

機関番号：34438  
研究種目：基盤研究 (C)  
研究期間：平成 20 年度～22 年度  
課題番号：20591845  
研究課題名 (和文) 脊髄後角ニューロンの可塑性と神経因性疼痛：パッチクランプ法による解析  
研究課題名 (英文) Plasticity and in Spinal Dorsal Horn Neuron and Neuropathic Pain: An Analysis by Patch Clamp Recordings  
研究代表者 榎葉均 (Kashiba Hitoshi)  
関西医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：10185754

研究成果の概要 (和文)：脊髄後角の深層ニューロンにおける神経科学的研究は、表層ニューロンにおけるそれと比較すると遅れていると言わざるを得ない。これまで我々は、多くの深層ニューロンが侵害受容ニューロンに含まれるサブスタンス P や CGRP、ソマトスタチンにตอบสนองすることを示してきた。そこで本実験では、侵害受容ニューロンの多くに含まれるサブスタンス P (SP) と、脊髄後角において侵害性の情報を修飾すると考えられているエンケファリン (Enk) に対する脊髄後角深層ニューロンの膜電流変化についてラット脊髄新鮮スライスを用いたパッチクランプ法により検討した。脊髄後角の深層ニューロンにおいて、自発性の EPSC (興奮性シナプス後電流) や IPSC (抑制性シナプス後電流) が観察され、それらはグルタミン酸受容体の拮抗薬 (CNQX と AP5) や、GABA<sub>A</sub> 受容体及びグリシン受容体の拮抗薬 (それぞれ bicuculline と strychnine) を投与することで消失した。これらの結果、後角深層における速いシナプス伝達はグルタミン酸 (興奮性) と GABA・グリシン (抑制性) で行われていると考えられる。後角深層における約半数のニューロンは、Enk (1-5  $\mu$ M) と SP (1  $\mu$ M) の投与に対してそれぞれ slow outward currents (緩やかな外向き電流) と slow inward currents (緩やかな内向き電流) を示した。これらの応答は、Na チャネルの遮断薬であるテトロドトキシンや CNQX/AP5/bicuculline/strychnine 存在下においても観察された。これらのことは、投与した Enk や SP が、直接記録しているニューロンに作用したことを意味する。Enk に応答するニューロンの多くは (4/5 cell) は DAMGO ( $\mu$ 受容体の agonist) と DADLE ( $\delta$ 受容体の agonist) の両方に感受性を示し、ダイノルフィン ( $\kappa$ 受容体の ligand) に感受性を示すものは少なかった (3/15 cell)。今回、記録した脊髄深層ニューロン (n=30) のうち、半数のニューロンは Enk と SP の両者に応答し (n=15)、Enk だけに反応をするニューロン (n=1) や SP にのみ反応するニューロン (n=3) はわずかで、残りのニューロン (n=11) はいずれにも応答しなかった。これらの結果、脊髄深層ニューロンは SP と Enk の両者に感受性を示すニューロンとそうでないニューロンに大別することができ、前者は侵害情報の入力を受けながらエンケファリンにより抑制性に修飾される可能性を示唆している。

研究成果の概要 (英文)：The actions of neurotransmitters and modulators have well been investigated in superficial spinal dorsal horn neurons, but little is known about those in deep dorsal horn neurons. Our previous studies suggested that SP, CGRP and

somatostatin play important roles in synaptic transmission to deep dorsal horn neurons. In this study, responses of SP and mENK to deep dorsal horn neurons were examined by the blind patch clamp technique used freshly sliced spinal cord of the rat (3-4weeks). About 60% of deep dorsal horn neurons in the deep lamina (III-V) showed the slow inward currents more than 5 pA by the bath application of SP (1  $\mu$ M) for 1 min. These currents are considered to be evoked through G protein-Coupled SP receptors on the patched cells. Some of the recorded neurons enhanced the number and the peak amplitude of spontaneous EPSCs and/or IPSCs by the application SP. On the other hand, about 60% of the deep dorsal horn neurons showed the slow outward currents more than 5 pA by the bath application of mENK (5  $\mu$ M), DAMGO ( $\mu$ -receptor agonist, 1  $\mu$ M), or DADLE (delta-receptor agonist; 1  $\mu$ M) for 1 min. These currents are also considered to be evoked through G protein-coupled  $\mu$ /delta-receptors on the patched cells. The responsive neurons to mENK always displayed the outward current by DAMGO, DADLE, or both. The amplitude of outward current was not suppressed by the repetitive application of mENK. Most of deep dorsal horn neurons with the slow inward currents by SP showed the slow outward currents by enkephalin, DAMGO, or DADLE, and vice versa. The present study suggests that about 60% of deep dorsal horn neurons receive both excitatory inputs through the NK1 receptors and inhibitory inputs through the  $\mu$ -/delta-receptors.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
平成 21 年度	500,000	150,000	650,000
平成 22 年度	500,000	150,000	650,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総 計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：疼痛管理学・神経因性疼痛・可塑性・脊髄後角ニューロン

#### 1. 研究開始当初の背景

痛みは他人と共有できない特別な性質を持つ感覚である。この痛みをその原因をもとに大別すると、侵害受容性疼痛と神経因性疼痛に分類できる。侵害受容性疼痛は、組織を傷害するかその可能性を持った侵害

刺激によって生じる。一方、神経因性疼痛は神経系の異常による痛みで、組織の傷害や侵害刺激に関係なく神経系の異常による痛みである。これらの痛みの他に、ストレスなどの精神的な原因や身体的に異常が認められない心因性の痛みなどがある<sup>(22)</sup>。

