

平成 21 年 5 月 1 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791065

研究課題名（和文）脊髄損傷後の神経因性疼痛における活性酸素の役割解明

研究課題名（英文）Role of hydrogen peroxide in neuropathic pain after spinal cord injury

研究代表者

高橋 亜矢子（TAKAHASHI AYAKO）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70444544

研究成果の概要：本研究により、マウス脊髄スライス標本において、内因性活性酸素の一つである過酸化水素が、脊髄後角膠様質(SG)細胞の GABAA 受容体介在性微小後シナプス電流の頻度を増加させることを明らかにした。また、頻度増加のメカニズムを薬理的、免疫組織学的検討と遺伝子操作マウスを用いた検討を行った結果、タイプ 1IP3 受容体を介していることが明らかになった。つまり、IP3 受容体は神経因性疼痛メカニズムに重要な役割を果たしていることが示唆された。このことは、新しい神経因性疼痛の治療薬の開発に役立つ可能性を示唆する。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	0	1,900,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	420,000	3,720,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経因性疼痛、活性酸素、GABA 受容体、脊髄後角、IP3 受容体

## 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は難治性の疼痛であり、未だ詳細な発症メカニズムは解明されていない。これまでの研究から、脊髄の侵害受容伝導系におけるシナプスの可塑性が脊髄損傷後の病的疼痛の発症と悪化に重要な役割を果たしていると考えられている。

これまでの研究で、神経損傷後の神経因性疼痛の原因物質として、過酸化水素が注目されている。過酸化水素は主としてミトコンドリアで産生される活性酸素の一つである。活性酸素は、老化、悪性腫瘍、糖尿病、動脈硬化、

肺障害など、遺伝子 DNA 傷害を引き起こし、様々な病態における臓器障害の原因として注目されている。活性酸素のスキャベンジャーが、坐骨神経絞扼モデルの痛覚過敏(Pain 1998,77:173-179)や脊髄神経の結紮モデルにおける機械刺激へのアロディニア(Pain 2004,111:116-124)に対して有効であることから、活性酸素が病的疼痛のメカニズムに大きな役割を果たしていることが示唆されていた。また、Liu らは脊髄損傷後における過酸化水素の濃度の上昇を報告しており(Free Radic.Biol.Med. 1999,27:478-482)、このこ

とからも、過酸化水素と脊髄損傷後の疼痛の関連性が示唆されていた。

一方、過酸化水素は正常海馬においても低濃度レベルで存在し(Brain Res. Brain Res. Protoc. 1998, 3:33-36)、脳障害後再還流により、正常値の数百倍の濃度にまで上昇することが明らかにされている(Brain Res. 1995, 671:181-186)。また、過酸化水素は二次性に NMDA 受容体を賦活化することが明らかにされており(J Neurochem 1999, 73:1181-1188, J. Neurophysiol. 2002, 87:2896-2903)、濃度依存性に、海馬における LTP を変化させることが明らかにされている(J. Neurosci. 2003, 23:269-276)。これらはシナプスの可塑性に対する過酸化水素の修飾作用を示唆している。

## 2. 研究の目的

脊髄損傷後の神経因性疼痛のメカニズムを解明するために、本研究では脊髄損傷後にその濃度の上昇が報告されている活性酸素の一つである過酸化水素が、脊髄レベルにおいて侵害受容投射経路のシナプス伝達に変化を与え、その変化がシナプスの可塑性をもたらす、疼痛が起こる、という仮定を検討するために、

(1) 過酸化水素の脊髄侵害投射経路における興奮性シナプス伝達に対する直接的作用を検討するために、脊髄侵害受容投射経路の介在ニューロンであるSG細胞におけるNMDA受容体介在性EPSCに対する過酸化水素の影響を検討する。

(2) 過酸化水素が脊髄侵害受容投射経路におけるシナプスの可塑性に役割を果たしているのか否かを明らかにするために、SGニューロンのNMDA受容体介在性EPSCのLTPに対する過酸化水素の影響を検討する。

(3) 以上の二つを検討した結果、最終的に、脊髄損傷後に上昇した過酸化水素が、脊髄侵害受容投射経路における興奮性シナプス伝達の可塑性を引き起こし、痛みの原因となことを検討するために、*in vivo*レベルにおいて、過酸化水素の疼痛行動における影響を検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 脊髄スライスSG細胞における抑制性シナプス電流: IPSCに対する過酸化水素の作用の検討

ウレタン麻酔下マウスより脊髄を摘出し、水平断脊髄スライス標本(腰部L4-5)を作製し、パッチクランプ法にてSGニューロンを電位固定し、ホールセルモードにてIPSCを記録した。灌流投与システムにより過酸化

水素を脊髄スライスに投与し、投与前後のIPSCの波形の振幅、減衰時間、頻度等を解析した。また、薬理的検討を行うために、様々な受容体のブロッカーを灌流投与システムにより過酸化水素と同時にスライスに投与し、過酸化水素がIPSCに与える効果に影響を及ぼすかどうかを検討した。

(2) 脊髄後角におけるIP3受容体の組織免疫染色学的検討

ウレタン麻酔マウスを4%パラホルムアルデヒドにて全身灌流して固定し、脊髄を摘出した。-80℃にて凍結した脊髄をクリオスタットにて20µmの水平ダンスライスを作製した。1:100に希釈したタイプ1IP3受容体に対する抗体(Calbiochem)を使用し、抗原抗体反応を行った。共焦点顕微鏡にて組織学的検討を行った。

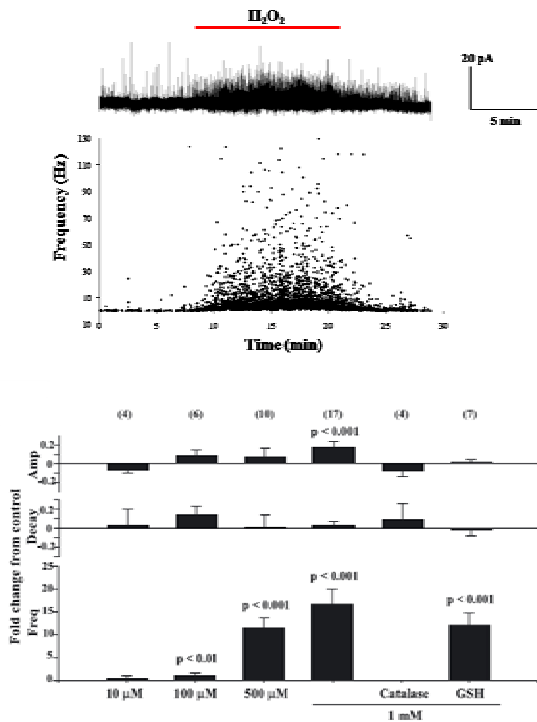
(3) タイプ1IP3受容体遺伝子部分欠損マウス(Opt)を用いた電気生理学的検討

ウレタン麻酔下にタイプ1IP3受容体遺伝子を部分欠損しているOptマウス(+/-)より脊髄を摘出し(1)と同様にパッチクランプ法にてSGニューロンのIPSCに対する過酸化水素の影響を検討した。

## 4. 研究成果

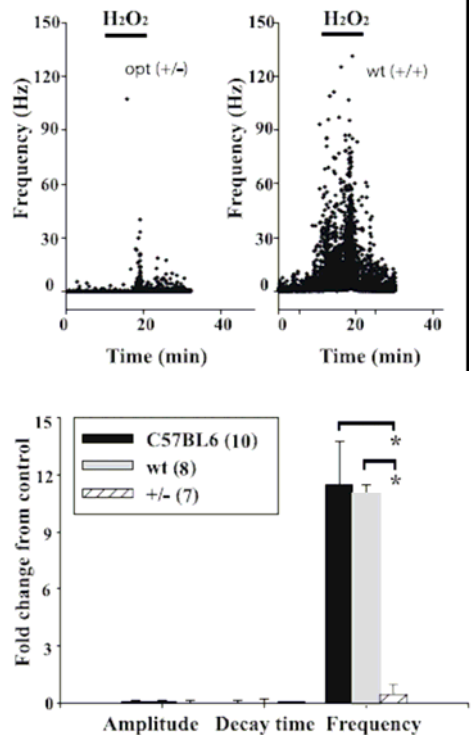
(1) 過酸化水素がSG細胞のIPSCに与える影響

灌流液に混合して急性投与した過酸化水素は、濃度依存性にまた、可逆性にSG細胞のGABA<sub>A</sub>受容体介在IPSCの頻度を増加させたが、電流の減衰時間には変化を与えなかった。また、活性酸素のスキャベンジャーであるカタラーゼの灌流投与により、過酸化水素の効果は完全に抑制された。しかし、膜透過性のないスキャベンジャーであるグルタチオンを細胞内液に投与しても過酸化水素の効果は抑制されないことから、過酸化水素の効果は前シナプス性であることが示唆された。過酸化水素による頻度増加のメカニズムを検討するために、シナプス前細胞のカルシウム貯蔵放出に關与する様々な受容体のブロッカーを用いた検討を行った結果、小胞体におけるカルシウム放出に關与するIP3受容体のブロッカー、2APBが、過酸化水素の効果を抑止することが明らかになった。つまり、過酸化水素によるIPSCの頻度増加メカニズムには、シナプス前細胞のIP3受容体を介するカルシウムの放出が關与することが示唆された。



(2) 免疫組織学手法によるSG細胞におけるIP3受容体の発現  
 脊髄でのIP3受容体のサブタイプについて免疫組織学手法を用い検討したところ、脊髄後角でタイプ1IP3受容体の存在を確認した。また、ニューロンマーカーやグリアマーカーとの2重染色法を用い共焦点顕微鏡で検討した結果、IP3受容体陽性組織は神経細胞の終末であると考えられた。

(3) Opt(+/-)マウスのSG細胞におけるIPSCに対する過酸化水素の影響  
 Optマウスのヘテロタイプおよびワイルドタイプマウスより作製した脊髄スライスを用い、急性投与した過酸化水素がSG細胞のシナプス電流に与える影響を電気生理学的に検討した結果、ワイルドタイプマウスのSG細胞では過酸化水素によりIPSCの頻度が増加するのに対し、Opt(+/-)マウスのSG細胞では、過酸化水素によるIPSCの頻度増加は消失することが明らかになった。Opt(+/-)マウスはタイプ1IP3受容体の蛋白発現量が減少していることが明らかになっていることから、過酸化水素による頻度増加のメカニズムはタイプ1IP3受容体を介することが明らかになった。



## 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)

眞下節、高橋亜矢子、最近の麻酔メカニズム仮説から考える全身麻酔、日本臨床麻酔学会誌、29、78-84、2009、無  
高橋亜矢子、眞下節、脊髄のGABA受容体と麻酔薬の作用メカニズム、医学の歩み、225、989-993、2008、無

〔学会発表〕(計5件)

高橋亜矢子、脊髄のGABAニューロンと麻酔薬の作用機序、第55回日本麻酔科学会、2008.6.13、パシフィコ横浜  
 高橋亜矢子、活性酸素がGABA性シナプス伝達に与える影響、第12回日本神経麻酔・集中治療研究会、2008.4.12、新潟コンベンションセンター  
 高橋亜矢子、過酸化水素が脊髄後角膠様質細胞の神経伝達に与える影響、生理学研究所研究会「筋・骨格系と内臓の痛み研究会」、2007.12.6、岡崎カンファレンスセンター  
 高橋亜矢子、過酸化水素はマウスの脊髄膠様質細胞においてGABA性mIPSCをIP3受容体介在性カルシウム放出を介して増加させる、第54回日本麻酔科学会学術集会、2007.6.1、札幌コンベンションセンター  
 高橋亜矢子、過酸化水素が脊髄後角膠様質細胞のGABA受容体介在性微小抑制性電流に及ぼす影響、第11回日本神経麻

酔・集中治療研究会、2007.4.21、秋田拠点センターアルヴェ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 亜矢子 (TAKAHASHI AYAKO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70444544

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：