

令和 3 年 4 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23836

研究課題名(和文) 脊髄における視床下部ホルモン受容体およびCaチャンネルが関与する疼痛受容機序の解明

研究課題名(英文) Analysis of the pain mechanisms in the spinal cord involved in receptors of hypothalamic hormones and calcium channels

研究代表者

元嶋 耐士 (Motojima, Yasuhito)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：50748340

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄後角には様々な種類のニューロンが存在し疼痛の受容および調節に関与しているが、神経障害性疼痛に関与するニューロンの特性には不明な点が多い。本研究では、神経障害性疼痛モデル(坐骨神経部分結紮モデル)ラットを用い、神経障害性疼痛に関与するニューロンの特性を解析した。研究結果からは、坐骨神経部分結紮モデルラットの脊髄後角において電位依存性Caチャンネル $\alpha_2\delta_1$ サブユニットタンパクの発現が増加すること、脊髄後角興奮性ニューロンの活動性が亢進すること、一方で脊髄後角抑制性ニューロンには影響を及ぼさないことが示唆された。以上より、神経障害性疼痛には脊髄後角興奮性ニューロンが優位に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は治療に難渋することが多く、その発生機序を解明することは重要な医学的および学術的な課題である。本研究では、神経障害性疼痛の発生に脊髄後角抑制性ニューロンの機能低下ではなく、脊髄後角興奮性ニューロンの機能亢進が関与することを示唆する結果が得られた。以上より、神経障害性疼痛の発生機序の解明に寄与する社会的意義のある研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：The spinal cord contains many different types of neurons and they are involved in pain modulation. In the present study, it is confirmed that the expression of the calcium channel $\alpha_2\delta_1$ subunit was up-regulated, that neuronal activity of excitatory neurons was up-regulated, and that the number and neuronal activity of inhibitory neurons was not affected in the dorsal spinal cord of partial sciatic nerve ligation rats. These results suggest that excitatory neurons in the dorsal spinal cord are predominantly involved in neuropathic pain.

研究分野：神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 神経障害 脊髄 興奮性ニューロン 抑制性ニューロン 介在ニューロン

1. 研究開始当初の背景

脊髄後角における疼痛の受容・調節機序の解明は重要な学術的・医療的課題である。脊髄後角ニューロンの大多数は脊髄後角内で神経回路を完結する介在ニューロン (interneuron: IN) であり、興奮性・抑制性 IN が疼痛の受容・調節に大きく関与している (Peirs and Seal, 2016; Todd, 2017)。しかしながら、脊髄後角神経回路には未だ不明な点が多く、脊髄後角 IN を標的とした疼痛治療法は確立されていない。以前より視床下部ホルモンのオキシトシン (oxytocin: OXT) が脊髄後角 IN に作用して疼痛を抑制する可能性が報告されており、OXT が様々な疼痛病態において脊髄後角 IN を介して鎮痛効果を発揮する可能性がある (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2014)。また、近年の報告からは、神経障害性疼痛治療薬であるプレガバリン (pregabalin: PGB) の鎮痛効果の一部が脊髄後角 IN に発現する Ca^{2+} チャネル $\alpha 2\delta 1$ サブユニット (以下 $\alpha 2\delta 1$) を介している可能性も考えられる。以上のように、OXT・PGB が様々な疼痛疾患に対して脊髄後角 IN を介した鎮痛効果を発揮する可能性が考えられるが、詳細は明らかにされていない。OXT 製剤は分娩促進薬としての静脈内投与が、PGB は神経障害性疼痛治療薬としての経口投与がすでに承認されているが、動物実験においては、これらが脊髄局所に作用して疼痛シグナルを調節することが多数報告されているため、OXT・PGB が様々な疼痛疾患に有効である可能性がある。ラット脊髄後角に OXT 結合部位が豊富に存在することは、放射性同位元素を使用した過去の報告より明らかである (Reiter *et al.*, 1994; Tribollet *et al.*, 1997)、免疫組織化学的染色法 (immunohistochemistry: IHC) を用いて脊髄後角 OXT 受容体 (以下 OXT-R) を同定し得た報告はごく僅かであり、OXT-R 発現ニューロンの特性は完全には解明されていない。また、脊髄後角における $\alpha 2\delta 1$ 発現に関しては、1 次感覚神経線維の中枢側 (脊髄後角内シナプス前部) および脊髄後角ニューロン側 (脊髄後角内シナプス後部) のどちらに優位に発現するのか、発現する脊髄後角ニューロンが興奮性もしくは抑制性であるのか、どのような病態において脊髄後角ニューロンにおける発現量が増加するのかなど、未だ不明な点が多い。近年の脊髄後角ニューロンの mRNA 解析により、OXT-R が興奮性・抑制性 IN に、 $\alpha 2\delta 1$ が主に興奮性 IN に発現することが示唆されたが、その発現割合や各種疼痛病態における発現量の変化などは明らかにされていない (Haring *et al.*, 2018)。しかしながら、RNAscope®テクノロジーを用いた mRNA の蛍光標識技術が脊髄後角ニューロンの機能解析においても実用化され (Dickie *et al.*, 2019)、mRNA を基にした脊髄後角 IN の機能解析が進められている。以上のように、近年の技術革新によって脊髄後角ニューロンの詳細な機能解析が可能となってきた。

