

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10419

研究課題名(和文) 腰椎部脊柱管外病変に係る難治性疼痛のメカニズム解明と治療法開発

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism of neuropathic pain due to lumbar extra-foraminal stenosis

研究代表者

西 秀人(Nishi, Hideto)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30382344

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：腰椎部外側病変の神経障害性疼痛の形成には交感神経系が痛覚伝達に対して修飾している可能性がパッチクランプ法により示唆された。また脊髄内メカニズムとして、ミクログリアの活性化と脊髄膠様質細胞の興奮性との間にインターフェロン(IFN)が関連している可能性がある。IFNは興奮性伝達物質グルタミン酸の受容体であるNMDA受容体の作動薬を流した際に観察される脊髄後角細胞の一過性の緩徐な内向き電流を有意に増強する。この作用はIFNが脊髄後角内のミクログリアにあるIFN受容体に結合し、CCL2シグナリングを介して後角細胞のNMDA受容体を活性化していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the mechanism of neuropathic pain due to lumbar extra-foraminal stenosis. We investigated whether the sympathetic nervous system is involved in this radiculopathy by patch-clamp method. The average frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) in spinal nerve ligation (SNL) with resection of sympathetic ganglion model was significantly smaller than that in SNL only model rats. Next, we had investigated the effects of IFN on the glutamate-receptor response potentiation recorded from SG neurons of adult rat spinal cord. IFN significantly enhanced NMDA-induced inward currents, but not AMPA-induced currents. We found this mechanism was that microglia activated by IFN stimulates neuronal CCR2 and increases neuronal NMDA-induced inward currents. These mechanisms are partially a possible explanation for making the persistent neuropathic pain.

研究分野：整形外科

キーワード：腰椎部脊柱外病変 神経障害性疼痛 パッチクランプ法 交感神経 インターフェロン ミクログリア  
Interferon- 脊髄後角

## 1. 研究開始当初の背景

腰部脊柱管狭窄症の神経根型の臨床症状は脊柱管内病変によって腰髄神経が圧迫されて生じることが最も多い。しかしながら、脊柱管外病変(椎間孔部・椎間孔外側病変)も5~20%存在する。脊柱管外病変は画像診断が難しいことに加え、神経痛の発症メカニズムに不明な点が多いことから、見落とされやすく、術後成績不良の第一要因となっている。実際にわれわれの臨床データでは腰部脊柱管狭窄症における再手術例の一番の原因は外側病変の見落としによるものであった。さらに、脊柱管外病変では手術の有無に関わらず難治性の痛み(アロディニア)を生じやすいことが知られているが、詳細なメカニズムは不明である。以前、当研究グループは神経障害性疼痛メカニズムの障害部位の違いによる影響を明らかにするため、ラットを用いて脊髄神経根(root)結紮モデルと後根神経節(DRG)結紮モデル・脊髄神経結紮モデルを作成し、疼痛関連行動を解析した。その結果、root 結紮モデルに比べて、DRG 結紮モデルおよび脊髄神経結紮モデル(両者を外側病変モデルとする)で処置側足底の疼痛閾値が下がっていること、つまり内側病変よりも外側病変において疼痛強度が強い事が判明した。さらに in vivo パッチクランプ法により脊髄後角細胞における自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)を電気生理学的に解析したところ、外側病変モデルでsEPSCが増大していることも判明した。この電気生理学的な結果は脊髄後角細胞の中樞性感作(神経可塑性)が外側病変において強く発現していることを裏付けた。さらにこれらモデル間では神経障害性疼痛発症に非常に重要な因子である脊髄後角のミクログリアの活性化が疼痛強度と相関することも判明した(Takiguchi et al. Mol Pain 8:31, 2012)。ATP受容体P2X4受容体を介した脊髄後角ミクログリアの活性化が神経障害性疼痛に重要な因子であることが報告されて以来、ミクログリアに関連した研究は種々行われており、疼痛学領域ではトピックスとなっている。我々が報告した外側病変における疼痛強度の増強も脊髄内ミクログリアの活性化が脊髄後角細胞の中樞性感作(神経可塑性)に寄与したと思われる。しかし、なに故、外側病変でより強くミクログリアの活性化の出現が起こるのか不明であった。

