

平成 30 年 6 月 27 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20113

研究課題名(和文)膜電位イメージングを用いた エンドルフィンによる脊髄鎮痛機序の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of antinociceptive effect on spinal level of beta-endorphin by using voltage imaging system

研究代表者

寺島 哲二 (TERASHIMA, TETSUJI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：30526398

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄後角における エンドルフィンの鎮痛作用機序の1つに、サブスタンスP放出抑制を介さない機序があることを以前に報告している。このメカニズムをさらに明らかにするため、ブレインビジョンを使用した、神経障害性疼痛マウスの脊髄後角におけるシナプス伝達の変化を観察した。脊髄後根からの電気刺激による脊髄後角の経時的な蛍光高度変化を確認し、対照群に比べサブスタンスPによる興奮性シナプス伝達の割合が変化していることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We have reported that one of the antinociceptive mechanisms of beta-endorphin acted without releasing of substance P from primary afferent. In order to further elucidate such mechanisms, we assessed the optical synaptic transmission for neuropathic mice by using brain vision system. Electrical stimulation of dorsal root ganglion showed that fluorescent change of voltage-sensitive dye in dorsal horn in a sequential manner, and the ratio of the release of substance P rised compared with control group.

研究分野：脊髄における鎮痛機序

キーワード： エンドルフィン オピオイド受容体 脊髄後角 サブスタンスP NK1受容体拮抗薬 坐骨神経結紮モデル Brain Vision 膜電位イメージング

## 1. 研究開始当初の背景

内因性のペプチドホルモンである エンドルフィン<sup>1</sup>は、主にオピオイド受容体を介して強力な鎮痛作用のみならず多幸感といった情動系や精神活動にも影響を与えられている。ヒトではストレスを感じると前駆体のプロピオメラノコルチンが下垂体前葉から放出され、プロセッシングを受けて エンドルフィンとなる。オピオイド受容体は脳・脊髄といった中枢神経系から、末梢組織の消化管に至るまで分布されており、受容体を介してそれぞれ情動の安定化や鎮痛作用、消化管運動の抑制を引き起こしている。

$\mu$ オピオイド受容体が刺激されるとアデニル酸シクラーゼの活性化が抑制され、cAMP が増加することにより、神経終末での電位依存性カルシウムチャンネルが抑制されてシナプス伝達が抑制される。またカリウムチャンネルが活性化することによりニューロンの興奮性を鎮め、侵害受容の伝達が抑制される。さらに中枢神経系では、脳から脊髄へ下行して痛覚刺激を減弱させる下行性抑制系の活性化にも関与しており、侵害受容に対するシナプス伝達の影響を明らかにすることは、痛みの研究に有用であると考えられる。

このように内因性の鎮痛機構に重要な役割を果たしている エンドルフィンに着目し、以前われわれは、脊髄における鎮痛作用機序の一つとして、興奮性シナプス伝達の指標である neurokinin 1 (NK1) internalization を指標に免疫組織学的手法を用いて、エンドルフィンのくも膜下投与が脊髄後角表層における興奮性神経伝達物質であるサブスタンスPの求心性一次線維からの放出を抑制していることを明らかにした。

一方、本研究の特色として神経の興奮を経時的に視覚化し観察することができる膜電位イメージングシステム(MiCAM02、Brain Vision)を用いたシナプス研究の報告が近年増加している。われわれの施設でもこの設備を用いた脊髄におけるシナプス伝達の研究を行っている。

これらの手法を組み合わせることによって、鎮痛効果を有する エンドルフィンがサブスタンスP放出を抑制する際の痛みのシナプス伝達がどのような影響を与えるのか明らかにすることは、既存の鎮痛法に抵抗性の難治性疼痛治療に貢献できるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

臨床で広く使用されるオピオイド性鎮痛薬のモルヒネは、くも膜下投与により脊髄後角表層における一次求心性線維からの興奮性伝達物質であるサブスタンスP放出を抑制させることが知られている。