侵害受容性疼痛は、生体に侵害刺激が加わると末梢の侵害受容器が興奮し、この信号が一次感覚ニューロンから脊髄後角や三叉神経脊髄路核の二次感覚ニューロンを介して上位中枢へと伝達される。脊髄後角における上位中枢への投射ニューロンについては大きく二つに分けられる。一つは同側の体表に限局した末梢受容野を持ち、侵害刺激にのみ興奮する特異的侵害受容ニューロン(NSニューロン; nociceptive specific neuron)である。もう一つはNSニューロンより広い受容野を持ち触刺激から侵害刺激まで様々な刺激に段階的に反応する広作動域ニューロン(WDRニューロン; wide dynamic range neuron)である<sup>(22)</sup>。脊髄後角はその細胞構築の違いによりI層からVI層に分類されており、概括的にI層からII層を表層、III層からVI層を深層と呼んでいる。I層にはNSニューロンが、II層には介在ニューロンである islet 細胞と stalked 細胞が存在すると言われてきた。最近ではさらに詳しく分類されている<sup>(6, 12)</sup>。脊髄後角表層ではこれらのニューロンが侵害性の情報処理に関わっている。脊髄後角深層の主にV層にはWDRニューロンが分布し、侵害性の情報に加え非侵害性の情報処理を行っている。しかしながら、モダリティの異なる幾種類もの感覚信号をどのような仕組みで情報処理し上位中枢に伝えているのか、どのようなタイプのニューロンがどのような役割分担を担っているのかなど、脊髄後角表層に比べ不明な部分が多い。このように疼痛受容システムの研究が進められる中で、疼痛抑制システムもまた存在することが次第に明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

19世紀初頭、古代より人類と深く関わってきたアヘンの主成分が単離され、ギリシャ神話に出てくる「夢と眠りの神、モルフェス」にちなんで「モルヒネ(モルフィン)」と命名された。1973年にはモルヒネ受容体が発見され<sup>(19, 20)</sup>、1975年には二種のエンケファリン(mEnk と lEnk; methionine-enkephalin と leucine-enkephalin)が見出された<sup>(8)</sup>。その後、多くのオピオイドペプチドが今日までに見つかっている。Jessell と Iversen は、1977年、侵害刺激に応答し、侵害受容ニューロンからのサブスタンス P (SP; substance P)の放出を Enk が抑制すると報告している<sup>(10)</sup>。また、Allan Basbaum と Howard Fields が、1979年、脳幹より始まり脊髄後角(もしくは三叉神経脊髄路核)に終末する下行性疼痛抑制系の存在を示唆した<sup>(3)</sup>。その一つは中脳中心灰白質(PAG; periaqueductal central gray matter)から延髄大縫線核(NRM; nucleus reticularis magnus)を経て脊髄に下行するセロトニン(5-HT; 5-hydroxy tryptamine)系であり、もう一つは、橋の外側被蓋 A7 のノルアドレナリン作動性ニューロンが後外側索を下行し脊髄後角に至るノルアドレナリン系である<sup>(22, 23)</sup>。しかしながら、後角の深層ニューロンに対して、Enk や 5-HT、ノルアドレナリンがどのように作用するのかはほとんど知られていない。

そこで今回の実験では、ラット脊髄新鮮スライスを用いながらパッチクランプ法により脊髄後角深層ニューロンの SP、mEnk、5-HT、ノルアドレナリン等に対する膜電流変化を記録・解析し、脊髄後角の疼痛処理システムについて検討する。これらのことを明らかにすることは、ハリ治療やペインクリニックの発展に寄与するものと確信し

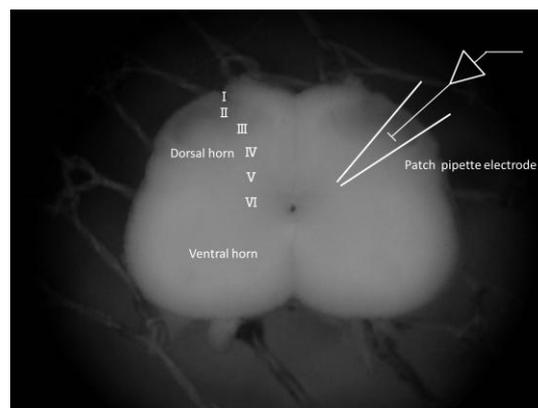
ている。

### 3. 研究の方法

本実験は関西医療大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

#### I 新鮮脊髄スライス標本の作製

本実験には3～4週令の Sprague-Dawley (SD)系雄性ラット(n=88)を使用した。新鮮脊髄スライス標本の作製、及びブラインドパッチクランプ法については中塚らの方法に準じた<sup>(18)</sup>。ウレタン(0.4~0.8 g/kg)をラットの腹腔内に投与し深麻酔を施し、椎弓を切除したのち脊髄を取り出した。取り出した脊髄は直ちに酸素95%二酸化炭素5%で飽和した高濃度スクロース人工脳脊髄液(in mM; 223 sucrose、25 NaHCO<sub>3</sub>、1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3.6 KCl、2 CaCl<sub>2</sub>、1 MgCl<sub>2</sub>、0.4 ascorbic acid、2 pyruvate、11 D-glucose、pH,7.2)<sup>(1)</sup>を満たしたシャーレに移し、実態顕微鏡下にて脊髄神経根を取り除き、さらに硬膜、クモ膜、軟膜を除去した。この脊髄をV字にカットした寒天ブロックに乗せマイクロスライサー(DOSAKA EMI 社製 DTK-1000)で厚さ650 μmの脊髄横断新鮮スライスを作製した<sup>(18)</sup>。そのスライスを透明アクリル製の記録用チャンバーに移しプラチナ製のアンカーで固定し、人工脳脊髄液((in mM)117 NaCl、3.6 KCl、1.2 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、2.5 CaCl<sub>2</sub>、1.2 MgCL<sub>2</sub>、25 NaHCO<sub>3</sub>、11 glucose、pH,7.2)<sup>(18)</sup>を1分間に5~10 mlの速さで還流した。