## 2. 研究の目的

外側病変において強い疼痛が生じる原因として、我々はまず交感神経系の関与に注目した。これは、様々な神経障害性モデルにおいて交感神経の外科的・化学的遮断は疼痛の改善を認めることが報告されていること、及び解剖学的に外側病変は交感神経の影響を受けやすい位置にあるためである。交感神経は交感神経幹から灰白交通枝によってDRGや末梢側の脊髄神経に合流し、血管などの

末梢組織に分布している。過去の研究から神経障害性モデルでDRGに交感神経線維が発芽することが知られている(McLachlan et al. Nature, 1993)。さらに交感神経がDRGにおけるTNF- $\alpha$ 、IL-1、TGF- $\beta$ 1といったサイトカインを制御していることも報告されている(Lavand'homme et al. Pain, 2003)。本研究ではまず、神経障害性疼痛モデルラットを用いて、神経障害性疼痛の形成における交感神経の影響を検討する。

また、我々は脊髄内におけるメカニズムでニューロン-ミクログリアのクロストークにおける炎症性サイトカインの一種であるインターフェロン- $\gamma$ (IFN $\gamma$ )の役割に注目した。IFN $\gamma$ は末梢神経損傷後の脊髄後角で発現が増加し、またラットに髄腔内投与するとアロディニア形成が確認されることから、脊髄内で神経障害性疼痛の形成に関与していると考えられる。しかしながら、IFN $\gamma$ の脊髄後角レベルにおける疼痛増強作用についての報告は少ない。従って本研究では、IFN $\gamma$ の脊髄後角細胞における興奮性増強作用を、電気生理学的に解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経障害性疼痛モデル作成

外側病変による神経障害性疼痛を想定したモデルとしてSpinal nerve ligation(SNL)モデルを用いた。雄性Sprague-Dawleyラットに5週齢の時点でL5腰神経を後根神経節遠位2mmで6-0絹糸で結紮した。疼痛はvon Frey testで評価し、術後7~10日の時点で下肢にallodynia様の反応が出現するのを確認して電気生理学的実験に使用した。

### (2) 交感神経節切除モデル

神経障害性疼痛の発症・増強に交感神経が関与しているかどうか、脊髄 in vivo パッチクランプ法を用いて電気生理学的に解析した。上記SNLモデルラット作成時に腰部交感神経節の切除を加えたモデル(交感神経節切除群)を作成した。

### 《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 $\mu$ m)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650 $\mu$ mの脊髄横断スライス標本を作製した。切り出したスライスを直ちに記録用チャンパーに移し、酸素付加、加温(36 $^{\circ}$ C)した人工脳脊髄液により、15~20 ml/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; CaCl $_2$ , 2.5; MgCl $_2$ , 1.2; NaH $_2$ PO $_4$ , 1.2;

glucose, 11; NaHCO<sub>3</sub>, 25(pH=7.4)であった。パッチ電極を脊髄後角表面に刺入し、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; CaCl<sub>2</sub>, 0.5; MgCl<sub>2</sub>, 2; EGTA, 5; HEPES, 5; Mg-ATP, 5。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、検定は対応のある群はStudentのpaired t-testで行い、対応の無い群はWelch t-testを用いた。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1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

(1) SNLモデルラットにおいて交感神経節切除が脊髄後角における興奮性シナプス伝達にどのような影響を与えるかそれぞれの群においてsEPSCの差を検討した。SNLモデルラットではsEPSCの発生頻度ならびに振幅の平均値が16.2 ± 2.0 Hz, 20.9 ± 2.4 pAであったのに対し(n = 18) SNL + 交感神経節切除モデルでは、それぞれ5.7 ± 0.7 Hz, 25.0 ± 2.5 pA(n = 18)であった。両群間においてSNL単独群に比べて、SNL + 交感神経節切除モデルはsEPSCの頻度が統計学的有意差をもって、少ない事が判明した。これらの結果から腰部交感神経は神経障害性疼痛に対して疼痛を増強させる働きがあると示唆された。

(2) 炎症性サイトカインの1つIFNの脊髄内ミクログリアと脊髄後角細胞との相互作用に与える影響についてパッチクランプ

法を用いて検討を行った。まず、興奮性伝達物質グルタミン酸の受容体であるAMPA受容体、NMDA受容体にそれぞれの作動薬を流した際に観察される脊髄後角細胞の一過性の緩徐な内向き電流(それぞれAMPA電流、NMDA電流とする)に対するIFNの作用を解析した。IFNのAMPA電流への影響について検討を行ったところ、AMPA電流には特に変化を認めなかった(100.0 ± 3.7%, n = 11, p = 0.87)。一方でIFNはNMDA電流を有意に増強させた(147.3 ± 10.7%, n = 14, p = 0.0002)。このIFNによるNMDA電流増強作用は、IFN受容体の選択的アンタゴニストを同時に適用することで抑制されたことから、IFN受容体を介した作用であると考えられた。IFNによるNMDA電流増強作用はミクログリア活性化のインヒビターであるミノサイクリンにより抑制された。またパッチ電極内にIFNの細胞内シグナル伝達経路であるJAK-STAT経路の阻害薬を混入してもIFNによるNMDA電流増強作用は抑制されなかったことから、IFNはミクログリア上のIFN受容体を介して作用していることが明らかとなった。次にIFNがミクログリア上のIFN受容体に結合したのちにどのようなシグナルを介して膠様質細胞のNMDA電流を増強させているのかを調べるため、ニューロン-グリア間のクロストークを担っていると報告されている代表的なケモカインであるCCL2のアンタゴニストを共に灌流投与したところ、IFNによるNMDA電流増強作用はブロックされた。このことからIFNは脊髄後角内のミクログリアにあるIFN受容体に結合し、CCL2シグナリングを介して膠様質細胞のNMDA受容体を活性化していることがわかった。以上のようにIFNはミクログリアを介した間接的な作用にてNMDA受容体を活性化していることが判明したが、このことは神経障害性疼痛形成に寄与している可能性があると考えられた。

#### 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2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: 1-10, 2016

2. 曽根勝 真弓, 谷口 亘, 山中学, 西尾 尚子, 筒井 俊二, 西 秀人, 中塚 映政, 吉田 宗人: インターフェロン- $\gamma$ によるCCL2/CCR2シグナリングを介した脊髄後角細胞興奮性増強のメカニズム. *脊髄機能診断学* 37: 11-18. 2017

〔学会発表〕(計 件)

1. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Nakatsuka T, Yoshida M: The role of NMDA receptor activation by IFN in the spinal dorsal horn neurons. Orthopaedic Research Society 2016 Annual Meeting, 2016.3, Orlando
2. Sonekatsu M, Taniguchi W, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Nakatsuka T, Yoshida M: Interferon-increases the NMDA-induced inward current in spinal dorsal horn neurons via CCL2/CCR2 signaling. International Association for the Study of Pain 16th World Congress on Pain, 2016.9, Yokohama
3. 曽根勝真弓、谷口 亘、山中 学、西尾尚子、筒井俊二、西秀人、中塚映政、吉田宗人：インターフェロン-によるCCL2/CCR2 シグナリングを介した脊髄後角興奮性増強のメカニズム。第 37 回脊髄機能診断研究会，2016.2.6，東京

〔図書〕(計 2 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

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 無し

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

西 秀人(Nishi Hideto)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30382344

### (2)研究分担者

橋爪 洋(Hashizume Hiroshi)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10326382

谷口 亘(Taniguchi Wataru)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：20453194

### (4)連携研究者

曽根勝 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