

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16462

研究課題名(和文) 脊髄後角シナプス伝達における生体内D-セリンの機能解明

研究課題名(英文) Study on the function of D-serine of synaptic transmission in the spinal dorsal horn.

研究代表者

加藤 永子 (KATO, EIKO)

獨協医科大学・医学部・助教

研究者番号：10721897

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SR-KOマウスを用いて、以下のことを明らかにした。  
[1]SR-KOマウスは、脊髄後角のNMDA受容体を介した興奮性シナプス伝達が亢進している。[2]SR-KOマウスは末梢神経結紮方法の違いによって、疼痛感受性に対する影響が異なり、Chung法による末梢神経結紮を行うと機械刺激による痛みに対して感受性が増大する。[3]Chung法による結紮を行ったSR-KOマウスでは、末梢結紮SR-KOマウスよりも興奮性シナプス伝達がさらに増強した。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
神経障害性痛は多様な症状を引き起こす難治性の慢性疼痛であり、神経障害性痛の発症メカニズムの解明とその鎮痛法の開発は世界的に重要な課題である。本研究では、SR-KOマウスを用い、内因性D-セリンが神経障害性痛の発症にどのように機能しているか、脊髄における機能をシナプス伝達レベルで電気生理学的に明らかにした。この研究成果は神経障害性痛の発症機序解明に有用な結果をもたらし、既存の鎮痛法に抵抗性である難治性疼痛の新たな治療法の開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present analysis showed the following:

1) The NMDA receptor-mediated neurotransmission was altered in the SDH of the intact SR-KO mice. The synaptic charge transferred during NMDA-EPSC was significantly larger in SR-KO mice than WT mice. 2) Behavioral observations showed the mechanical allodynia in the Chung model was significantly augmented in SR-KO mice compared with WT mice. 3) The synaptic charge transferred during NMDA-EPSC was increased in the nerve-ligated SR-KO mice compared to the intact SR-KO mice.

研究分野：神経生理学

キーワード：神経障害性痛 D-セリン 脊髄後角シナプス NMDA受容体

## 1. 研究開始当初の背景

痛みは、私たちの身体や命を守る生命活動に不可欠であるが、慢性痛といわれる必要以上に長く続く痛みや、原因がわからない痛みは治療が必要な病気である。神経障害性痛は、神経の障害、機能不全など様々な原因によって発症し、様々な種類の痛みを生じる慢性疼痛であるが、この痛みの多様性ゆえに治療を非常に困難にしている。それゆえ、慢性痛の発生機序の解明とその鎮痛法の開発は世界的な研究課題の1つとなっている。

末梢神経傷害による慢性疼痛状況下では、一次求心性線維が痛みの情報を伝える場所である脊髄後角において、N-メチル-D-アスパラギン酸型グルタミン酸受容体(NMDA 受容体)を介したシナプス伝達の過敏化がおきることが明らかになっている。研究代表者はこれまでに、マウスに神経障害性痛を発症した状態下では NMDA 受容体のコ・アゴニストである D-セリンの脊髄含有量が増加し、脊髄後角シナプスにおいて、NMDA 受容体を介した興奮性シナプス伝達が活性化されていることを明らかにしてきた。しかしながら、D-セリンを合成する酵素セリンラセマーゼ(SR)をマウス生体で欠損すると、NMDA 受容体のコ・アゴニストとして推測される表現型とは相反する報告があり、内因性 D-セリンの痛みにおける生理機能は不明な点が多い。内因性 D-セリンが神経障害性痛の発症にどのように機能しているかを明らかにすることは、神経障害性痛の発症機序解明のみならず、その新たな治療法の開発に有用な結果をもたらす、既存の鎮痛法に抵抗性の難治性痛治療の開発に貢献できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、SR 欠損(SR-KO)マウスを用い、脊髄後角シナプスにおける NMDA 受容体を介した興奮性シナプス伝達を電気生理学的に測定するとともに、侵害受容性刺激に対する応答を行動学的に評価することにより、内因性 D-セリンの生体内における痛みの発生機序に果たす役割を解明することである。SR-KO マウスは、化学刺激(ホルマリン)による炎症痛の感受性が増大するという報告があるが、これは、NMDA 受容体のコ・アゴニストであるという観点から推測される表現型とは逆の表現型である。また、生体内において内因性の D-セリンが痛みに関与していることは示唆されたが、脊髄後角におけるシナプス伝達の変化に関しては間接的な検証のみにとどまっている。ゆえに D-セリンの痛みの発生機序に果たす役割を解明するには、さらに詳細な行動学的解析や、脊髄後角におけるシナプス伝達を電気生理学的に解析することが不可欠であり、本研究によって D-セリンの痛みにおける個体レベルでの生理機能と、痛みの情報伝達場所である脊髄シナプスレベルにおける役割を明らかにすることができると思われる。

## 3. 研究の方法

(1) SR-KO マウスの脊髄腰膨大部から 350  $\mu$ m の脊髄切片標本を作成し、一つの細胞の電気生理学的な活動を観察可能なホールセルパッチクランプ法を用いて、脊髄後角表層神経細胞から興奮性シナプス後電流(EPSCs)を記録する。薬剤によって EPSCs を NMDA 成分と非 NMDA 成分とに分離して記録し(図 1)、シナプス電流のピーク電流値から NMDA/non-NMNMD 比を算出する。また、NMDA-EPSCs の波形を指数関数に当てはめ、減衰相における時定数を算出する。これらをコントロールマウスと SR-KO マウス間で比較し、内因性の D-セリン減少によって、NMDA 受容体を介したシナプス伝達が活性、あるいは抑制されるのかを明らかにする。