一方われわれは、内因性オピオイドである エンドルフィンのくも膜下投与による鎮

痛作用を確認し、さらに各選択的オピオイド受容体拮抗薬との相互作用を調べた。すると今まで知られていた  $\mu$ 受容体を介した鎮痛機序だけではなく、受容体を介した鎮痛機序では、興奮性神経伝達物質であるサブスタンスPの放出に影響を与えない機序で作用していることが示唆された。

つまり侵害受容モデルにおける エンドルフィンのくも膜下投与が、 $\mu$ 受容体を介するものではサブスタンスP放出抑制をすることからシナプス前性変化であるが、オピオイド受容体を介するものではサブスタンスP放出抑制以外の機序で鎮痛作用を有していたことを明らかにした。

本研究では、これら免疫組織学的手法の結果をさらに解明するため、NK1 受容体拮抗薬投与下における、神経障害性疼痛を発症させたマウスの脊髄神経根を付着させたスライス標本を使用して、膜電位感受性色素を前処置した脊髄スライスの神経根に電気刺激を加えることで惹起される、脊髄後角ニューロンの膜電位変化を、膜電位イメージングシステムを用いて視覚化し、その広がり方、時間的变化、蛍光強度変化の観察を行い、侵害受容性シナプス伝達の評価を行うことで内因性オピオイドペプチドの鎮痛作用機序の解明に寄与することが目的である。さらに、NK1 受容体以外に関与する神経伝達物質として、抑制性のGABAやグリシン、興奮性のグルタミン酸やNMDA受容体の影響を排除した条件下でのシナプス伝達についても明らかにする。

これらの研究成果から、侵害受容性シナプス伝達におけるサブスタンスPの影響を解明することが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) フォンフライテスト

生後3-4週のICR-マウスに、全身麻酔下にてSeltzer法による坐骨神経部分結紮を行い神経障害性疼痛モデルを作成する(Ligation群)。手術3日、6日、7日後に、手術側後肢へフォンフライテストを施行し機械刺激性アロディニアが発現していることを確認する。なお対照群は同様の条件下にてsham手術を行う。

### (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光学的観察

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、比較する。生後3-4週のICR-マウスにペントバルビタール(50mg/kg)を腹腔内投与し、全身麻酔下に腰部脊髄を摘出し、直ちに95%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>で飽和した4のリンゲル液(組成:NaCl,113mM; KCl,3mM; NaHCO<sub>3</sub>,25mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,1mM; CaCl<sub>2</sub>,2mM; MgCl<sub>2</sub>,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

いて後根神経節が付着した状態の脊髄スライス(厚さ 500  $\mu\text{m}$ ) 標本を作製する。脊髄標本を顕微鏡のチャンバーに固定し、フィルターの上で 30 分間固定。その後膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS, 0.3M) を 15 分間暗所にてインキュベーションさせ色素を洗浄し、その後 30 分以上灌流させた。CCD カメラシステム (MiCAM02) 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する。

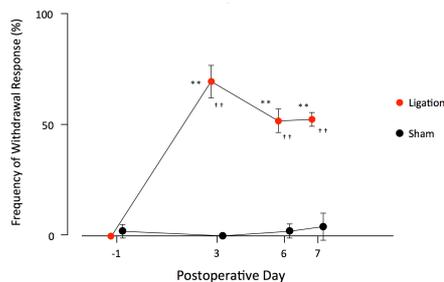
リアルタイムのシナプス活動を観察するとともに、画像解析ソフトを用いて蛍光強度を測定、初期蛍光強度 (F) に対する蛍光強度変化量 ( $\Delta F/F$ )、時間変化 (ms) を測定し、Ligation 群と対照群とで比較する。

#### 4. 研究成果

##### (1) フォンフライテスト

手術側後肢へフォンフライフィラメントを接触させ疼痛行動を観察した。坐骨神経部分結紮マウス (Ligation 群) では、結紮 3 日後より痛み閾値が有意に低下し、機械刺激性アロディニアの発症を認めた。一方対照群 (sham 手術群) ではアロディニアを認めなかった。(図 1)

