

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：10107

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09365

研究課題名(和文) 妊娠が神経障害性疼痛を抑制する新しい機序の解明；GABAの動態に注目して

研究課題名(英文) Elucidated a new mechanism by which pregnancy suppresses neuropathic pain.
Focusing on GABA.

研究代表者

小野寺 美子 (Onodera, Yoshiko)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50516953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：妊娠による疼痛閾値上昇のメカニズムを解明するために脊髄でのGABA(Gamma-Amino Butyric Acid)に焦点を当て研究を進めた。妊娠の成立を安定させ、引き続きBennettの神経障害性疼痛(CCI)モデル作成を確立、von frey testにて妊娠ラットで分娩直前に疼痛閾値が上昇することを明確にした。脊髄後角でのGABAの動態を明らかにするため、妊娠-CCI、妊娠sham、非妊娠CCI、非妊娠shamの4群で免疫染色を試みて段階的に条件決定をしている。さらにGABAを産生するために必須であるGAD67やGAD65の定量をウエスタンブロットで行えるよう条件を模索している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

“痛み”は人体に危険を知らせるシグナルとして重要であるが、神経障害性疼痛はそのシグナルの異常発生により病的な痛みを発生し続けるという強い苦痛を伴う疾患である。これまでに使用されている鎮痛薬の神経障害性疼痛に対する効果は限られており、新しい鎮痛方法が求められている。分娩に伴い疼痛閾値が上昇するが、その機序に疼痛抑制系の代表であるGABAがどのように関わっているかを明らかにし臨床的な応用に近づけることを目標とした研究である。生体内での生理的な機序を解明し薬剤への応用に期待したい。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanism of pregnancy-induced pain threshold elevation, we focused on GABA (Gamma-Amino Butyric Acid) in the spinal cord. The rats are now able to establish stable pregnancies. We continued to establish Bennett's model of Chronic constriction injury (CCI) and demonstrated that the pain threshold is increased in pregnant rats just before parturition by von frey test.

To clarify the dynamics of GABA in the dorsal horn of the spinal cord, we attempted immunostaining in four groups: pregnancy-CCI model, pregnant sham model, non-pregnant CCI model, and non-pregnant sham model. We are in the process of determining the conditions step by step. In addition, we are seeking conditions for the quantification of GAD67 and GAD65, which are essential for the production of GABA, by Western blotting.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

日本では平均寿命は延長されているが、長寿生活の中で多くの国民が慢性疼痛を有しており、健康寿命を延ばすためには難治性の神経障害性疼痛への対応が社会的に求められている。

我々は、妊娠が痛み閾値を上昇させることに着目し、さまざまな痛みと同様に神経障害性疼痛も分娩直前に抑制されることを明らかにしてきた。またその機序に脊髄後角が大きく関わり、活性化したグリア細胞を抑制することが重要であることも示してきている。

また神経障害性疼痛の重要な症状の一つであるアロディニアの形成に活性化ミクログリアから分泌される脳由来神経栄養因子(BDNF)の重要性が明らかになっており、BDNFの影響でGABAがGABA受容体へ作用する際に触覚が痛覚として認識されてしまうといったことが起こることが明らかになっていた。そのため、これらをターゲットとして妊娠との関連を研究することにした。

2. 研究の目的

本研究ではこれまでの成果を発展させ、神経障害性疼痛時に脊髄で減弱されることが明らかである γ -アミノ酪酸(GABA)抑制系に着目し、妊娠が神経障害性疼痛を抑制するメカニズムの解明にむけて研究を行う。妊娠という生理的反応によっておこる変化が神経障害性疼痛を抑制するその機序を解明することで、より生理的な神経障害性疼痛減弱のための薬物治療が可能となると考えている。

