガオーム・シールを形成した後、後角ニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行った。電極は入力抵抗が10~15Mのものを用い、その内液組成は、K-gluconate, 135; KCl, 5; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 2; EGTA, 5; HEPES, 5; Mg-ATP, 5あるいは、Cs-sulfate, 110; CaCl₂, 0.5; MgCl₂, 2; EGTA, 5; HEPES, 5; tetraethylammonium (TEA) chloride, 5; Mg-ATP, 5 (PH=7.2)であった。前者は興奮性応答、後者は抑制性応答を記録するのに使用した。得られた膜電流はパッチクランプ用増幅器(Axopatch 200B)により増幅し、A/D変換後、データ記録および解析用のソフトウェア(pCLAMP10)を用いてコンピュータにより記録・解析した。実験結果は平均±標準誤差で表し、検定はStudentのpaired t-testで行い、P<0.05をもって有意と判定した。

《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150μm以内)。

4. 研究成果

脊髄電気刺激が脊髄膠様質ニューロンにどのような影響を与えるか、まずラット脊髄スライスにホールセル・パッチクランプ法を適応して、解析を行った。膜電位を-50mVに固定して、保持膜電流の変化に注目した。単極の刺激電極を用いて、脊髄後角を局所的に20Hzで20回(刺激強度:0.3~1.0mA、刺激持続時間:0.4ms)反復刺激すると、約30%のニューロンにおいて、緩徐な抑制性シナプス後電流(slow IPSC)が発生した。脊髄電気刺激によって生じたslow IPSCの平均の振幅は約60pA、平均持続時間は約60秒であった。また、脊髄電気刺激を5~10分間隔で行っても、slow IPSCの振幅に変化はなかった。薬理的な解析からこのslow IPSCはG蛋白

質共役型内向き整流性 K チャンネル(GIRK チャンネル)を活性化することにより発生するものであることが判明した。次に、ソマトスタチン脊髄灌流投与すると外向き電流の発生を認めた。さらに非選択的ソマトスタチン受容体阻害薬である cyclo-somatostatin 存在下では他の神経伝達物質阻害薬とは違って、脊髄電気刺激による slow IPSC の阻害効果を認めた。これらの結果から、電気刺激によって遊離するソマトスタチンが脊髄後角ニューロンのソマトスタチン受容体を活性化し、その結果、G 蛋白質を介して GIRK チャンネルを活性化することが脊髄電気刺激療法の機序に関与していると考えられた。

脊髄スライスにおいて確認することができた脊髄電気刺激によって発生する slow IPSC は脊髄電気刺激による鎮痛機構にとってきわめて重要な現象であると考えられるが、実際の in vivo 標本でも同様な現象が見られるか不明である。そこで、引き続き in vivo 標本においても同様に脊髄電気刺激により脊髄膠様質ニューロンから slow IPSC が記録できるか検討を行った。電気刺激は記録ニューロンの髄節レベルより高位の脊髄後索の軟膜・くも膜直上にバイポーラー型の電極を接するような形で前もって設置しておいた。in vivo パッチクランプ法にて、脊髄電気刺激をスライスと同様の条件で反復刺激で行なった。この刺激により slow IPSC を示すニューロンが存在したが、その振幅はスライス時より小さく約 10pA 程度であった。また、細胞膜の脱分極を示す内向き電流が発生したニューロンも存在した。これは記録細胞に投射する後根に電気刺激がおよんで一次求心性線維からのシグナルとなった可能性があると思われた。次に in vivo 標本を用いて、脊髄電気刺激による slow IPSC が発生する至適な条件の検索を行った。解析は in vivo パッチクランプ法膜電位を -50mV に固定して、保持膜電流の変化に注目した。電気刺激は記録ニューロンの髄節レベルより高位の脊髄後索に電極を接するような形で前もって設置しておいた。20Hz で 20 回(刺激強度: 0.3~1.0mA、刺激持続時間: 0.4ms)反復刺激を基本に、刺激強度を 0.5mA から 10mA まで 0.5mA 刻みで、10mA からは 50mA まで 10mA 刻みで変更して slow IPSC の振幅の変化を解析した。また、刺激回数を 1,5,10,20,40,100,150,200 回と変更し slow IPSC の振幅の変化を解析した。結果、刺激強度は 10mA までは slow IPSC の振幅の増強を認めたが、それ以上は増強を認めなかった。また刺激回数は 150 回まで slow IPSC の増強を認めたが、それ以上は増強しなかった。以上の結果から、本研究における脊髄電気刺激により slow IPSC が最も大きく得られる最小の刺激条件は 20Hz で 150 回、刺激強度:10mA、刺激持続時間: 0.4ms であった。

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 4 件)

1. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction. *Molecular Pain* 12 pii: 1744806916644927 DOI: 10.1177/1744806916644927 査読有
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 29 171-179 査読有
3. Nishio N, Taniguchi W, Miyake Y, Kiyoyuki Y, Yamanaka M, Sonekatsu M, Abe T, Takiguchi N, Yoshida M, Nakatsuka T: A role of CGRP on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons. *The Journal of Functional Diagnosis of the Spinal Cord* 35, 10-15, 2014 査読有
4. 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. 査読有

[学会発表](計 16 件)

1. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. The role of NMDA receptor activation by IFN in the spinal dorsal horn neurons. *Orthopedic Research Society 2016 Annual meeting. Orlando 2016.3.1-3.5*
2. Taniguchi W, Yamanaka M, Sonekatsu M, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Nakatsuka T, Yoshida M. In Vivo Patch-clamp Analysis Of Descending Facilitation Of Excitatory Transmission In The Spinal Dorsal Horn By The Anterior Cingulate Cortex Activation. *Orthopedic Research Society 2016 Annual meeting. Orlando. 2016.3.1-3.5*
3. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Hashizume H,

- Yoshida M, Nakatsuka T. Interferon-gamma activates NMDA receptors in the dorsal horn of spinal cord. 45th Society for Neuroscience Annual meeting. Chicago 2015.10.17-21
4. Yamanaka M, Taniguchi W, Sonekatsu M, Nishio N, Abe T, Mine N, Miyazaki N, Nakatsuka T, Yoshida M: In vivo patch-clamp analysis of the pain mechanism by TRPA1 and TRPM8 activation on substantia gelatinosa neurons in the spinal cord. 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Washington, DC, 2014.11.15-19

山中学 (Yamanaka Manabu)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：30597084

曾根勝 真弓 (Sonekatsu Mayumi)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：40725579

西尾 尚子 (Nishio Naoko)
和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員
研究者番号：40648359

〔図書〕(計 6 件)

1. 谷口 亘, 中塚映政 : 痛みの Clinical Neuroscience 8 脊髄機能変化と痛み : アロディニアなどのメカニズムを巡って. 最新医学 71(2): 112-115, 2016 最新医学社
2. 谷口 亘, 中塚映政 : 特集 “痛みとかゆみ” 【痛み・かゆみの科学】 3 . 痛みの神経伝達機序 JOHNS 32(5) : 551-554, 2016 東京医学社
3. Wataru Taniguchi, Terumasa Nakatsuka. Chaptor31. Spinal synaptic plasticity in chronic pain. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014; 387-398, Springer Japan, Tokyo
4. 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/C. 脊髄 1. 脊髄後角/D. 脳 2. 神経可塑性/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.14, 41, 60, 61 文光堂, 東京
5. 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
6. 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

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中塚 映政 (Nakatsuka Terumasa)
関西医療大学・保健医療学部・客員教授
研究者番号：30380752

(2)研究分担者

谷口 亘 (Taniguchi Wataru)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号：20453194

(3)連携研究者