

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06692

研究課題名(和文) マウス片側後肢血流遮断直後の中枢神経系の活動増強とNOの関連性の解明

研究課題名(英文) Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischemia in mice

研究代表者

大西 毅 (Onishi, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：60804573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの末梢組織の血流遮断後の急性期より中枢神経系の興奮が両側性に起こることを発見し、拡散性に富む神経伝達物質である一酸化窒素(NO)を想定し、その作用機序を検証した。その結果、脊髄に存在する神経型NO合成酵素(nNOS)の活性化によって産生されたNOが、両側性に神経活動を増強させることを可視化された種々のイメージング法によって明らかにした。また、神経障害性疼痛の形成に關与するとされるグループ2代謝型グルタミン酸受容体(Group II mGluR)とnNOSの關与があることを組織学的にも証明した。これらをまとめてJournal of Physiologyに投稿し、受理された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢の傷害後、長期の経過を経て神経障害性疼痛が発症することは知られているが、その過程や傷害直後の急性期に起こる変化については未解明な点が多い。本研究では末梢の変性直後に脊髄で起こる活動増強に、拡散性に富む一酸化窒素(NO)が關与することを明らかにした。また、マウスにおいて両側性に活動増強を認めることから、新たな疼痛モデルになることも期待されると考える。

研究成果の概要(英文)：We found that central nervous system excitation occurs bilaterally from the acute phase after one-leg ischaemia in mice, and we hypothesized that nitric oxide (NO), which diffuses in the spinal cord to induce spatially spreading potentiation. In the present study, we revealed that NO produced by activation of neural NO synthase (nNOS) in the spinal cord was induced acute neural potentiation bilaterally. We also found the relationship between NO and group 2 metabotropic glutamate receptors, which is known to the potentiation after ischemic conduction block, as in neuropathic pain. This study was accepted in 'The Journal of Physiology'.

研究分野：麻酔科学分野

キーワード：一酸化窒素 グループ2代謝型グルタミン酸受容体 脊髄 両側性 マウス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛の作用機序解明のためにこれまで様々な報告がなされてきたが、疼痛の形成は末梢の変性後、急激に起こるものではなく、一定の期間を経て発症するとされてきた。動物実験を行う中で同様のモデルを作成するには、モデル作成後一定の期間を空ける必要があり、変性直後の急性期に起こる機序の変化についてはなかなか明らかにすることが難しかった。ミトコンドリア電子伝達系を構成するフラビン蛋白が細胞興奮時に発する自家蛍光を利用したフラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて、申請者の所属した研究室では、末梢の神経切断や血流遮断直後より大脳皮質体性感覚野や脊髄など中枢神経系の活動が増強することを報告した。その際に、血流遮断を行わない反対側の後肢でも、血流遮断直後より神経活動が増強することを発見した。一酸化窒素(以下 NO)は、空間的拡散性に優れ、神経系における産生は疼痛などを誘発することが知られている。そこで申請者は、NO の産生を阻害する薬剤(L-NAME)を髄腔内投与したところ、大脳皮質体性感覚野と脊髄における神経活動増強が有意に抑制される結果を得た。そこで、末梢変性後の急性期に産生された NO がその後どのような変化を引き起こすのか、検討することとした。

2. 研究の目的

急性期の神経活動増強を誘発する NO と、作用機序や神経障害性疼痛との関連性について調べることとした。また、神経障害性疼痛につながる物質として関連が報告されている代謝型グルタミン酸受容体 型 (以下 Group mGluR) と神経細胞に存在する NO 合成酵素 (以下 nNOS) との関連性についても調べた。

3. 研究の方法

(1) 血流遮断直後に起こる脊髄応答増強と nNOS との関連性の生理学的証明

血流遮断後早期より神経活動増強に関与する NO の産生が nNOS の発現により起こるものであるか、フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いて検討した。

C57/BL6 ストレインの nNOS ノックアウトマウスと naïve マウス(6~9 週齢)を用いる。ウレタンの腹腔内投与にて麻酔し、気管切開による気道管理を行った。大脳皮質体性感覚野の測定時は、歯科用セメントを用いてマウスの頭部を固定し、頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィンを薄く塗布した。脊髄を観察する際は、マウスの背部を切開し、第 1 腰椎と第 2 腰椎の 2 椎間を切除した。硬膜は正常のままとして脊髄固定具を用いて椎体を固定し、脊髄表面を 2% アガロースで被覆した。測定は暗視下に置いて行った。体性感覚野、脊髄共に、青色励起光(450-490 nm)を照射し、放射される緑色自家蛍光(500-550 nm)を冷却 CCD カメラにより撮影した。画像は CCD カメラで毎秒 9 フレーム撮影され、記録した。イメージは 50 秒のインターバルを空けて 24 回撮影した。振動刺激はマウスの後肢底部にブラシをあて、50 Hz で 0.6 秒間行った。