2. 研究の目的

ラット脊髄後角興奮性・抑制性ニューロンにおける OXT-R・ $\alpha 2\delta 1$ 発現を mRNA レベル・タンパクレベルで解析し、OXT-R・ $\alpha 2\delta 1$ 発現ニューロンの特性を明らかにする。また、神経障害性疼痛モデルラットの脊髄後角興奮性・抑制性ニューロンにおける OXT-R・ $\alpha 2\delta 1$ の mRNA・タンパク発現を半定量評価し、OXT-R・ $\alpha 2\delta 1$ が関与する疼痛病態を明らかにする。以上により、OXT-R および $\alpha 2\delta 1$ が関与する脊髄後角内の疼痛受容機序を解明すると共に、OXT・PGB が鎮痛効果を発揮し得る疼痛病態を明らかにする。

最初期遺伝子の一つである FosB を指標として神経障害性疼痛時の脊髄後角の神経活動を半定量評価する。さらに、抑制性ニューロンで特異的に合成される Pax2 タンパクを指標とすることで脊髄後角興奮性・抑制性ニューロンを判別し、FosB 陽性である活性化した脊髄後角ニューロンが興奮性ニューロンであるのか抑制性ニューロンであるのかを検討する。以上により、神経障害性疼痛に関与する脊髄後角ニューロンの特性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) RNAscope®テクノロジーを用いた検討

成熟雄性 Wistar 系ラットを断頭して脊髄を摘出し、 -80°C で急速冷凍した後に第 5 腰髄 (L5) を切り出してクリオスタットを用いて厚さ $12\ \mu\text{m}$ の腰髄新鮮凍結切片を作成した。Advanced Cell Diagnostics (ACD) 社提供の RNAscope®テクノロジー試薬キット (Fluorescent multiplex Detection Reagents: Cat No. ADC 320851; Lot No. 2007031) およびプロテアーゼキット (Protease & Reagents: Cat No. ADC 322340; Lot No. 2007018) を用いて、各種マニュアルに従い OXT-R mRNA プローブ (Rn-Oxtr-C3: Cat No. ADC 483671-C3; Lot No. 19304B)、 $\alpha 2\delta 1$ mRNA プローブ (Rn-Cacna2d1-C2: Cat No. ADC 818271-C2; Lot No. 19308E)、および Slc17a6 mRNA (グルタミン酸産生興奮性ニューロンのマーカー) プローブ (Rn-Slc17a6: Cat No. ADC 317011; Lot No. 19305A) を反応させ、各種 mRNA を異なる蛍光波長で標識することを試みた。実験に際しては、ポジティブコントロールプローブ (3-Plex Positive control Probe_Rn: Cat No. ADC 320891; Lot No. 19295A) およびネガティブコントロールプローブ (3-Plex Negative control Probe: Cat No. ADC 320871; Lot No. 19305A) も使用した。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて脊髄後角を撮影し、各種蛍光標識を指標とすることで OXT-R mRNA 陽性ニューロンもしくは $\alpha 2\delta 1$ mRNA 陽性ニューロンに占める Slc17a6 mRNA 陽性興奮性ニューロンの割合を