図 1、フォンフライテスト



##### (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光学的観察

全身麻酔下に腰部脊髄後根付きスライスを摘出し、チャンバーに固定した。膜電位感受性色素 (di-4-ANEPPS) で処置後、 Krebs 液を灌流し CCD カメラ (MiCAM02) を用いて高速蛍光測定法にて観察した。手術側の脊髄後根に電気刺激 (20V, 0.5ms) を加え C-繊維へ選択的に刺激を行い得られた膜電位変化を記録した。脊髄後根からの電気刺激により、脱分極を反映する蛍光強度変化が、脊髄後角に伝わる経時変化とともに観察することができた。(図 2)

さらに、手術側の後角部位 (図 2・白丸部分) の蛍光高度の変化を数値化し、経時的にグラフ化した (図 3)。

図 2、高速イメージングシステムによる膜電位変化の 1 例 (対照群)。手術側脊髄後根からの電気刺激により、後角ニューロンの蛍光強度変化をカラー化した。(a) - (e) は図 3 の経時的時刻に対応。白矢印は手術側の脊髄後根。白丸は図 3 の蛍光強度計測範囲を示す。

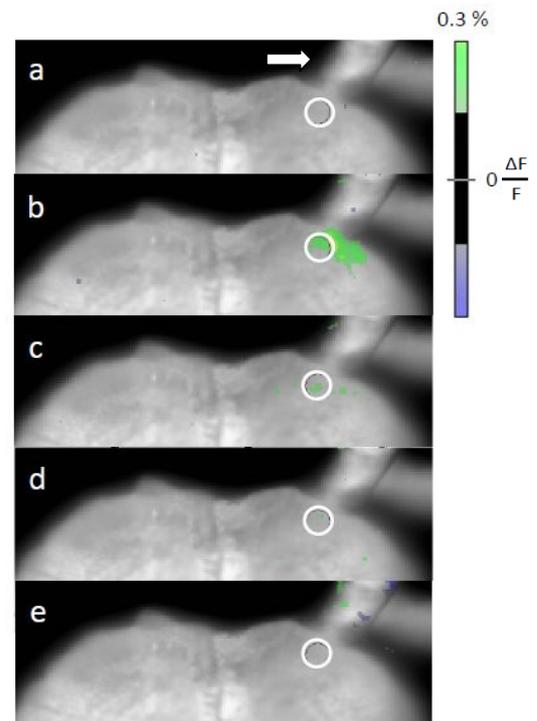
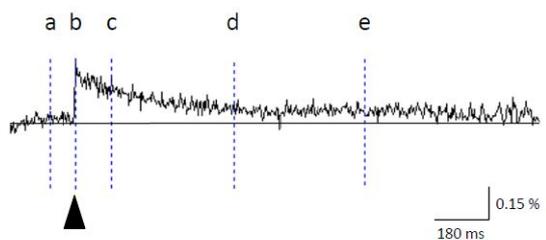


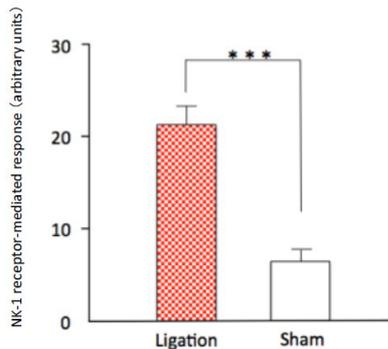
図 3、脊髄後角部位 (図 2・白丸) における蛍光強度変化をグラフ化した。



なお脊髄後根へ電気刺激を加えた脱分極性の成分 (図 3・b-d の範囲) は、Ligation 群の方が対照群に比べて増大傾向となった。さらに NK1 受容体拮抗薬 (CP99994) を灌流させると、両群ともに電気刺激を加えた脱分極性の成分は減弱した。

一方ピククリン (1  $\mu\text{M}$ )、ストリキニン (10  $\mu\text{M}$ )、CNQX (10  $\mu\text{M}$ )、APV (50  $\mu\text{M}$ ) の灌流下で脊髄後根へ電気刺激を加えた脱分極性の成分 (A) と、その後さらに NK1 受容体拮抗薬 (CP99994) を灌流させた後の脱分極性の成分 (B) について比較検討した。つまり B-A による、NK1 受容体が関与する蛍光高度の反応の差は、Ligation 群で有意に大きかった。(図 4)