**Fig.1** A photograph showing a 650-μm-thick transverse slice which was freshly prepared from rat lumbar spinal cord. Whole cell recordings were obtained from single neuron in deep dorsal horn (lamina III-VI) using the blind patch clamp technique

#### II ブラインド・パッチクランプ法

チャンバー内に固定されたスライスに下から透過光をあて実態顕微鏡で見ると背側の表層部に比較的明るいII層の膠様質が観察される(Fig 1)。このII層の下辺から腹側にかけて、後索路の谷底レベルまでの後角深層部に記録電極を刺入し、モニターで電極抵抗を確認しながらコンピューターを用いてゆっくりと電極を進めた。電極抵抗が十分に上昇すると電極内の陽圧を解除し、電極先端部を細胞膜に吸着させ、ギガシールを完成させた。その後、さらに電極内圧を下げて細胞膜を破り、ホールセルレコーディングを開始した。記録電極は電気抵抗6~12 MΩの微小ガラス電極を使用し、電極内液の組成は(in mM)135 potassium gluconate、5 KCl、0.5 CaCl<sub>2</sub>、2 MgCl<sub>2</sub>、5 EGTA、5 HEPES、pH,7.2であった<sup>(18)</sup>。

ニューロンの電気信号はパッチクランプ用アンプ(Axopatch 200B, Axon Instruments, USA)で取得した。これらのデータはA/Dコンバーター(Digidata 1200,

Axo Instruments, UAS)でデジタル変換され、pCLAMP 9 (pCLAMP acquisition program, version 9, Axon Instruments, UAS)を用いながらパーソナルコンピューター(Net Vist, IBM, USA)に取り込み解析した。興奮性シナプス後電流(excitatory postsynaptic current; EPSC)や抑制性シナプス後電流(inhibitory postsynaptic current)の周波数解析には、Mini Analysis Program(Synaptosft, Inc., USA)を用いた。

実験に使用した試薬は、SP、mEnk、DAMGO(Ala(2)-MePhe(4)-Gly-ol(5)-enkephalin)、DADLE(leucine-2-alanine enkephalin)、dynorphin(ペプチド研、Japan)、adrenaline、CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione)、AP5(D(-)-2-amino-5-phosphonopentanoic acid)、bicuculline、strychnine、naloxone (Sigma社、Japan)、serotonine (5-hydroxy tryptamine)、adrenaline (和光純薬、Japan)、tetrodotoxin (和光純薬、Japan)を用いた。これらの試薬は、人工脳脊髄液に溶解し、記録チャンバー内のバスに還流投与(bath application)した。SPの効果を観察する時は膜電位を-70 mVに、オピオイドペプチド、5-HT、アドレナリンの効果を観察する時は-50 mVにそれぞれ膜電位を固定した。複数の作動薬や拮抗薬を同一のニューロンに作用させる場合は、最低7分間の間隔を空けてから投与した。SPを投与する場合は、そのニューロンに対する作用が強いことから最後に投与することとした。このうち幾つかの作動薬を投与すると、しばしば膜電流変化が観察されるが、5 pA以上の緩やかな外向き電流(slow outward current)や緩やかな内向き電流(slow inward current)が観察された時に陽性であると判断した。

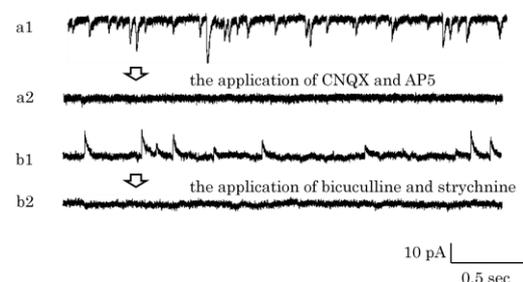
#### 4. 研究成果

##### I 結果

今回の実験では81個のニューロンからブラインド・パッチ・クランプ法により膜電流を記録することができた。記録はスライス標本を作製してから8時間にわたって行うことが可能で、一つのニューロンから最長90分にわたる安定した記録を得ることができた。記録した深層ニューロンは-50~-70 mVの静止電位を有していた。

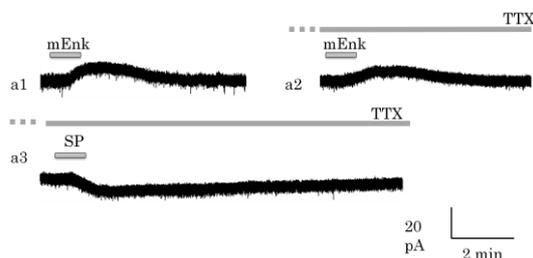
##### I-1 脊髄後角深層ニューロンにおけるEPSCとIPSC

-70 mVで膜電位を固定した時、自発性の速い興奮性シナプス後電流(spontaneous EPSC; sEPSC)が記録された(Fig. 2-a1)。振幅は10 pA~100 pAで頻度は0.2 Hz~10 Hzであった。これらのニューロンにグルタミン酸のAMPA(alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid)受容体の拮抗薬CNQX (6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione) (10 μM)とNMDA(N-methyl-D-aspartic acid)受容体の拮抗薬APV (25 μM)を投与するとsEPSCは消失した(n=6)(Fig. 2-a2)。



**Fig. 2.** The sEPSCs and sIPSCs recorded in deep dorsal horn neurons and the effects of CNQX/AP5 and bicuculline/strychnine on

these currents. The sEPSCs (a1 > a2) and sIPSCs (b1 > b2) were blocked by these antagonists. a1 and a2; holding potential (VH)=-70 mV, . b1 and b2; VH=-50 mV.