計測することを試みた。

(2) IHC を用いた検討

成熟雄性 Wistar 系ラットを灌流固定して脊髄を摘出した。ホルマリンで後固定を行った後に第 5 腰髄(L5)を切り出し、ミクロトームを用いて厚さ 30 μm の腰髄切片を作成した。抗 OXT-R 抗体(ab217212; Abcam, Cambridge, UK; rabbit polyclonal; Lot No. GR3307215-2)、抗 21 抗体 (ACC-015; Alomone Labs, Jerusalem, Israel; rabbit polyclonal; Lot No. ACC015AN0625)、抗 Pax2 (抑制性ニューロンのマーカー) 抗体 (H00005076-M01; Abnova, Taipei, Taiwan; mouse monoclonal; Lot No. K2061-3C7)、抗 NeuN (成熟ニューロンのマーカー) 抗体(266006; Synaptic Systems, Gottingen, Germany; chicken polyclonal; Lot No. 3-14)、および対応する各種蛍光二次抗体を用いて IHC を行い、各種タンパクを異なる蛍光波長で可視化することを試みた。蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて脊髄後角を撮影し、各種蛍光標識を指標とすることで OXT-R 陽性ニューロンもしくは 21 陽性ニューロンに占める Pax2 陽性抑制性ニューロンの割合を計測することを試みた。

(3) 神経障害性疼痛モデルを用いた検討

本研究では、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮(partial sciatic nerve ligation: PSLN)モデルを使用した。成熟雄性 Wistar 系ラットを偽手術(Sham)群と PSLN 群の二群に分け(各群 4 匹)、術後 14 日に vonFrey テストにて痛覚閾値を測定した。vonFrey テスト直後に灌流固定を行って脊髄を摘出し、ホルマリンで後固定を行った後に第 4 腰髄(L4)、L5、および第 6 腰髄(L6)を切り出してミクロトームを用いて厚さ 30 μm の腰髄切片を作成した。最初期遺伝子の一つである FosB を指標として L4、L5、および L6 脊髄後角の神経活動を半定量評価するため、抗 FosB 抗体(ab184938; Abcam, Cambridge, UK; rabbit monoclonal; Lot No. GR214900-17)および対応する蛍光二次抗体を用いて IHC を行った。蛍光顕微鏡を用いて脊髄後角 1 層を撮影し、FosB 陽性細胞数を Sham 群と PSLN 群とで比較した。次に、抗 FosB 抗体、抗 Pax2 抗体、抗 NeuN 抗体、および対応する蛍光二次抗体を用いて IHC を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて脊髄後角 1 層を撮影した。NeuN 陽性細胞に占める Pax2 陽性細胞および Pax2 陰性細胞の割合、NeuN 陽性細胞に占める FosB 陽性細胞の割合、Pax2 陽性細胞に占める FosB 陽性細胞の割合、および Pax2 陰性細胞に占める FosB 陽性細胞の割合を Sham 群と PSLN 群とで比較した。最後に、抗 21 抗体および対応する蛍光二次抗体を用いて IHC を行った。蛍光顕微鏡および画像解析ソフトを用いて L5 脊髄後角 1 層における蛍光輝度を半定量評価することにより、Sham 群と PSLN 群の脊髄後角における 21 発現を比較した。

4. 研究成果

(1) RNAscope®テクノロジーを用いた検討

RNAscope®テクノロジーを用いて脊髄後角 1 層における各種 mRNA の蛍光標識による可視化を試みたが、ポジティブコントロールプローブを含めて今回使用したプローブでは有意な蛍光波長を確認することができなかった。