図4、ピククリン(1 μM)、ストリキニン(10 μM)、CNQX(10 μM)、APV(50 μM)灌流下での、NK1受容体成分が関与している蛍光強度変化の差の比較。



(3)以上より、膜電位イメージングシステムを用いた蛍光色素の観察から、Ligation群の方が対照群に比べ、脊髄後根からの刺激による脱分極性の成分の増強が認められた。さらに抑制性神経伝達物質であるGABAやグリシンのアンタゴニスト、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸やNMDA受容体アンタゴニストの存在下でのNK1受容体成分が関与している割合も、Ligation群で有意に大きいことが示唆された。

#### 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4件) 木村 嘉之、寺島 哲二、小澤 継史、濱口 眞輔、山口重樹、鉄剤投与で改善した慢性疼痛の1例、慢性疼痛、査読あり、36巻、2017、137-138

濱口 眞輔、小澤 継史、沼田 祐貴、寺島 哲二、木村 嘉之、北島 敏光、慢性疼痛患者に対する柴胡剤の使用経験、痛みと漢方、査読あり、26巻、2016、170-174

秦 要人、寺島 哲二、小松崎 誠、山口重樹、濱口 眞輔、フェンタニル貼付剤の乱用が自殺企図の誘因となった慢性痛の一症例、慢性疼痛、査読あり、35巻、2016、57-60

濱口 眞輔、小澤 継史、沼田 祐貴、寺島 哲二、慢性疼痛患者に対する柴胡剤の使用経験、痛みと漢方、査読あり、26巻、2016、170-174

〔学会発表〕(計8件)

寺島 哲二、海外医療ボランティアのすすめ～獨協医科大学病院の試み～、第18回日本麻酔科学ウインターセミナー、2018.2.11、札幌ロイトンホテル(北海道)

寺島 哲二、TIVAハンズオンセミナー、第24回日本静脈麻酔学会、2017.12.2、海峡メッセ下関(山口県)

K Kaneko, T Saotome, Y Numata, I Terashima, S Yamaguchi, Y Hori、Slow changes in neuronal excitability in the spinal superficial dorsal horn evoked by the activation of unmyelinated primary afferents、47th annual meeting of the Society for Neuroscience、2017.11.14、ワシントンDC(アメリカ)

高薄 敏史、山口 重樹、寺島 哲二、依存性薬物の光と影 適正使用を目指してオピオイド鎮痛薬の光と影 本邦における適正使用について、第39回日本生物学的精神医学会・第47回日本神経精神薬理学会合同年会、2017.09.29、札幌コンベンションセンター(北海道)

金子 堅太郎、五月女 俊也、沼田 祐貴、寺島 哲二、山口 重樹、堀 雄一、一次求心性線維の電気刺激による脊髄後角表層のサブスタンスPを介した脱分極の同定、2017.4.28、第94回日本生理学会、アクトシティ浜松(静岡県)

木村 嘉之、寺島 哲二、小澤 継史、濱口 眞輔、山口 重樹、鉄剤投与で改善した慢性疼痛の1例、第46回慢性疼痛学会、2017.2.18、京都三大学 教養教育共同化施設「稲盛記念会館」(京都府)

寺島 哲二、山口 重樹、濱口 眞輔、高薄 敏史、木村 嘉之、篠崎 未緒、不適切なオピオイド治療が原因と考えられた振り込め詐欺被害、第46回慢性疼痛学会、2017.2.17、京都三大学 教養教育共同化施設「稲盛記念会館」(京都府)

寺島 哲二、高薄 敏史、木村 嘉之、濱口 眞輔、山口 重樹、モンゴル国における小児麻酔経験と術中酸素供給遮断という体験から、第35回蘇生学会、2016.11.11、久留米シティプラザ(福岡県)

〔図書〕(計1件)

山口 重樹、寺島 哲二、南山堂、薬局、2018、152(52-57)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺島 哲二 (TERASHIMA TETSUJI)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：30526398

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし