

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

科学研究費助成事業

研究成果報告書



平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462346

研究課題名(和文) D-アミノ酸オキシダーゼが脊髄侵害受容性シナプス伝達に与える影響

研究課題名(英文) Effect of D-amino acid oxidase on spinal synaptic transmission

研究代表者

高薄 敏史 (TAKASUSUKI, TOSHIFUMI)

獨協医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80348052

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000 円

研究成果の概要(和文)：Dアミノ酸オキシダーゼ(DAO)ミュータント系マウスを用いて、侵害受容刺激による脊髄後角表層におけるNK1 receptor internalization (NK1Ri) への影響およびブレインビジョンによるシナプス変化について観察した。ホルマリン試験では、DAOミュータント系マウスにおいて有意な疼痛行動の増強を認めた。またコントロールマウスのホルマリン注射側における脊髄後角NK1Riの増加を認めた。さらにブレインビジョンにおいて、後根流入部位の電気刺激による後角抑制性シナプス成分の減弱を認めた。これらの結果からDAOの侵害受容刺激によるシナプス伝達への関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To clarify the influence of nociception on spinal synaptic transmission, we assessed the NK1 receptor internalization (NK1Ri) and optical synaptic imaging using brain vision. The nociceptive behavior induced by formalin injection was significantly enhanced in mutant mice lacking DAO. The number of NK1Ri positive neurons was increased by formalin injection in ipsilateral dorsal horn. Furthermore, electrical stimulation of dorsal root ganglion attenuated the fluorescent change of voltage-sensitive dye in dorsal horn. These results suggest that DAO is involved to the nociceptive synaptic transmission in spinal dorsal horn.

研究分野：痛みが脊髄シナプス伝達に与える影響

キーワード：D-アミノ酸オキシダーゼ NK1 internalization ホルマリン試験 ブレインビジョン

1. 研究開始当初の背景

D - アミノ酸のひとつである D - セリンは NMDA 型グルタミン酸受容体のグリシン結合部位に対するコ・アゴニストのひとつであり、脳内、主に海馬、大脳皮質に高濃度に存在することが知られている。そしてこの D - セリンが学習や記憶といった高次脳機能へ関与していること、統合失調症や筋萎縮性側索硬化症 (ALS) の発症に関与していること、NMDA 受容体を介したシナプスに対し影響を及ぼすことが明らかになっている。またアストロサイトからの Ca^{2+} 依存性 D - セリンの放出が NMDA 依存性の長期増強 (LTP) 発症に関与しているとも言われている。以前、当教室において D - アミノ酸の酸化的脱アミノを触媒する D - アミノ酸オキシダーゼ (DAO) ミュタント系マウスを用いて侵害受容行動評価法のひとつであるホルマリン試験を行ったところ、第 2 相 (ホルマリン皮下注 10 ~ 60 分後) が有意に増強され、さらにパッチクランプ・ホールセル記録により脊髄後角における NMDA 受容体を介した興奮性シナプス後電流 (EPSCs) が増強されることを報告した (Neurosci Lett 2001;297;25-28)。DAO は生体内では小脳、脊髄といった中枢神経に存在しており、D - セリンおよび DAO が何らかの形で侵害受容性シナプス伝達に関与している可能性は非常に高く、シナプス伝達に対する影響を明らかにすることは痛みの研究において極めて有用と考えられる。興奮性シナプスへの影響を評価する方法として NK1 受容体インターナリゼーション (NK1Ri) があり、この免疫組織学的方法を用いて当科ではサブスタンス P の第 1 次求心性線維からの放出を評価した経験がある。また比較的新しい神経科学的観察法のひとつとして、膜電位イメージングシステム (MiCAM02、Brain Vision 社) があり、近年、この方法を用いて、視覚化されたシナプス研究が進んでいる。当研究室においてもこの方法を用いたシナプス研究を行っており、脊髄における興奮性および抑制性シナプス伝達の観察を行っている。これらの研究手法を利用して、D - アミノ酸オキシダーゼおよび D - セリンが脊髄侵害受容性シグナルに与える影響を明らかにすることは、痛みのメカニズムの解明、難治性疼痛に対する新たな治療の開発に役立つのではないかと考えた。