**Fig. 3** The slow outward current evoked by mEnk in a deep dorsal horn neuron, and the effects of Enk and SP on membrane currents in the presence of TTX. The slow outward and inward currents by Enk (3 μM) and SP (1 μM) were observed in the presence of TTX (1 μM). a1 and a2; VH=-70 mV, . b1 and b2; VH=-50 mV.

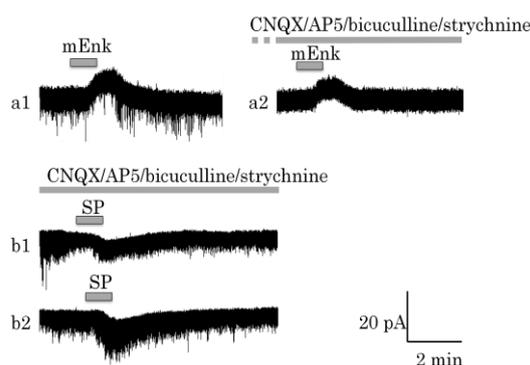
また、膜電位を-50 mV で固定した時、自発性の速い抑制性シナプス後電流 (spontaneous IPSC; sIPSC)もまた記録された(Fig.2-b1)。振幅は 10 pA~50 pA で、頻度は 0.2 Hz~5 Hz であった。これらの sIPSCは、GABA-A (gamma-aminobutyric acid-A)受容体の拮抗薬である bicuculline (10 μM) とグリシン受容体の拮抗薬 strychnine (1 μM)を投与することで、完全に消失した (Fig. 2-b2) (n=4)。

#### I-2 SP 及びmEnk の深層ニューロンに対する作用

次に、深層ニューロンの膜電流に対する SP と mEnk の効果について検討した。膜電位-70 mV に固定し SP (1 μM for 1 min)を投与すると slow inward current

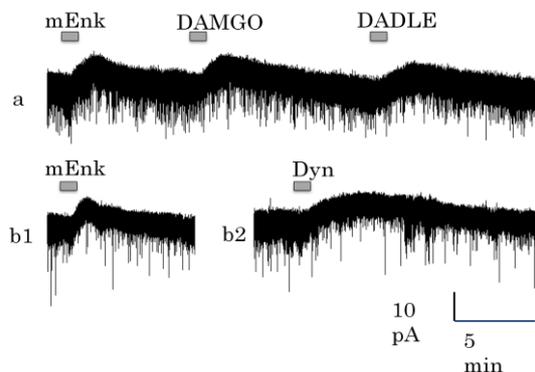
が記録できた。その振幅は  $14.5 \pm 1.2$  pA、(mean ± SE、n=43)であった(Fig. 4-b2, 6-a2, 7-a3)。これらの SP による slow inward current は TTX (1 μM)存在下においても、SP 単独投与時と同様に記録できた(n=4) (Fig. 3-a3)。さらに、CNQX (10 μM)、APV (25 μM)、bicuculline (10 μM)、strychnine (1 μM)存在下においても slow inward current は記録でき(n=4) (Fig. 4-b1)、wash out 後にもまた同様に記録された(Fig. 4-b2)。

一方、深層ニューロンに mEnk (1~5 μM for 1 min)を投与すると slow outward current が記録できた(Fig. 3-a1, 4-a1, 5-a, b1, 6-a1) (16/30 cells)。mEnk, 1 μM 投与における slow outward current の振幅は  $12.1 \pm 2.0$  pA (mean+SE、n=10)であった。また、1 μM 投与では応答しなかったが mEnk, 5 μM 投与で slow outward current を示したものの振幅は  $8.6 \pm 0.9$  pA(mean+SE、n=6)であった。mEnk, 10 μM 投与で slow outward current を示したニューロンは全て、5 μM 投与においても slow outward current を示した。



**Fig. 4** The slow outward and inward currents evoked by Enk and SP in deep dorsal horn neurons, respectively, and the effects of Enk (3 μM) and SP (1 μM) on the membrane currents in the presence of CNQX, AP5,

bicuculline and strychnine. a1 and a2; VH=-50 mV, . b1 and b2; VH=-70 mV.



**Fig. 5** The membrane currents evoked by Enk (1  $\mu$ M), DAMGO ( $\mu$ -agonist, 1  $\mu$ M), DADLE ( $\delta$ -agonist, 1  $\mu$ M), and dynorphin (Dyn, 1  $\mu$ M) in deep dorsal horn neurons. Most of Enk-responsive neurons (4/5 cells) have the sensitivity for both  $\mu$ - and  $\delta$ -agonists (a). Although Dyn-responsive neurons were rare (3/15 cells), all of these neurons (3/3 cells) were sensitive to Enk (b1, b2). a, b1 and b2; VH=-50 mV.