(2) IHC を用いた検討

IHC を用いて脊髄後角 1 層における各種タンパクの蛍光標識による可視化を試みた。抗 NeuN 抗体、抗 Pax2 抗体、および対応する蛍光二次抗体を用いた IHC では、NeuN 陽性である成熟ニューロンおよび Pax2 陽性である抑制性ニューロンを可視化して同定することができた。一方で、今回使用した抗 OXT-R 抗体および対応する蛍光二次抗体では有意な蛍光波長を確認することができず、脊髄後角における OXT-R 発現ニューロンを可視化して同定することはできなかった。また、今回使用した抗 21 抗体および対応する蛍光二次抗体では脊髄後角に 21 タンパクが発現することを確認することはできたが、21 タンパクが 1 次感覚神経線維の中枢側(脊髄後角内シナプス前部)に発現しているのか脊髄後角ニューロン側(脊髄後角内シナプス後部)に発現しているのかは判別できなかった。

(3) 神経障害性疼痛モデルを用いた検討

1) 術後 14 日に、Sham 群および PSLN 群ラットの痛覚閾値を vonFrey テストにて測定した。処置側の後肢足底を vonFrey モノフィラメントで刺激し、逃避行動を呈した最小値を閾値とした。PSLN 群は Sham 群と比較して著明な痛覚過敏を呈しており、本実験に用いた PSLN 群ラットが神経障害性疼痛の病態にあることが確認された。

2) Sham 群および PSLN 群ラットを痛覚閾値測定後に灌流固定し、L4、L5、および L6 脊髄後角 1 層における FosB 陽性細胞数を IHC および蛍光顕微鏡を用いて計測した。Sham 群と比較して PSLN 群の FosB 陽性細胞数はすべての髄節レベルで増加傾向にあったが、L5 レベルでのみ有意差のある増加を認めた(図 1)。以上の結果より、PSLN は L5 レベルの脊髄後角に最も影響を及ぼすことが示唆された。

3) Sham 群および PSLN 群ラットを痛覚閾値測定後に灌流固定し、L5 脊髄後角 1 層における NeuN 陽性細胞、Pax2 陽性細胞、および FosB 陽性細胞を IHC を用いて蛍光標識し、共焦点レーザー顕微鏡撮影にて可視化した(図 2)。NeuN 陽性細胞に占める Pax2 陽性細胞の割合は Sham 群と PSLN 群とで優位差を認めず、PSLN は脊髄後角における興奮性および抑制性ニューロンの割合に影響を及ぼさない(抑制性ニューロンのアポトーシスに関与しない)ことが示唆された。また、NeuN 陽性ニューロンに占める FosB 陽性ニューロンの割合と Pax2 陰性興奮性ニューロンに

占める FosB 陽性ニューロンの割合が Sham 群と比較して PSNL 群で優位に増加することが確認され、PSNL が脊髄後角の興奮性ニューロンの活動性を亢進させることが示唆された(図 3)。
 4) Sham 群および PSNL 群ラットを痛覚閾値測定後に灌流固定し、L5 脊髄後角 I-III 層における 21 タンパクの発現を IHC を用いて蛍光標識にて可視化した(図 4)。蛍光顕微鏡および画像解析ソフトを用いて蛍光輝度を計測したところ、PSNL 群では非処置側に比べて処置側の蛍光輝度が有意に増加していることが確認された(図 5)。以上の結果より、脊髄後角における 21 タンパク発現の増加が、PSNL による痛覚過敏および脊髄後角興奮性ニューロンの神経活動の亢進に関連していることが示唆された。