血流遮断は、市販のゴム風船を丸めてリング状にし、5 ml 容量のシリンジを切り取って収め、駆血帯とした。マウスの右後肢に装着し、市販の血圧計で約 250 mmHg に加圧した。血流遮断と対側後肢の神経活動を調べる際は、250 mmHg で 2 時間持続的に加圧した。血流遮断同側後肢の実験の際は、250 mmHg で 30 分間駆血し、開放後にイメージングを行った。

(2) in vivo の脊髄および大脳皮質における NO 産生の視覚的な証明

naïve の C57/BL6 マウスを用いて(1)と同様の方法で脊髄観察用のモデルを作成した。処置侵襲による NO の捕捉を防止するため、椎弓切除、脊髄固定後、約 30 分間隔を空けた。その後、NO の蛍光標識物質である DAF-FM を混注した 2% アガロースゲルで被覆し、マウス右後肢を約 250 mmHg で虚血状態としながら観察した。観察光は、青色波長(=450-490 nm)を用いた。

(3) Group mGluR と nNOS の脊髄後角における組織学的関連性の検討

naïve マウスを灌流固定後、素早く脊髄を取り出し、スクロースによる脱水処置を施した後、腰膨大部を中心にクリオスタットを用いて脊髄の凍結切片を作成した。nNOS の抗体および group mGluR を構成する mGluR2/mGluR3 の抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、脊髄後角における両タンパクの分布について観察した。また、nNOS 抗体と Group mGluR を構成する受容体である mGluR2 および mGluR3 の mRNA の局在を確かめるために、in situ hybridization も併せて行った。

4. 研究成果

本項目では、以前に判明していた事柄も含めて研究成果として発表する。

(1) マウス後肢の虚血によって神経細胞の存在する nNOS 由来に NO が産生され、大脳皮質体性感覚野(S1)の神経活動を増強させる

右後肢を上記研究の方法で記載したとおりに虚血状態としたマウスの髄腔内より生理食塩水を投与したマウスでは、時間の経過と共に S1 領域のフラビン蛋白蛍光応答の増強(血流遮断後 120 分時点で $254 \pm 27\%$)を認めたのに対し、NO 産生阻害薬である L-NAME 100 mM を投与したマウスでは、虚血 120 分後でも $114 \pm 10\%$ の応答増強にとどまり、有意に抑制される結果となった。

次に、naïve のマウスと nNOS ノックアウトマウスを用いて、右後肢血流遮断中の S1 のフラビン蛋白蛍光応答を測定したところ、naïve マウスで発現した S1 の神経活動増強は nNOS ノックアウトマウスにおいて有意に抑制される結果を認めた。次に、一時的に虚血状態とした後肢においてもその後の反応に違いが出るか検証したところ、naïve マウスでは再灌流後の後肢への振動刺激に対して、S1 領域の神経活動増強を認めたが、nNOS ノックアウトマウスでは血流遮断前とほぼ同様の反応を示し、有意に抑制される結果となった。以上より、末梢の血流遮断によって、中枢神経系で nNOS 由来に NO が産生され、拡散的に両側性に神経活動を増強させる可能性の高いことが示唆された。

(2) NO 産生による神経活動増強は、脊髄でも認められる

上記のモデルを用いて、血流遮断中の脊髄におけるフラビン蛋白蛍光イメージングを行った。髄腔内に生理食塩水を投与して継続的な虚血状態としたマウスでは、虚血時間の経過と共に、応答の増強を認めたが、L-NAME を髄腔内投与したマウスでは、その増強が有意に抑制された。また、naïve マウスと nNOS ノックアウトマウスで後肢血流遮断中の脊髄の神経活動を観察したところ、naïve マウスでは虚血時間の経過と共に認めた神経活動増強が、nNOS ノックアウトマウスでは有意に抑制される結果となった。末梢からの入力は脊髄後角を通り、その後の脳神経系へと伝達されることから、結果として起こった一連の現象は、脊髄に存在する nNOS が末梢の血流遮断によって活性化し、NO を継続的に産生させることで拡散的に両側の神経活動増強に寄与する可能性の高いことが示唆された。

(3) NO は神経障害性疼痛の誘発にも関与する

NO 産生を人為的に誘発することで、フラビン蛋白蛍光応答が増強するのか、また誘発痛をはじめとした神経障害性疼痛成立に関与するのか検証した。NO 産生を誘発するドナー物質である NOR3 を naïve マウスの髄腔内に投与した結果、投与 30 分後より S1 領域の応答が増強し、120 分後まで漸増する傾向を認めた。誘発痛の評価は von Frey 試験で検証した。生理食塩水を髄腔内投与したマウスの疼痛閾値は変化しなかったのに対し、NOR3 を髄腔内投与したマウスでは疼痛閾値が有意に低下した。以上より、NO の存在は神経活動を増強させ、神経障害性疼痛の形成にも関与することが示唆された。

(4) 脊髄における NO 産生を視覚的に証明した

研究成果で示された結果について、実際に NO 産生を視覚的に証明できるか、観察した。NO の蛍光標識物質である DAF-FM を脊髄観察時の被覆用アガロースゲルに混注し、血流遮断時の蛍光強度の変化を観察した。その結果、駆血用カフを巻いただけの Sham 群のマウスでは時間経過後も蛍光強度の変化は認めなかったが、血流遮断を施行したマウスでは、遮断時間の経過と共に、有意にその蛍光強度が増強した。また、同時時間帯で観察した際に、虚血を行っている側の脊髄の蛍光強度がその反対側の脊髄の蛍光強度より有意に強いことが分かった。以上の結果から、末梢の血流遮断によって遮断された側の脊髄でまず NO が産生され、時間の経過と共に反対側に拡散することで、両側性に神経活動が増強し、持続的な産生や疼痛への機序の変化が起こっていることが推察された。

(5) nNOS と Group mGluR の関連性と神経障害性疼痛へのつながり

代謝型グルタミン酸受容体の一種である Group mGluR は、その機能失活によって神経障害性疼痛を引き起こすことが過去に報告されている。そこで、Group mGluR を構成する mGluR2 および mGluR3 の 2 種類の受容体と、本研究で重要な役割を示す nNOS との関連性について、組織学的に検討した。mGluR2/mGluR3 と nNOS に対する二重蛍光免疫染色法を行ったところ、脊髄後角の浅層(1~2層)において、両物質が存在することが確認されたが、nNOS は細胞体、mGluR2/mGluR3 は周囲を構成する組織に存在したため、同一細胞内における関連性までは分からなかった。そこで、mGluR2 ないし mGluR3 の mRNA と nNOS に対して in situ hybridization によってその局在を調べたところ、nNOS 陽性細胞の約 50% で mGluR2 の mRNA が存在することが分かった。また、mGluR3 についても、nNOS 陽性細胞の約 10% でその関連性が認められた。上記の結果から、後肢の血流遮断によって起こる一連の神経活動増強の過程において、mGluR2 と nNOS が密接に関連していることが示唆された。

上記の結果より明らかになった新規性の高い事柄としては、末梢の変性直後に起こる中枢神経系のモダリティの変化が拡散性の高い NO によってもたらされることが検証できたこと、神経活動増強に関わる NO の in vivo における視覚化イメージングに初めて成功したこと、神経障害性疼痛の形成において、nNOS と Group mGluR がその初期段階で密接に関連している可能性の高いこと、が挙げられる。NO の拡散性によって生じた両側性の神経活動増強については、個体が小さく、脊髄の左右間の距離が短いマウス特有の現象といえるかもしれないが、侵襲を加えていない後肢においても NO によるモダリティの変化を生じているかもしれない今回の実験結果は、今後の神経障害性疼痛の実験においても、新たなモデル動物の形成に役立つ可能性もあると考える。

以上の結果について学術論文にまとめ、Journal of Physiology 誌に投稿、受理され、現在印刷中である。また、本論文はオープンジャーナルで閲覧可能な状態となっているので、詳細な実験結果についてはそちらを参照いただきたい。

5 . 主な発表論文等

(1)〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice

Takeshi Onishi, Tatsunori Watanabe, Mika Sasaki, Yoshinori Kamiya, Masao Horie, Hiroaki Tsukano, Ryuichi Hishida, Tatsuro Kohno, Hirohide Takebayashi, Hiroshi Baba and Katsuei Shibuki

Journal of Physiology. 2019: in press. (DOI: 10.1113/JP277615)

〔学会発表〕(計 1 件)

(1) Takeshi Onishi

Spinal potentiation after hindpawischemia mediated by group mGluRs and nitric oxide in mice

Society for Neuroscience, 2017.

〔図書〕 (計 0 件)

〔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) 研究分担者
なし

(2) 研究協力者
なし