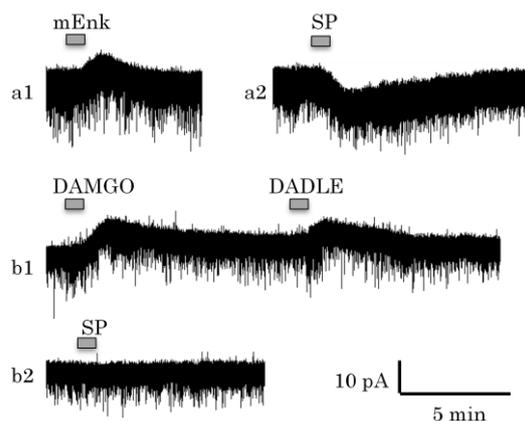
mEnkにより slow outward current を示した深層ニューロンに、ナトリウムチャネルの遮断薬であるテトロドキシン (tetrodotoxin; TTX, 1  $\mu$ M)を還流投与すると sEPSC や sIPSC が徐々に減少し、ほとんど消失したところで更に mEnk(3  $\mu$ M)を同時投与すると、mEnk の単独投与時と同様の slow outward current が記録された (n=4) (Fig. 3-a2)。

また、mEnk (3  $\mu$ M)による slow outward current を示した深層ニューロンにグルタミン酸受容体や GABA-A・グリシン受容体の拮抗薬である CNQX (10  $\mu$ M)、APV (25  $\mu$ M)、bicuculline (10  $\mu$ M)、strychnine (1

$\mu$ M)を同時に還流投与すると、sEPSC や sIPSC が徐々に減少し、ほとんど消失したところで、更に mENK(3  $\mu$ M)を同時投与すると、mEnk の単独投与時と同様の slow outward current が記録された(n=3) (Fig. 4-a2)。

mEnk はオピオイド受容体のうち、 $\mu$ および $\delta$ 受容体に親和性を示すことが知られている<sup>(25)</sup>。後角深層において mEnk に応答するニューロンに対する DAMGO( $\mu$ 受容体作動薬、1  $\mu$ M)、DADLE( $\delta$ 受容体作動薬、1  $\mu$ M)、ダイノルフィン(dynorphin; Dyn 5  $\mu$ M) ( $\kappa$ 受容体作動薬)の感受性をそれぞれ調べた。深層ニューロンの多くは DAMGO 及び DADLE の両者に応答を示した(n=4/5 cells)(Fig. 5)。残りのニューロン(n=1/5)は DADLE のみに応答した。脊髄後角深層で Dyn に応答するニューロンは少なかったが(3/15 cells)、これらの全てのニューロン(3/3 cells)は Enk に感受性を示した(Fig. 5-b1,b2)。

脊髄後角深層のニューロンに対し mEnk および SP の感受性について調べた。記録した 30 cells のうち、16 cells が mEnk に応答し、18 cells が SP に応答した。mEnk に応答するニューロンの大部分は SP にも応答した(15/16 cells)。SP に応答するニューロンの多くもまた Enk に応答を示した (n=15/18 cells) (Fig. 6-a1,a2)。DAMGO (1  $\mu$ M)と DADLE (1  $\mu$ M)に感受性を示したが SP に応答しなかった深層ニューロンは非常に少なかった (1/16 cells) (Fig. 6-b1, b2)。mEnk と SP の両方に応答しなかった深層ニューロンは 30 cells 中 11 cells であった。

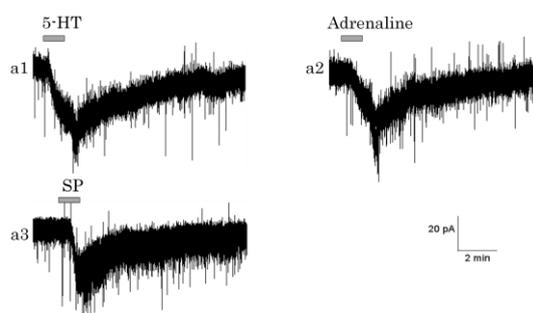


**Fig. 6** The membrane currents evoked by Enk, DAMGO, DADLE and SP in deep dorsal horn neurons. Slow outward and inward currents were observed by Enk (5  $\mu$ M) and SP (1  $\mu$ M), in one neuron (a). Thus, a half of neurons observed were response to Enk and SP. Although the outward currents were observed by DAMGO (1  $\mu$ M) and DADLE (1  $\mu$ M) in another neuron (b1), the inward current was not shown by SP (1  $\mu$ M) (b2). Such neurons were rare. a1, a2 and b1; VH=-50 mV, . b2; VH=-70 mV.

### I-3 5-HT、アドレナリン及び SP の深層ニューロンに対する作用

次に、下行性抑制系において重要な役割を果たしていると考えられている二つの伝達物質、5-HT とノルアドレナリン、及び SP の深層ニューロンに対する感受性について調べた。今回の実験では、ノルアドレナリン受容体の作動薬としてアドレナリンを用いた。深層ニューロンに 5-HT (3  $\mu$ M for 1 min)を投与すると、37%のニューロン(13/35 cells)が slow inward current (14.9 $\pm$ 2.9 pA, n=13)示したが(Fig. 7-a1)、slow outward current (9.1 pA, n=1) を示したニューロンはわずか 1 cell であった(1/35 cells)。一方、深層ニューロンにアド

レナリン(3  $\mu$ M for 1 min)を投与すると、20%のニューロン(7/35 cells)が slow inward current (13.4 $\pm$ 3.4 pA, n=7)示したが、slow outward current (9.1 $\pm$ 1.0 pA, n=2)を示したニューロンもまたわずか 2 cells であった(2/35 cells)(Fig. 7-a2)。5-HT およびアドレナリンに応答するニューロンは、すべて SP に対して slow inward current を示した(Fig. 7-a3)。



**Fig. 7** The membrane currents evoked by 5-HT, adrenaline, and SP in a deep dorsal horn neuron. This neuron showed slow inward currents by the application of 5-HT (3  $\mu$ M), adrenaline (3  $\mu$ M) and SP (1  $\mu$ M), respectively. a1 and a2; VH=-50 mV, . a3; VH=-50 mV.