2. 研究の目的

D - セリンおよび D - セリンの酸化的脱アミノを触媒する DAO が脊髄侵害受容性シナプス伝達において何らかの関与を有する可能性が高いことは過去の報告からも明らかである。そして DAO は NMDA 受容体を介したシナプス伝達に影響を与えていることも当科の実験において証明されている。本研究の目的は、コントロールマウスと DAO ミュタント系マウスを用いて侵害受容性

行動の違いを明らかにする、そして興奮性神経ペプチドであるサブスタンス P の放出を NK1Ri を指標に免疫組織学的に評価、比較を行う。さらに膜電位イメージングシステムを用いて、侵害受容が脊髄シナプス伝達に与える影響を視覚的かつ経時的な観察により、コントロールマウスと DAO ミュタント系マウスの間で、膜電位変化が起こる部位や時間的違い、そして蛍光強度とその変化など、さらに詳細なシナプス伝達の相違を明らかにすることである。

これらの研究結果から、侵害受容性シナプス伝達における D - セリンおよび DAO の役割を解明することが期待される。

3. 研究の方法

(1) NK1 receptor internalization の評価
脊髄後角第 1 次求心性線維からのサブスタンス P 放出の指標として NK1 receptor internalization (NK1Ri) の免疫組織学的評価を行った (Anesthesiology 2011; 115: 153-64)。5 - 8 週のミュータント系 ddY/DAO- マウスおよび ddY/DAO+ マウスを使用し、それぞれの左後肢足底部に 2.5% ホルマリン (50 μl) を皮下注し、侵害受容モデルを作製、ホルマリン皮下注 10 分後にペントバルビタール (50 mg/kg) 腹腔内投与による鎮静下に 4% パラホルムアルデヒドを用いて経心臓的灌流固定を行った。マウスから脊髄を取り出し、4% パラホルムアルデヒドに一晩保存 (後固定) し、O.C.T コンパウンドに包埋し - 70℃ で冷凍保存後、クリオスタットを用いて厚さ 30 μm の凍結切片を作製した。この切片をスライドガラスに定置し、抗 NK1 ポリクローナル抗体を滴下し一晩常温保存した。翌日、2 次抗体 Alexa 488 (NK1 受容体を標識) Alexa 594 (ニューロンを標識) を滴下し、カバーガラスで覆い、蛍光仕様システム顕微鏡 (OLYMPUS BX53) を用いて観察を行った。左右脊髄後角表層 (lamina I) における NK1 陽性ニューロンの中で internalization (サブスタンス P の内在化) を示すニューロンの割合 (%) を算出した。この方法を用いてミュータント系 ddY/DAO- マウスおよび ddY/DAO+ マウスにおける侵害受容誘発性脊髄後角サブスタンス P 放出について NK1Ri を示す割合 (%) を基準に比較した。

(2) 膜電位イメージングシステムによる脊髄侵害受容性シナプス伝達の観察

膜電位イメージングシステムを用いて、侵害刺激を加えることによって起こる脊髄シナプス変化を視覚化し、比較した。5 - 8 週のミュータント系 ddY/DAO- マウスおよび ddY/DAO+ マウスから脊髄を摘出、直ちに 95% O_2 、5% CO_2 で飽和した 4 のリンゲル液 (組成: NaCl , 113mM; KCl , 3mM; NaHCO_3 , 25mM; NaH_2PO_4 , 1mM; CaCl_2 , 2mM; MgCl_2 , 1mM; D-glucose, 11mM; pH: 7.4) に浸漬し、硬膜を除去した後スライサーを用いて厚さ 500 μm

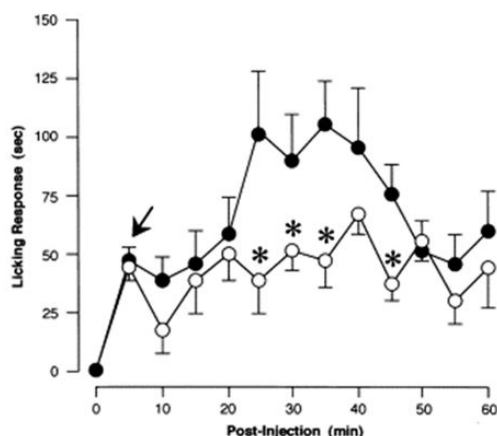
m の後根神経節が付着した状態の脊髓スライス標本を作製した。脊髓標本を顕微鏡のチャンパーに固定し、膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS, 0.3M) を負荷させた状態で CCD カメラシステム (MiCAMO2) 観察下に吸引電極を用いて脊髄後根神経に電気刺激を加え、後角ニューロンの膜電位変化を光学的に変換することで侵害受容によるシナプス活動を視覚的に観察した。この方法により、侵害受容刺激による脊髄でのリアルタイムのシナプス活動を観察し、画像解析ソフトを用いて蛍光強度を測定、初期蛍光強度 (F) に対する蛍光強度変化量 (F/F)、時間変化 (ms) を測定し、2 群間で比較した。