(2) SR-KO マウスの坐骨神経を部分結紮(Seltzer 法, 1990)した後、Von Frey テスト(マウスの後肢足底にフィラメントを押し付けて機械刺激を与えることで、急性痛を評価するテストだが、慢性疼痛モデルでは慢性疼痛の評価にもなる)を実施し、コントロールマウスと SR 欠損マウスの行動学的差異を比較検証する。

逃避反応として観察される後肢の引き込み回数を測定し、SR 遺伝子欠損によって脊髄内 D-セリン含有量が減少すると、「予想される痛みの程度よりも強い痛みを感じ(痛覚過敏)」たり、「通常痛みを生じない弱い刺激により痛みを感じる(異痛症)」ようになっていたりするのか、あるいは逆に痛みが鈍感になっているのかを評価し、内因性の D-セリンが、機械的侵害受容刺激に対してどのように機能しているかを行動学的に明らかにする。

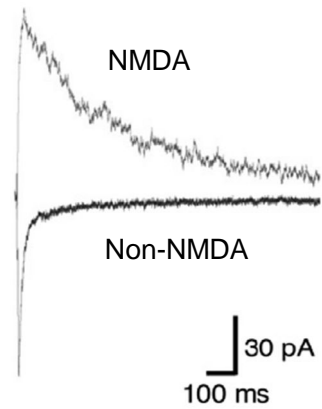


図 1

#### 4. 研究成果

(1) SR-KO マウスの脊髄後角における興奮性シナプス伝達がどのように変化しているかを検討するため、一個の細胞の電気生理学的な活動を観察可能なホールセルパッチクランプ法を用いた解析を行った。マウス脊髄切片標本を作成し、脊髄後角表層神経細胞から EPSCs を記録した。SR-KO マウスではコントロールマウスに比べて NMDA-EPSCs の総電流量が増大しており、脊髄後角の興奮性シナプス伝達が亢進していることが示唆された。

(2) Seltzer 法を用いた坐骨神経部分結紮を行い、神経傷害性痛モデルマウスを作製した。末梢神経の結紮によって現れる機械的アロディニアの程度が、どのように変化しているかを、機械性刺激法を用いて評価したところ、SR-KO マウスとコントロールマウス間に有意な差異は見出されなかった。そこで、坐骨神経を緩く結紮する Bennett 法、および坐骨神経を形成している脊髄神経のうち L5 と L6 を結紮する Chung 法という2種の別法を用いて神経傷害性痛モデルマウスを作製し、機械的侵害受容刺激に対する反応への影響を同様に検討した。SR-KO マウスは、Chung 法神経結紮による機械的アロディニアがコントロールマウスに比べて増強しており、SR の欠損は侵害刺激受容行動に対して各神経結紮モデル間で異なる影響を及ぼすことを見出した。

(3) SR-KO マウスで観察された機械的アロディニアの増強が脊髄後角の興奮性シナプス伝達変化を伴ったものであるかを検証するため、末梢神経結紮を施した SR-KO マウスの脊髄切片標本を用いた電気生理学的解析を行なった。SR-KO マウスは神経結紮を行っていない無処置の状態においてもコントロールマウスに比べて総電流量が増大していることを明らかにしていたが、Chung 法による結紮を行った SR-KO マウスと、末梢神経結紮を行っていない SR-KO マウスとを比較すると、神経結紮を施した SR-KO マウスの方は末梢神経未結紮 SR-KO マウスよりもさらに総電流量が増大していた。このことから、SR-KO マウスでは、SR 遺伝子欠損の結果亢進していた脊髄後角の興奮性シナプス伝達が、Chung 法による末梢神経結紮によってさらに増大することで機械的アロディニアの増強を誘発させている可能性が高いと考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Takaaki Ajima, Shigeki Yamaguchi, Toshifumi Takasusuki, Eiko Kato, Yuuichi Hori	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of peripheral nerve injury on the kinetics of electrically evoked GABA receptor-mediated currents in GABAergic and non-GABAergic neurons of the spinal dorsal horn	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dokkyo Medical Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Yuya Sato, Takaaki Ajima, Toshifumi Takasusuki, Eiko Kato, Yuuichi Hori, Shigeki Yamaguchi	4. 巻 48
2. 論文標題 Pre and post synaptic mechanisms about the peripheral nerve-injured plasticity of nociceptive transmission in the superficial dorsal horn of mouse spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dokkyo Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 23-31
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

1. 著者名 Shunsaku Kobayashi, Shiho Tanaka and Eiko Kato	4. 巻 46
2. 論文標題 NMDA NR2B subunit antagonist may attenuate mechanical allodynia by increasing the release of enkephalin in the spinal dorsal horn	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Dokkyo Journal of Medical Sciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Eiko Kato, Toshiya Saotome, Shigeki Yamaguchi, Kenji Kansaku, Yuuichi Hori
2. 発表標題 Comparisons of Nociceptive Behavior and NMDA receptor-Mediated Synaptic Transmission between Mice Lacking D-Serine Production and Degradation Enzymes
3. 学会等名 Experimental Biology meeting 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eiko Kato, Toshiya Saotome, Teruyuki Fukushima, Toshifumi Takasusuki, Shigeki Yamaguchi, Yuuichi Hori
2. 発表標題 Comparison of effects of serine racemase knockout on nociceptive behavior among different models of neuropathic and inflammatory pain
3. 学会等名 Experimental Biology meeting 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eiko Kato, Teruyuki Fukushima, Masao Maekawa, Yuuichi Hori
2. 発表標題 Different effects of deletion of the serine racemase gene on nociceptive behavior among different models of neuropathic and inflammatory pain
3. 学会等名 The 48th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔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