## II 考察

脊髄後角は、一次感覚ニューロンや脳幹からの下行性ニューロンの入力を受け、さまざまな情報処理をしながら上位中枢や脊髄内に電気信号を出力している。後角表層における速いシナプス伝達は、興奮性の伝達物質であるグルタミン酸、及び抑制性の伝達物質である GABA とグリシンにより行われていることが報告されている<sup>(24)</sup>。今回の実験で、深層ニューロンで記録された sEPSC は AMPA 受容体と NMDA 受容体の拮抗薬である CNQX と APV で、また、

sIPSC は GABA-A 受容体とグリシン受容体の拮抗薬である bicuculline と strychnine で消失することが分かった。これらの結果は、脊髄後角深層においてもグルタミン酸、GABA とグリシンが速いシナプス伝達に関与していることを示唆する。さらに、これらの速いシナプス伝達は、SP を代表とする神経ペプチドなどのモジュレーターにより修飾される。

SP は脊髄後角において、痛みの伝達に重要な役割を果たしていることは広く知られているが、SP 含有ニューロンは中枢神経系にも広く分布する。脊髄後角表層に密に分布する SP 含有の神経終末の起源については、一次感覚ニューロン、脳幹からの下行性ニューロン、脊髄内の介在ニューロンなどが考えられる。後角表層の SP 免疫陽性構造は、後根切断(dorsal rhizotomy)<sup>(7)</sup> や新生仔ラットにおけるカプサイシン投与により激減する<sup>(9)</sup> ことから、一次感覚ニューロンを起源とするものが大部分であると考えられる。SP の受容体である NK1 受容体(neurokinin-1 receptor)は、脊髄後角の I 層および深層のニューロンに発現している (SP 含有神経終末が密に分布する substantia gelatinosa のニューロンには発現していない<sup>(14)</sup>。これらのニューロンに発現している NK1 受容体は、末梢組織への持続的な侵害刺激により internalization を誘発する<sup>(14)</sup> ことから、SP 含有の一次感覚ニューロンと I 層および深層ニューロンが後角表層においてシナプス連絡していることが示唆される。

今回の実験で、約 60%の深層ニューロンが SP に対して slow inward current を示した。この膜電流は TTX 存在下や CNQX/APV/bicucullin/strychnine 存在下においても観察されることから、記録して

いる深層ニューロンに発現している NK1 受容体に、bath application した SP が直接、記録しているニューロンに作用したことを示す。7 回膜貫通型である NK1 受容体は、Gq 蛋白と Gs 蛋白を介する二つの系が関与しているらしい。前者は活性化されたホスホリパーゼ C (PLC) がホスファチジルイノシトール 2 リン酸 (PIP2) をイノシトール 3 リン酸 (IP3) とジアセチルグリセロール (DG) に分解し、これらのセカンドメッセンジャーが Ca チャネルをオープンし、Ca イオンの流入を招くらしい<sup>(13)</sup>。後者は、活性化されたアデニル酸シクラーゼ (adenylate cyclase) がサイクリック AMP (cAMP) を産生し、これが G タンパク供役型内向き整流性 K チャネル(G protein-coupled inward rectifying potassium channel; GIRK)<sup>(11, 15)</sup> を閉鎖することにより slow inward current を誘導し、細胞膜を興奮させるらしい。

Enk を含有するニューロンは脊髄後角の表層に加え深層にも広く分布していることが in situ ハイブリダイゼーションを用いた実験結果から分かってきた<sup>(9)</sup>。Enk を産生するニューロンの多くは GABA/グリシン作動性であると言われている<sup>(25)</sup>。Enk は、SP とは対照的に後根神経節細胞ではほとんど産生されない。今回の実験においてオピオイドペプチドの一つである mEnk は、約 50%の深層ニューロンに slow outward current を誘導した。この膜電流変化もまた TTX 存在下や CNQX/APV/bicucullin/strychnine 存在下において観察されたことから、mEnk が直接、深層ニューロンに作用したことを示す。オピオイドペプチドの受容体は  $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$  受容体に分類される(最近、opioid receptor から  $\sigma$  受容体が除外され、ノシセプチン受容体が

含まれるようになった)。これらの受容体は、GIRK<sup>(11, 15)</sup>をオープンさせることで膜電位を過分極に導くことが知られている。さらに、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体のそれぞれ作動薬である DAMGO、DADLE、Dyn を用いて実験を進めると、mEnk に応答するニューロンの多くは $\mu$ および $\delta$ 受容体を有していることが分かった。また、Dyn に応答するニューロンは少なかったが、これらのニューロンの全ては mEnk に応答した。つまり、脊髄後角深層において、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\kappa$ 受容体をそれぞれ単独に発現しているニューロンは少なく、 $\mu/\delta$ 受容体もしくは $\mu/\delta/\kappa$ 受容体を共発現しているニューロンが多いようである。また、正常時において Dyn を産生する後角ニューロンは少ないが、末梢受容野に炎症が生ずると Dyn を産生するニューロンは増加するらしい<sup>(9)</sup>。Dyn- $\kappa$ 受容体作動システムは、炎症等の病態時に重要な役割を果たすのかもしれない。