図1

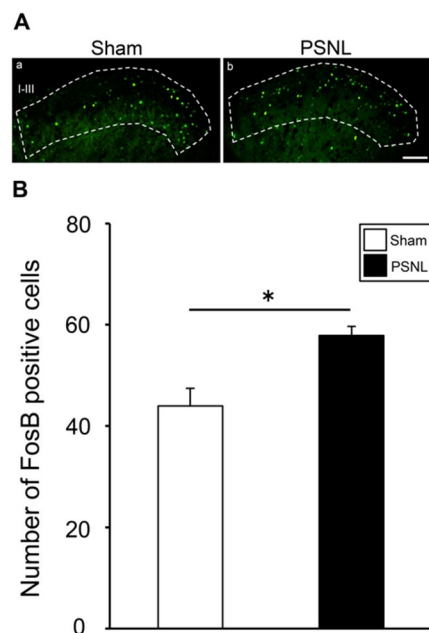


図1: 脊髄後角における FosB 陽性細胞発現

(A) 処置後 14 日の Sham 群(a)および PSNL 群(b)の L5 処置側脊髄後角 I-III 層における FosB 陽性細胞発現

(Scale bar=100μm. Roman numerals indicate laminae of the dorsal horn of the spinal cord.)

(B) 処置後 14 日の Sham 群および PSNL 群の L5 処置側脊髄後角 I-III 層における FosB 陽性細胞数(Data are presented as mean ± SEM. n=4 in each group. *P<0.05 by Student's t-test.)

図2

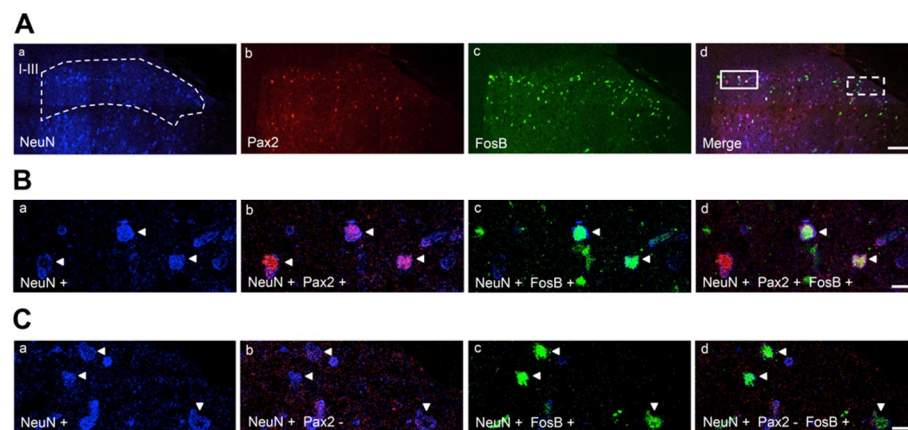


図2: 脊髄後角における NeuN、Pax2、および FosB 陽性細胞発現

(A) 処置後 14 日の PSNL 群の処置側 L5 脊髄後角 I-III 層における NeuN 発現(a)、Pax2 発現(b)、FosB 発現(c)、およびマージ画像(d)(Scale bar=100μm. Roman numerals indicate laminae of the dorsal horn of the spinal cord. The solid boxed region in A-d indicates the area of images in B, and the dashed boxed region in A-d indicates the area of images in C)。

(B) A-d 実線枠の拡大図。(a) NeuN 陽性ニューロン、(b) NeuN 陽性・Pax2 陽性ニューロン、(c) NeuN 陽性・FosB 陽性ニューロン、および(d) NeuN 陽性・Pax2 陽性・FosB 陽性ニューロン(Scale bar=10μm)。

(C) A-h 破線枠の拡大図。(a) NeuN 陽性ニューロン、(b) NeuN 陽性・Pax2 陰性ニューロン、(c) NeuN 陽性・FosB 陽性ニューロン、および(d) NeuN 陽性・Pax2 陰性・FosB 陽性ニューロン(Scale bar=10μm)。

図3

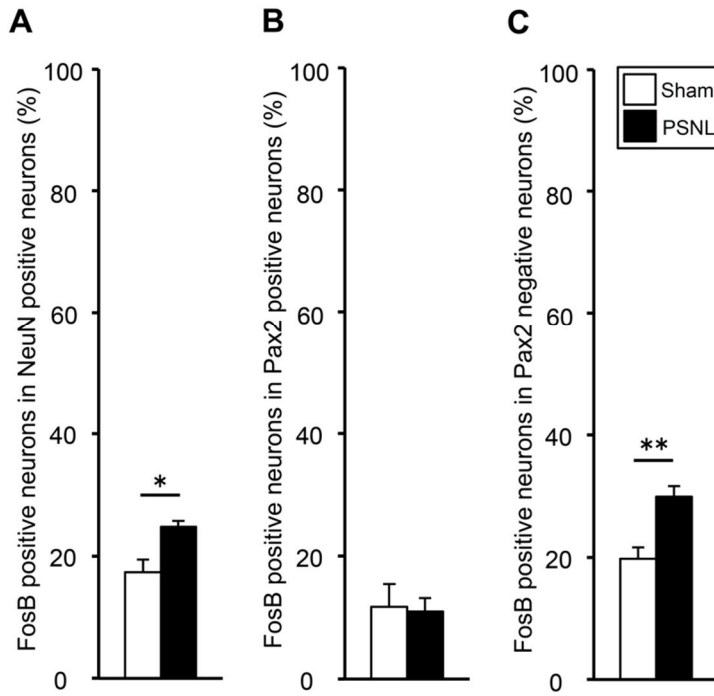


図3: 脊髄後角における興奮性/抑制性ニューロンの神経活動性の定量評価
処置後 14 日の Sham 群および PSNL 群の処置側 L5 脊髄後角 - 層における (A) NeuN 陽性ニューロンに占める FosB 陽性ニューロンの割合、(B) Pax2 陽性ニューロンに占める FosB 陽性ニューロンの割合、および (C) Pax2 陰性ニューロンに占める FosB 陽性ニューロンの割合 (Data are presented as mean \pm SEM. $n=4$ in each group. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ by Student's t-test.)。

図4

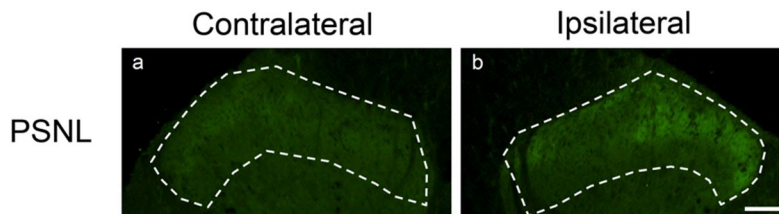


図4: 脊髄後角における FosB 発現の可視化
処置後 14 日の PSNL 群の健側(a)および処置側(b)L5 脊髄後角 - 層における FosB 発現 (Scale bar=100 μ m. Roman numerals indicate laminae of the dorsal horn of the spinal cord)。

図5

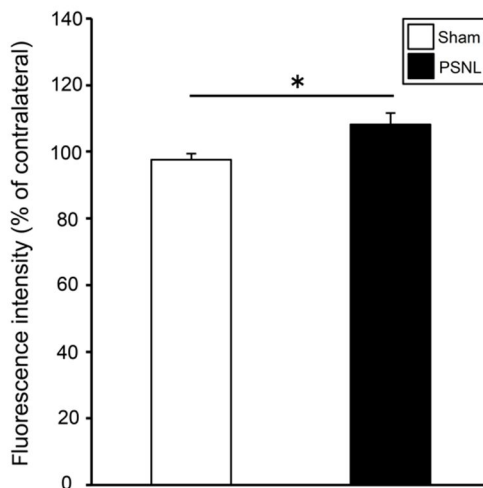


図5: 脊髄後角における FosB 発現の蛍光輝度による定量的解析
健側脊髄後角と比較した処置側脊髄後角における FosB 発現の平均蛍光輝度 (Data are presented as mean \pm SEM. $n=4$ in each group. * $P<0.05$ by Student's t-test)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Motojima Yasuhito, Ueta Yoichi, Sakai Akinori	4. 巻 749
2. 論文標題 Analysis of the proportion and neuronal activity of excitatory and inhibitory neurons in the rat dorsal spinal cord after peripheral nerve injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 135707 ~ 135707
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.135707	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------