妊娠・分娩の過程とGABAおよびGABA受容体の関連性を調査した研究はこれまで行われておらず、どのように作用しあっているかは不明である。

3. 研究の方法

(1) 妊娠ラットの作成、および妊娠した状態での神経障害性疼痛モデルの作成

これらはこれまでの研究から確立されており、臍粘液スメアを参考に交配し、成立3日後にBennettの絞扼性神経損傷モデル(CCIモデル)を作成する。

(2) 分娩直前のラットの脊髄でのGABAを免疫染色することで動態を検討する

(1)の方法にて作成したラットの妊娠21日目に還流固定を行い、第4,5腰神経が起始する脊髄を取り出し凍結標本とし免疫染色を行う。

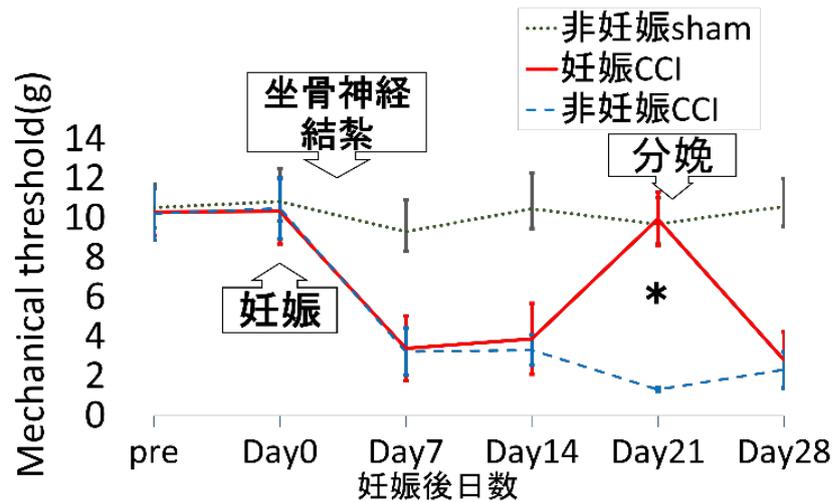
(3) 妊娠21日目のCCIラットの脊髄をフレッシュな状態で摘出しウエスタンブロットに

GAD67、GAD65についてShamラットと比較する。またアロディニアの形成に重要なかわりを持つBDNFについても同様にウエスタンブロットにてShamラットと比較を行う。

4. 研究成果

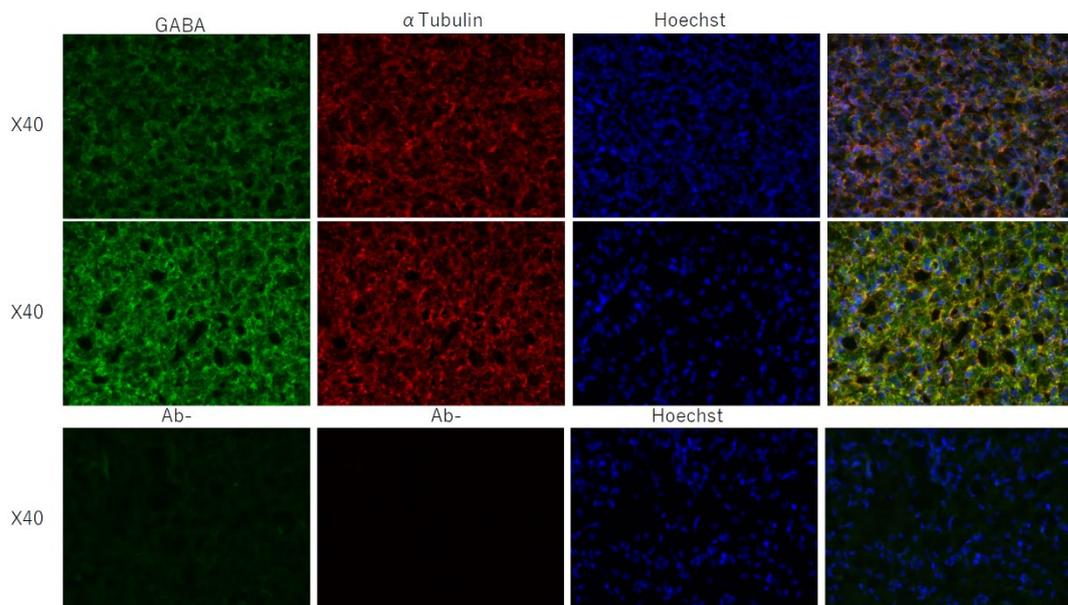
(1) 妊娠ラットの作成、CCIモデルについての評価

先行研究にて行動学的な検討はすでに終了している。CCIにて惹起された疼痛閾値の低下が、分娩直前に上昇することが分かっている(図1)。



< 図1 行動学的検討 >

(2) GABA を免疫染色にて同定するにあたって、Sham ラット脊髄にて還流固定からの染色を試みた。数度一次抗体を変更しながら染色条件を変更していった。予測されたような染色結果を得ることができなかつたので、一度ポジティブコントロールとして胎生 19 週の胎児ラットの脳の染色を試みた。妊娠 19 週のラットを麻酔薬の腹腔内投与にて深麻酔状態とし、腹腔内より胎児を取り出した。胎児の頭蓋骨は容易に剥離できるためそこから脳を取り出し、4%PFA で後固定を行った。その後凍結切片と比較のためのパラフィン切片を作成し、10 μ m の切片とした。ここで Sigma-Aldrich 社の抗 GABA 抗体を使用したが、400 倍の希釈でもネガティブコントロールと比較して染色ができたとは言い難く(図 2)、検体取り出しから複数回やり直し、条件を変更して行っているところである。



< 図2 胎生 19 週胎児の脳の凍結切片免疫染色 >

(3) ウェスタンブロット

(2)の検討と並行し検体採取は行っているが、(2)の条件設定がなかなか進まず、実際のウェスタンブロットの手技には至っていない。GAD67 や 65 については検討を進めているので(2)のめどがついたところでBDNF の検討に移る予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	神田 浩嗣 (Kanda Hirotsugu) (00550641)	旭川医科大学・医学部・准教授 (10107)	
研究分担者	神田 恵 (Kanda Megumi) (50516820)	旭川医科大学・医学部・講師 (10107)	

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