深層ニューロンにおける mEnk と SP の感受性を検討すると、SP に slow inward current を示すニューロンの多くは、 $\mu/\delta$ 受容体作動薬に対して slow outward current を示し、逆に、SP に反応しないニューロンのほとんどは $\mu/\delta$ 受容体作動薬にも応答しなかった。これらの結果は、末梢からの侵害情報を受け取る後角深層ニューロンは、同時に後角内に位置する Enk 含有ニューロンからも抑制性の信号を受けとっていると考えられる。逆に、SP 作動性ニューロンの入力を受けないものは Enk 作動性ニューロンの入力も受けないことを意味する。脊髄後角において、GABA/Enk 作動性ニューロンの入力を受ける SP/Enk 感受性ニューロン(NK1 受容体と $\mu$ 受容体を共発現している)は興奮性ニューロンであると Gong らは主張している<sup>(6)</sup>。また、Schneider ら

は、ハムスターを用いた電気生理学的実験で、次のような興味深い結果を報告している。後角深層ニューロンにおいて、皮膚での high threshold mechanical 刺激にのみに応答するニューロンは少なく、low threshold mechanical 刺激に対応するニューロンと wide dynamic range ニューロンは同程度に存在するらしい<sup>(16)</sup>。今回の実験結果と対比させると、SP/Enk 感受性ニューロンは high threshold mechanical および wide dynamic range、SP/Enk 非感受性ニューロンは low threshold mechanical に対応しているのではないかと推察される。また、脊髄視床路(ラットでは parabrachial area への投射が多い)を構成する投射ニューロンは NK1 受容体を発現していることから、SP に slow inward current を示すニューロン(この大部分が Enk 感受性を示す)の一部が投射ニューロンであると考えられる<sup>(21)</sup>。

脊髄後角の表層は、脳幹からの 5-HT 作動性およびノルアドレナリン作動性ニューロンからの入力を受けることが知られている<sup>(4, 23)</sup>。両者はそれぞれ興奮性と抑制性の調節作用を有するが、主にグルタミン酸作動性ニューロンを抑制し、GABA/グリシン作動性ニューロンを興奮させているらしい<sup>(23)</sup>。今回の実験において深層ニューロンの 5-HT とアドレナリンに対する膜電流変化を検討したところ、両者とも興奮性の作用(slow inward current)を示すものが多く、抑制性に作用(slow inward current)するものは少なかった。これらの膜電流変化もまた直接記録しているニューロンに、5-HT とアドレナリンが作用したものと考えられる。また、両者に応答するニューロンもまた、SP に slow inward current を示した。つまり、SP 作動性ニューロンの入力を受

ける深層ニューロンの約半分は、5-HT/アドレナリンによる興奮性の入力を受け、残りの半分はこれらの入力を受けないことが示唆される。前者のニューロンが、興奮性ニューロンであるのか抑制性ニューロンであるのか、興味を持たれるところであるが現時点では分からない<sup>(17)</sup>。さらなる実験が必要であると考えている。

【参考文献】

- 1) Adam W. Hantman, Anthony N. van den Pol, and Edward R. Perl. Morphological and Physiological Features of a Set of Spinal Substantia Gelatinosa Neurons Defined by Green Fluorescent Protein Expression. *The Journal of Neuroscience*. 24:836-842, 2004.
- 2) Allan I. Basbaum, Howard L. Fields. The origin of descending pathways in the dorsolateral funiculus of the spinal cord of the cat and rat: Further studies on the anatomy of pain modulation. *The Journal of Comparative Neurology*. 187:513-531, 1979
- 3) Fukushima T, Ohtsubo T, Tsuda M, Yanagawa Y, Hori Y. Facilitatory actions of serotonin type 3 receptors on GABAergic inhibitory synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn. *J Neurophysiol*. 102:1459-71, 2009.
- 4) Goldstein A, Tachibana S, Lowney L I, Hunkapiller M, and Hood L. E. Dynorphin-(1-13), an extraordinarily potent opioid peptide. *PNAS* 76:6666-6670, 1979.
- 5) Gong LW, Ding YQ, Wang D, Zheng HX, Qin BZ, Li JS, Kaneko T, Mizuno N. GABAergic synapses on mu-opioid receptor-expressing neurons in the superficial dorsal horn: an electron microscope study in the cat spinal cord. *Neurosci Lett*. 1997 May 9;227(1):33-6.
- 6) Grudt TJ, Perl ER. Correlations between neuronal morphology and electrophysiological features in the rodent superficial dorsal horn. *J Physiol*. 540:189-207, 2002.
- 7) Hirakawa M, Kawata M. Changes of chemoarchitectural organization of the rat spinal cord following ventral and dorsal root transection. *J Comp Neurol*. 1992 Jun 15;320(3):339-52.
- 8) Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature*. 258:577-80, 1975.
- 9) Hylden JL, Noguchi K, Ruda MA. Neonatal capsaicin treatment attenuates spinal Fos activation and dynorphin gene expression following peripheral tissue inflammation and hyperalgesia. *J Neurosci*. 1992 May;12(5):1716-25.
- 10) Jessell TM, Iversen LL. Opiate analgesics inhibit substance P release from rat trigeminal nucleus. *Nature*. 268:549-51, 1977
- 11) Koovor A, Lester HA. Gi Irks GIRKs. *Neuron*. 2002 Jan 3;33(1):6-8.