4. 研究成果

(1) DAO ミュタント系マウスのホルマリン試験

ddY/DAO ミュタント系マウス (●) と ddY/DAO+ マウス (○) についてホルマリン試験を行ったところ、第 2 相 (10 - 60 min) における疼痛行動が有意に増強した (図 1)。

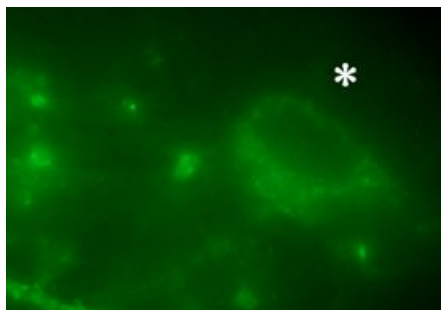
図 1、ddY/DAO ミュタント系マウスと ddY/DAO+ マウスにおけるホルマリン試験



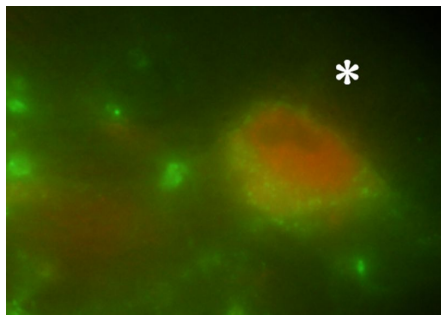
(2) NK1 receptor internalization の評価
ddY/DAO+ マウス下肢足背への 2.5%ホルマリンの皮下注により、同側脊髄後角表層の NK1 receptor internalization が多数観察された (図 2)。しかし、個体により免疫染色にばらつきがあり、2 群間における NK1 受容体インターナリゼーションの発現率の比較には至らなかった。

図 2、(A) 脊髄後角表層に観察された NK1receptor internalization の免疫組織染色像。* は internalization を示す細胞。(B) NeuN による 2 重染色像。

A



B

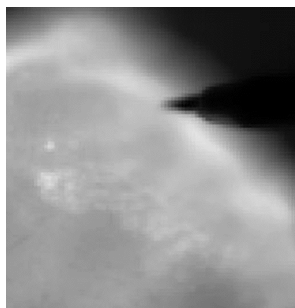


(3) 膜電位イメージングシステムによる脊髄侵害受容性シナプス伝達の観察

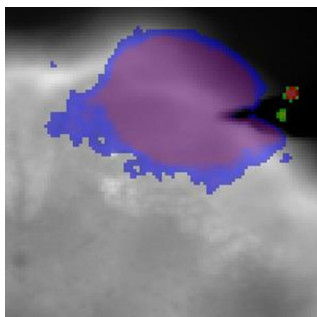
マウスから取り出したスライス標本を記録用チャンパーに固定し、クレブス液灌流下に CCD カメラ (MiCAM2) を用いた高速蛍光測定法を用いて、脊髄後根流入部位に電気刺激を加えることで得られた膜電位変化を記録した (図 3 A - C)。後根流入部位に電気刺激を加えると、脱分極を反映する蛍光強度変化が刺激部位から周辺へ広がることを視覚的に観察できた。そしてこの蛍光強度変化はグルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX 5 μ M) により減弱した。さらにピククリン、ストリキニン灌流下に、坐骨神経部分結紮を行ったマウス脊髄後角における刺激誘発性蛍光強度変化は対照群に比べ有意に増大しており、神経障害性疼痛による何らかの興奮性シナプス成分の亢進を認めた。

