

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20083

研究課題名(和文) 神経障害性痛における脊髄グリシンニューロンの役割の解明

研究課題名(英文) Contribution of glycinergic neurons to spinal plasticity in neuropathic pain

研究代表者

倉部 美起 (KUEABE, MIYUKI)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：30635579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性痛時の脊髄後角抑制性ニューロン、特にグリシン作動性ニューロンの果たす役割については不明な部分が多い。我々は、in vivo パッチクランプ法を用いて、正常ラットと神経障害性痛モデルラット間で抑制性ニューロンの変化を、解析した。その結果、抑制性シナプス後電流の振幅のみが減少していた。また、二群間でグリシン作動性IPSCの頻度・振幅に差は認められなかった。さらに、モデルラットでは、グリシン作動性IPSCを記録可能なニューロンが減少し、相対的にGABA作動性ニューロンが増加していた。これらの脊髄後角抑制性ニューロンのバランス変化が、神経障害性痛時の可塑性変化の一部を担うものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the role of glycineergic neuron of spinal dorsal horn in neuropathic pain. We analyzed changes of inhibitory neuronal transmission between normal rats and neuropathic pain model rats using in vivo patch-clamp technique. As a result, only the amplitude of the inhibitory postsynaptic current decreased. There was no difference in the frequency and amplitude of glycineergic IPSC between the two groups. Furthermore, in model rats relative GABAergic neurons increased. The balance changes of these inhibitory neurons were thought to play a part of plasticity change in neuropathic pain.

研究分野：痛み

キーワード：脊髄 痛み in vivoパッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

グリシンは GABA (γ-aminobutyric acid) と同様に主要な抑制性神経伝達物質であり、中枢神経の中で特に脊髄に豊富に存在している。これまで神経障害性痛の発症には GABA 合成酵素の減少や GABA ニューロンの脱落などが関与していると報告されている^{1,2}。一方、グリシンについても、神経障害性痛の発症に関与していることが報告されている³。細胞外グリシン濃度の調整はグリシントランスポーター (GlyT) によって担われている。阻害薬によるグリシン作動性ニューロンの活性化は神経損傷の初期では侵害的に作用し、神経損傷から 4 日目以降に抗侵害作用を認めることが報告されている⁴。もし、グリシンニューロンの可塑性変化が神経障害性痛の基礎をなすということであれば、グリシンまたはその受容体の薬理的な機能強化が痛みの治療戦略のひとつになると考えられる。それゆえに細胞外グリシンの濃度を調節している GlyT の役割が注目され、GlyT 阻害薬が新規鎮痛薬として期待されている。

細胞外グリシンの濃度を調節している GlyT1 阻害薬は NMDA 受容体の過剰な興奮を抑制することで、GlyT2 阻害薬は細胞外グリシン濃度を上昇させることで、鎮痛作用を発揮すると考えられているが、その実態は明らかでない。

2. 研究の目的

in vivo の実験系を用いて神経障害後の脊髄でのグリシンニューロンの可塑性変化の実態を明らかにする。さらに、新規鎮痛薬として期待される GlyT 阻害薬がどのような作用機序で鎮痛作用を発揮するのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性痛モデル動物の作製

坐骨神経絞扼モデル (chronic constriction injury: CCI モデル) を作成

した。イソフルラン麻酔下に、坐骨神経を露出させ、実体顕微鏡下に 4 箇所、4-0 絹糸で軽く結紮した。術後に患肢と健常肢それぞれに von Frey テストを施行し、電気生理学実験には閾値が低下したラットのみ使用した。

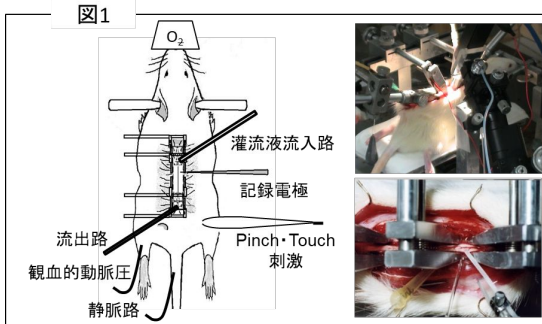
(2) *in vivo* 脊髄標本の作製

5~8 週齢の Wistar 系雄性ラットをウレタン (1.2 ~ 1.5 g/kg、腹腔内投与) で麻酔後、尾静脈に静脈カテーテル (PE-10、ClayAdams、米国) を挿入した。その後、傍脊柱筋群を剥離し、脊椎を露出した。第 12 胸椎から第 2 腰椎まで椎弓切除を行った後、脊椎固定装置に固定した。95 %酸素、5 %二酸化炭素酸素の混合ガスで飽和し、約 36 に加温した人工脳脊髄液で脊髄表面を灌流した。人工脳脊髄液の組成は (単位は mM) NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, glucose 11.5, NaHCO₃ 25 とした。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、腰膨大部レベルで後根を分け、電極刺入スペースを確保した。呼吸による脊髄の振動が抑制されていることを確認し、一部のくも膜と軟膜を電極刺入用に剥離した。

(2) ニューロンからの電気生理学的記録

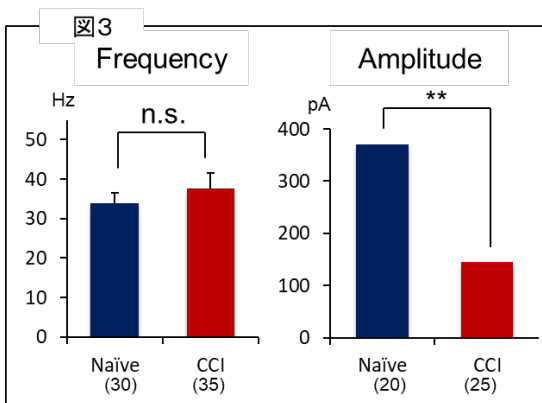
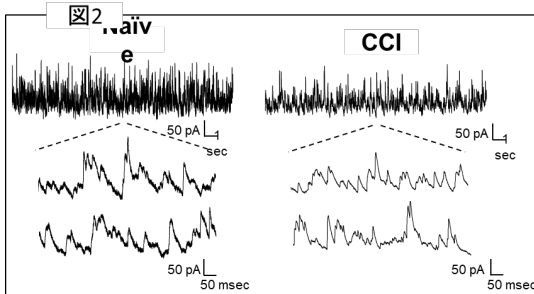
マイクロマニピレーターを用いて、電極を脊髄内に刺入し、脊髄背側表面から 50 μm - 150 μm の深さより、ブラインドホールセルパッチクランプ記録を行った。記録用電極には先端抵抗 8 - 12 MΩ のガラス微小電極を用いた。電極内液の組成は、(単位は mM) Cs-sulfate 110, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, tetraethylammonium 5, ATP-Mg salt 5 とした。得られた電流は、パッチクランプ増幅器 (Axopatch 200B, Molecular Devices、米国) を用いて記録したのち、Clampfit 10.3 (Molecular Devices、米国) または Mini Analysis 6.0 (Synaptosoft、米国) を用いて解析した。保持膜電位は -0 mV として記録を行い、抑制性シナプス後電流 (IPSC; inhibitory postsynaptic currents) を記録

した(図1)。



4. 研究成果

(1) 正常ラットとモデルラット間とで、自発性 IPSC の差を解析した。その結果、モデルラットでは自発性 IPSC の頻度のみが有意に抑制されたが、振幅に差は認めなかった(図2,3)。



(2) グリシン作動性ニューロンのみの変化を確認するために、GABA 受容体アンタゴニスト(ピククリン)を脊髄表面に灌流投与し、IPSC を記録した。しかし、二群間でグリシン作動性 IPSC の頻度・振幅に差は認められなかった。興味深いことに、モデルラットでは、グリシン作動性 IPSC を記録可能なニューロンが脊髄浅層においては非常に減少しており、グリシントランスポーター阻害薬の作用

を解析することが非常に困難であった。また、相対的に脊髄後角浅層において GABA 作動性ニューロンが増加していた。

(3) 抑制性ニューロンの変化が、局所によるものなのかを調べるために、テトロドトキシン(TTX)投与下に、IPSC を記録した。その結果、TTX 投与下でも、IPSC の頻度は変化せず、振幅のみ減少していた。つまり、脊髄後角ニューロンにおいて、シナプス後に GABA あるいはグリシン受容体の感受性が低下している可能性が示唆された。

5. 意義

本研究の結果から、神経障害性痛モデルラットでは脊髄後角ニューロンにおいて抑制性ニューロンである GABA・グリシン作動性ニューロンのバランスが変化していることが確認された。神経障害性痛時の可塑性変化の一部を担うものと考えられた。今後、GABA 作動性ニューロンとグリシン作動性ニューロンのバランスの変化がこういった意味を持つのかを解明することで、神経障害性痛の治療ターゲットの解明に繋がると考えられる。

引用文献

1. Moore KA, et al. The Journal of Neuroscience 2002; 22: 6724-6731
2. West SJ, et al. Neuroscience 2015; 300:254-275
3. Dohi T, et al. Pharmacol Ther. 2009; 123:54-794.
4. Morita K, et al. J Pharmacol Exp Ther. 2008;326:633-45

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Miyuki Kurabe

Effects of desflurane versus propofol on cerebral oxygenation by near-infrared spectroscopy during robotic assisted laparoscopic radical prostatectomy
Anesthesiology 2017, Boston

〔図書〕(計 0 件)

〔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〕

該当なし

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

倉部 美起 (Miyuki Kurabe)

新潟大学医歯学総合病院・麻酔科・助教

研究者番号：30636679

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：