- Review.
- 12) Lu Y, Perl ER. Selective action of noradrenaline and serotonin on neurones of the spinal superficial dorsal horn in the rat. *J Physiol.* 582:127-36, 2007.
  - 13) Macdonald SG, Dumas JJ, and Boyd ND Chemical cross-linking of the substance P (NK-1) receptor to the subunits of the G proteins Gq and G11. *Biochemistry*,35: 2909-16,1996
  - 14) Mantyh PW, Allen CJ, Ghilardi JR, Rogers SD, Mantyh CR, Liu H, Basbaum AI, Vigna SR, Maggio JE. Rapid endocytosis of a G protein-coupled receptor: substance P evoked internalization of its receptor in the rat striatum in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Mar 28;92(7):2622-6.
  - 15) Mark MD, Herlitze S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K<sup>+</sup> channels. *Eur J Biochem.* 2000 Oct;267(19):5830-6. Review.
  - 16) Schneider SP. Mechanosensory afferent input and neuronal firing properties in rodent spinal laminae III-V: re-examination of relationships with analysis of responses to static and time-varying stimuli. *Brain Res.* 1034:71-89. 2005
  - 17) Schneider SP, Walker TM. Morphology and electrophysiological properties of hamster spinal dorsal horn neurons that express VGLUT2 and enkephalin. *J Comp Neurol.* 501:790-809. 2007.
  - 18) Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K, Yoshimura M. Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors. *J Physiol.* 573:753-63, 2006.
  - 19) Simon EJ, Hiller JM, Edelman I. Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic (3H) Etorphine to rat-brain homogenate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:1947-9, 1973.
  - 20) Terenius L. Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*:317-20. 1973
  - 21) Todd AJ. Anatomy of primary afferents and projection neurones in the rat spinal dorsal horn with particular emphasis on substance P and the neurokinin 1 receptor. *Exp Physiol.* 87:245-9. Review. 2002
  - 22) 横田敏勝 神経機構 1 p1-7. 3B p22-24 (臨床医のための痛みのメカニズム: 改訂第2版) 編者: 横田敏勝著者、(株) 南江堂 1990.
  - 23) Yoshimura M, Furue H. Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord. *J Pharmacol Sci.* 101:107-17, 2006.
  - 24) Yoshimura M, Jessell T. Amino acid-mediated EPSPs at primary afferent synapses with substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord. *J Physiol.* 430:315-35, 1990.

25)William D., Jr Willis, Richard E. Coggeshall. Chapter 6 p187-270. Sensory Mechanism of the Spinal Cord. Kluwer Academic/PLENUM Publishers. New York. 2004.

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 7 件)

Kashiba, H., Uchida, Y, Takeda, D, Nishigori, A, Ueda, Y, Kuribayashi, K and Minoru Ohshima, M. TRPV2-immunoreactive intrinsic neurons in the rat intestine. Neurosci. Lett. 366:193-196 2004.

Kashiba H., Uchida Y, Senba E. Distribution and colocalization of NGF and GDNF family ligand receptor mRNAs in dorsal root and nodose ganglion neurons of adult rats. Mol. Brain Res. 110:52-62. 2003

Uchida Y, Nishigori A, Takeda D, Ohshiro M, Ueda Y, Ohshima M, Kashiba H. Electroacupuncture induces the expression of Fos in rat dorsal horn via capsaicin-insensitive afferents. Brain Res 978: 136-140 2003

金田太吾、榎葉均 NIH「Acupuncture」合意声明に対する日本と米国における受け止め方の違い 医道の日本 62 巻 6 号 139-144 頁 2003 年

榎葉均 仙波恵美子 痛覚伝道路の可塑性と神経栄養因子 Clinical Neuroscience、20 巻 1116-1118、2002 年

Kashiba H., Uchida Y, Senba E. Difference in binding by isolectin B4 to trkA and c-ret mRNA-expressing neurons in rat

sensory ganglia. Mol. Brain Res. 95:18-26. 2001

Kashiba H., Fukui H, Senba E. Histamine H1 receptor mRNA is expressed in capsaicin-insensitive sensory neurons with neuropeptide Y-immunoreactivity in guinea pigs. Brain Res. 901:85-93. 2001

[学会発表] (計 2 件)

清行康邦、中塚映政、武田大輔、内田靖之、大島稔、榎葉均 第 87 回日本生理学会大会 (2010 盛岡)「サブスタンス P に応答する脊髄後角の深層ニューロンはエンケファリンにも応答する-パッチクランプ法による解析-

榎葉均、武田大輔、内田靖之、大島稔 第 85 回日本生理学会大会 (2008 東京)「脊髄後角深層ニューロンの神経ペプチド (SP、CGRP、STT) に対する膜電位応答」

[図書] (計 4 件)

榎葉均 (分担; 第 3 章 A 鎮痛) 日本伝統医学テキスト鍼灸編 (医学書院 2011 年 11 月完成予定)

Senba E, Imbe H and Kashiba H. The Handbook of Chronic Pain (Nova Science Publishers Inc. New York 2007) Biochemical Basis of Nociception: The Role of Cytokines (Part I, Chapter 2: pp25-40)

榎葉均 (分担)「心と体を結ぶ感覚-特に痛みについて-」(動きを生み出す心と体のしくみ 第六章 56-71 ページ) あいり出版 2004 年

仙波恵美子、岡本圭一郎、井辺弘樹、榎葉均「慢性痛におけるヒスタミン・セロトニンの関与」脳機能の解明-生命科学の主潮流- (ガイア出版)、529-539、2002 年

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

**榎葉均 (Kashiba Hitoshi)**  
関西医療大学・保健医療学部・教授  
研究者番号：10185754

### (2) 研究分担者

**大島稔 (Oshima Minoru)**  
関西医療大学・保健医療学部・講師  
研究者番号：20342230