図 3、高速イメージングシステムによる膜電位変化の観察。電気刺激により膜電位変化が脊髄後角全体に広がる (A - C)。

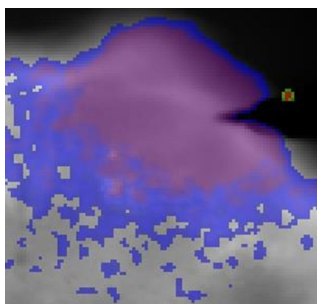
A



B



C



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 5 件)

山口 重樹, 高薄 敏史, 秦 要人, 小澤 継史, 武村 優, Taylor Donald R: オピオイドを理解する 慢性疼痛に対するオピオイド治療が高用量化、長期化する患者の特徴と対応(解説). Locomotive Pain Frontier 5 : 56-58, 2016. 査読なし

高薄 敏史, 山口 重樹, Taylor Donald R: オピオイドを理解する オピオイドを開始するときの併用薬の注意点 薬物代謝(解説). Locomotive Pain Frontier 4 : 112-114, 2015. 査読なし

山口 重樹, 高薄 敏史, 長嶋 祥子, 五月女 俊也, Taylor Donald R: オピオイドを理解する オピオイドを開始するときの併用薬の注意点 相互作用(解説). Locomotive Pain Frontier 4 : 48-50, 2015. 査読なし

五月女 俊也, 山口 重樹, 沼田 祐貴, 高薄 敏史, Taylor Donald R: 【ペインクリニック治療においておさえておくべき薬物相互作用】オピオイド鎮痛薬の薬物相互作用 メサドンの薬物相互作用(解説/特集). ペインクリニック 35: S445-S453, 2014. 査読あり

沼田 祐貴, 山口 重樹, 五月女 俊也, 高薄 敏史, Taylor Donald R: 【ペインクリニック治療においておさえておくべき薬物相互作用】オピオイド鎮痛薬の薬物相互作用 オキシコドンの薬物相互作用

(解説/特集). ペインクリニック 35 : S430-S437, 2014. 査読あり

〔学会発表〕(計 7 件)

佐藤 雄也, 高薄 敏史, 山口 重樹, 武村 優, 堀 雄一: マルチ電極電位計測システムを用いた脊髄後角ニューロンのシナプス変化の観察. 第 20 回日本神経麻酔集中治療学会, 北海道大学学術交流会館 (北海道・札幌市), 2016, 7/16.

武村 優, 浅川 徹也, 高薄 敏史, 濱口 眞輔, 山口 重樹, 堀 雄一: 脊髄後角ニューロンのシナプス伝達変化における神経障害性疼痛の影響: マルチ電極電位計測システムを用いた電気生理学的観察. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市), 2016, 5/27.

五月女 俊也, 高薄 敏史, 寺島 哲二, 山口 重樹, 濱口 眞輔, 堀 雄一: セリンラセマーゼノックアウトマウスでは侵害受容行動は増強される. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会, 神戸ポートピアホテル (兵庫県・神戸市), 2015, 5/28.

T. TAKASUSUKI, Y. NUMATA, K. ISHIKAWA, S. YAMAGUCHI: EFFECT OF PERIPHERAL NERVE INJURY ON GABABERGIC INHIBITORY SYNAPTIC TRANSMISSION IN THE MOUSE SPINAL CORD DORSAL HORN, INTERNATIONAL ANESTHESIA RESEARCH SOCIETY ANNUAL MEETING, HONOLULU (USA) MARCH 21, 2015.

沼田 祐貴, 高薄 敏史, 山口 重樹, 濱口 眞輔: 膜電位イメージングを用いた末梢神経障害による脊髄シナプス伝達変化の解析. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市), 2014, 5/15.

松澤 理恵, 根本 興平, 高薄 敏史, 山口 重樹, 堀 雄一: 坐骨神経部分結紮マウスにおける脊髄 D-セリン含量と NMDA 受容体を介するシナプス伝達に対するブレガバリンの効果について. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市), 2014, 5/15.

五月女俊也, 沼田祐貴, 高薄敏史, 山口重樹, 濱口眞輔, 堀雄一: 膜電位イメージングを用いた神経障害性疼痛による脊髄シナプス変化の観察. 日本ペインクリニック学会第 49 回大会, グランフロント大阪 (大阪府・大阪市), 2014, 7/25.

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

高薄敏史 (TAKASUSUKI Toshifumi)
獨協医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 80348052

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし