

令和 3 年 6 月 14 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：2019～2020

課題番号：19K24008

研究課題名(和文) 脊髄 X 層におけるノルアドレナリンの作用機序と慢性疼痛の病態解明

研究課題名(英文) Action of noradrenaline on lamina X of the spinal cord

研究代表者

大橋 宣子 (Ohashi, Nobuko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：70706712

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000 円

研究成果の概要(和文)：脊髄X層の機能はほとんど解明されていない。しかしX層には下行性抑制系のノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロンが投射しているため、X層が痛みの伝達に関与している可能性がある。本研究は炎症性疼痛モデルを用い、X層におけるNAの反応を脊髄スライス標本のX層から *in vitro* パッチクランプ記録を用い電気生理学実験により解析した。その結果、脊髄X層において、NAは抑制性ニューロンのシナプス前終末に存在する 1A 受容体を活性化することでNAの放出を促進する、および直接シナプス後膜に存在する 2受容体を活性化し膜の過分極を生じることで、炎症性疼痛に対し鎮痛効果を発揮している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでX層の機能について着目した報告は少ない。当然のことながら疼痛の発症機序を解明する上で重要であるNAについて、X層におけるNAの反応の変化をシナプスレベルで検討した報告はない。本研究により、NAは脊髄X層の抑制性ニューロンに作用することで、炎症性疼痛に対し鎮痛効果を発揮している可能性が示唆された。つまり、疼痛時のX層におけるNAの変化を検討した世界で最初の研究であるといえる。また本研究は *in vitro* 脊髄標本によるパッチクランプ記録を用いた。この手法が行える施設は世界的にも非常に数が少ない。よって、本研究の結果は非常に稀少であり意義が高いといえる。

研究成果の概要(英文)：Lamina X is localized in the spinal cord within the region surrounding the central canal. Noradrenaline (NA) is a neurotransmitter in descending pathways emanating from the brain stem and NA-containing fibers terminate in lamina X, suggesting that NA may modulate nociceptive synaptic transmission in lamina X. Using spinal cord slices of inflammatory pain model rats and *in vitro* whole-cell patch-clamps, we found that NA acts at presynaptic terminals of GABAergic and glycinergic interneurons on lamina X to facilitate inhibitory-transmitter release through 1A-receptor activation and directly induce inhibitory interneuron membrane hyperpolarization through 2-receptors activation. These mechanisms could be involved in the analgesia of NA on lamina X against inflammatory pain.

研究分野：疼痛

キーワード：脊髄X層 ノルアドレナリン パッチクランプ記録 疼痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛や炎症性疼痛に代表される慢性疼痛は長期間持続する難治性の疾患であり、傷害等に対する生体警告信号としての役割を持つ急性痛とは異なり、様々な原因疾患を背景とするため症状も複雑であり、その発生機序も未だほとんど解明されていない。そのためモルヒネや非ステロイド性抗炎症薬が著効しないことが多く、慢性疼痛患者は年々増加しており、慢性疼痛の機序解明と治療法の確立は極めて重要な課題である。

一般的に慢性疼痛の発症には末梢だけでなく脊髄の形態学的、機能的変化も関与すると考えられており、脊髄ニューロンを含む神経系の興奮性が亢進した状態、すなわち可塑性変化として認められる。脊髄は形態学的所見によりIからX層に分類され、末梢からの情報が各層に入力されるが、慢性疼痛時にはこれらの経路に脊髄レベルの可塑性変化が生じており、具体的にはI層の長期増強現象 (LTP)、I・II層の $\alpha\beta$ 線維の軸索発芽、V層の wind up 現象などがあり、それぞれが層特異的に慢性疼痛の発症に関与している。一方、X層は中心管周囲の灰白質として知られており、末梢から入力された情報はこのX層へも到達した後、上行し視床、大脳皮質にある体性感覚野へ至ることが知られている。特に下行性抑制系の経路の一つである青斑核由来のノルアドレナリン (NA) 作動性ニューロンは、II層とX層へ投射することが知られており、特にX層はNAが最も多く分布することが明らかになっている。さらに我々はこれまでに、X層におけるNAの作用を *in vitro* 脊髄スライス標本からのパッチクランプ法を用いた電気生理学実験により、NAがX層の抑制性シナプス伝達を有意に活性化させることを明らかにした。つまりX層はNAの放出を増加させ抑制性シナプス伝達を活性化することで、鎮痛効果をもたらしている可能性がある。しかしこれまでのX層の研究は生理的状态におけるNAの反応を検討したのみであり、慢性疼痛時のX層における変化をシナプスレベルで検討した報告はない。特にNAは、慢性疼痛の治療において重要であり、代表的治療薬である抗うつ薬はNAの再取り込みを抑制しNAを増加させることで鎮痛効果を発揮する。以上のことから我々は、これまで機能が明らかにされていなかったX層が、実は慢性疼痛の発症に大きく関与しているのではないかと考えた。

2. 研究の目的

X層ニューロンに対するNAの反応が、生理的状态から慢性疼痛発症までの過程でどのように変化するか、主に電気生理学実験により解析する。

3. 研究の方法

・脊髄後角の *in vitro* パッチクランプ記録

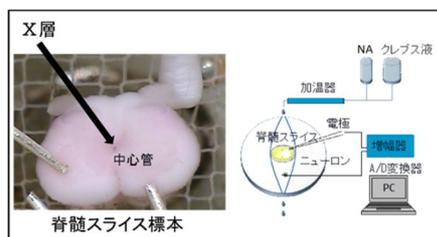
(1) 脊髄横断スライス標本の作製

ウレタン (1.2 ~ 1.5 g/kg, 腹腔内投与) 麻酔下に椎弓切除を行い、腰仙部脊髄を摘出する。その後、氷冷 Krebs 液中でマイクロスライサーを用い、L5 後根を付した厚さ約 650 μm の脊髄横断スライスを作成する。スライスを記録用チャンバーに移したのち、95%酸素、5%二酸化炭素の混合ガスで飽和された Krebs 液を 36 $^{\circ}\text{C}$ に加温して灌流する。

(2) パッチクランプ記録

脊髄後角第II層 (膠様質) 細胞 (SGニューロン) より、先端抵抗が約 10 M Ω のガラス電極を用いてホールセルパッチクランプ記録を行う。保持膜電位を -70 mV に固定した微小興奮性シナプス後電流 mEPSCs および 0 mV に固定した微小抑制性シナプス後電流 mIPSCs を記録し、NAの灌流投与に対する反応を検討する。

図 1: *in vitro* 脊髄標本からのパッチクランプ記録



(3) (2)で観察されたNAの反応が α 受容体、 β 受容体を介する反応か検討するため、それぞれのアンタゴニスト存在下に上記の実験を施行し、反応が拮抗されるか観察する。

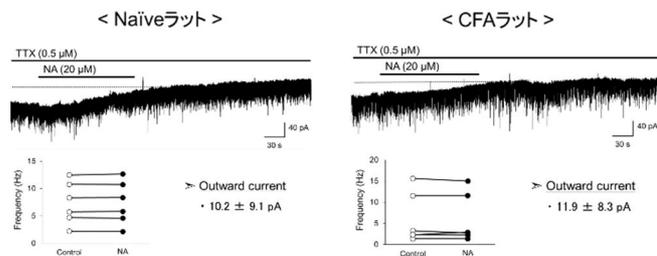
・慢性疼痛モデルラット

慢性疼痛モデルラットとして炎症性疼痛モデルラットを作製する。左足底に CFA (Complete Freund's adjuvant) を 100 μ l 注入し、炎症性疼痛モデルラットを作製し、実験を行う。

4. 研究成果

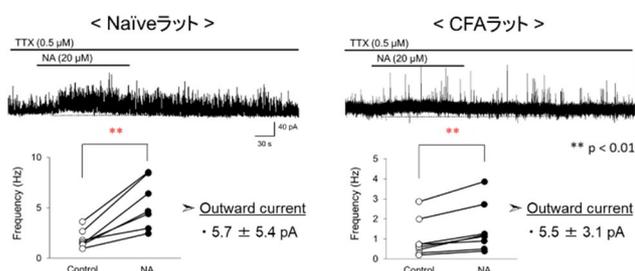
(1) NA は脊髄X層における mEPSCs の振幅、頻度に影響を与えなかった。このことから、NA は興奮性ニューロンのシナプス伝達には関与しないことが明らかになった。

図 2: in vitro パッチクランプ記録による mEPSCs



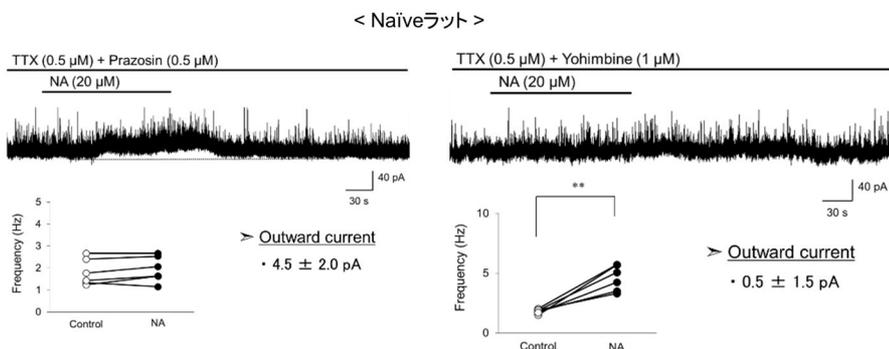
(2) NA は脊髄X層における mIPSCs の頻度を増加させ、outward current を発生させた。このことから、NA は脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末に作用し、GABA・グリシンといった抑制性神経伝達物質の放出を増加させる作用があること、また NA はシナプス後膜の過分極を発生させる作用があることが明らかになった。

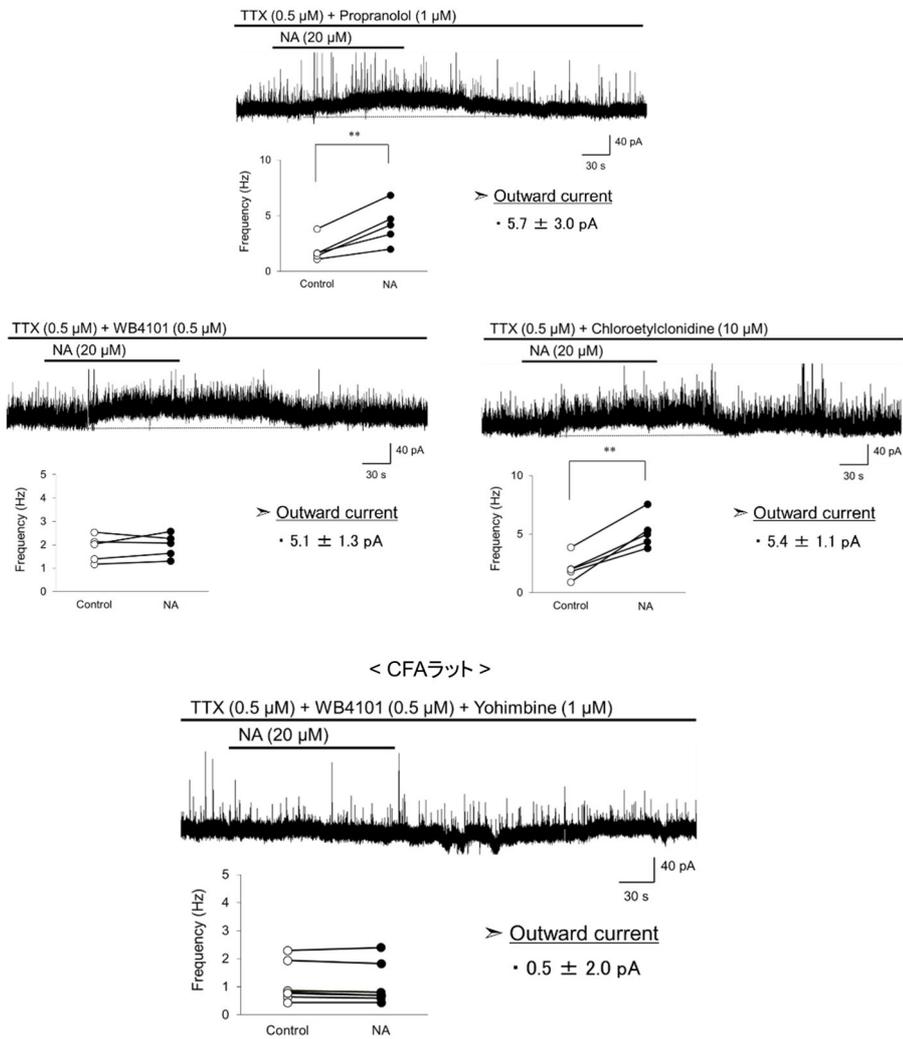
図 3: in vitro パッチクランプ記録による mIPSCs



(3) (2)で観察された NA の反応が α 受容体、 β 受容体を介する反応か検討するため、 α_1 受容体アンタゴニスト (Prazosin)、 α_1A 受容体アンタゴニスト (WB4101)、 $\alpha_1B, 1D$ 受容体アンタゴニスト (chloroethylclonidine)、 α_2 受容体アンタゴニスト (yohimbine)、 β 受容体アンタゴニスト (propranolol) 存在下に記録したところ、NA による mIPSCs の頻度増加作用は α_1 および α_1A 受容体アンタゴニストで拮抗された。また、NA による mIPSCs の outward current は α_2 受容体アンタゴニストで拮抗された。このことから、NA は脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末の α_1A 受容体に作用し、抑制性神経伝達物質の放出を増加させる作用があること、また NA はシナプス後膜の α_2 受容体に作用し過分極を発生させる作用があることが明らかになった。

図 4: α および β 受容体アンタゴニスト存在下の mIPSCs





これらの結果から、NA は炎症性疼痛モデルにおいても脊髄X層における抑制性ニューロンのシナプス前終末の α 1A 受容体に作用し抑制性神経伝達物質の放出を増加させる、およびシナプス後膜の α 2 受容体に作用し過分極を発生させることで鎮痛効果を発揮させる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 大橋宣子、大橋正幸、馬場洋 |
| 2. 発表標題 脊髄 層におけるノルアドレナリンの鎮痛機序 |
| 3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|