

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09272

研究課題名(和文) 脊髄損傷後疼痛におけるN型電位依存性Ca²⁺チャネルの役割と新規急性期治療の開発

研究課題名(英文) Role of N-type voltage-gated calcium channel in mechanisms of neuropathic pain after spinal cord injury

研究代表者

大橋 正幸 (Ohashi, Masayuki)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：70706720

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄損傷後疼痛におけるN型電位依存性Ca²⁺チャネル(VGCC)の役割およびその阻害薬の効果、脊髄損傷モデルラットで行動学的実験、電気生理学的実験、免疫組織化学の実験により多角的に解析した。行動学実験ではN型VGCC阻害薬投与により痛み閾値の改善を認めた。N型VGCC阻害薬投与によりin vitroパッチクランプ記録での微小興奮性シナプス後電流の頻度減少、AおよびC線維刺激による単シナプス性EPSCの抑制、およびin-vivoパッチクランプ記録での活動電位の頻度減少を認め、N型VGCC阻害薬は脊髄後角の興奮性シナプス前終末に作用し、脊髄損傷後疼痛を軽減することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄損傷は運動・感覚障害により生活の質を著しく低下させる重篤な病態である。脊髄損傷患者の55%は神経障害性疼痛を有しており、睡眠やリハビリへの参加、仕事への復帰という患者の意欲も低下させることで、脊髄損傷による運動麻痺とともに身体的・社会的・精神的機能障害を引き起こす。しかし、最も有効とされる薬物治療を行っても痛みが50%軽減する症例は3割程度にすぎないのが現状である。本研究で有用性が示唆されたN型VGCC阻害剤は、欧米において難治性疼痛に対しても膜下投与で既に臨床使用されている薬剤であり、脊髄損傷モデルラットでの本研究結果は適応拡大による早期臨床応用に向けた基盤となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the role of N-type voltage-gated calcium channels (VGCC) in neuropathic pain (NP) after spinal cord injury (SCI) and the effects of N-type VGCC inhibitor on NP after SCI by behavioral, electrophysiological, and immunohistochemical experiments using SCI rats. In behavioral experiments, thresholds of NP were improved by administration of N-type VGCC inhibitors. In in vitro patch-clamp recordings, administration of N-type VGCC inhibitor decreased the frequency of miniature excitatory postsynaptic currents and inhibited monosynaptic EPSCs induced by A-delta and C fiber stimulation. In in vitro recordings, administration of N-type VGCC inhibitor decreased the frequency of action potential. Our results indicate that N-type VGCC inhibitors act on excitatory presynaptic terminals in the dorsal horn of the spinal cord and reduce NP after SCI.

研究分野：整形外科学

キーワード：脊髄損傷 疼痛 電位依存性カルシウムチャネル パッチクランプ コノトキシン アロディニア カルシウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は運動・感覚障害により生活の質 (QOL) を著しく低下させる重篤な病態である。脊髄損傷患者の 55% は神経障害性疼痛を有しており [1]、特に脊髄損傷高位の尾側 (Below-level) に生じる痛覚過敏やアロディニア (異痛症) は睡眠やリハビリテーションへの参加、仕事への復帰という患者の意欲も低下させることで、脊髄損傷による運動制限以上の身体的・社会的・精神的機能障害を引き起こす。したがって、脊髄損傷後疼痛の機序を解明し、有効な治療法を確立することは脊髄損傷患者の社会復帰を含めた QOL 向上に必須である。しながら、最も有効とされる薬物でも、痛みが 50% 軽減する症例は 3 割程度にすぎず、リハビリテーションや日常生活に支障のない範囲に痛みをコントロールすることは難しいのが現状である。

申請者はこれまでに脊髄損傷後の二次障害の機序解明と受傷後急性期における N 型電位依存性カルシウムチャネル (VGCC) 阻害剤のくも膜下投与の脊髄保護効果を運動機能に着目して研究してきた。その過程で、N 型 VGCC 阻害剤による運動機能の改善のみならず、受傷後亜急性～慢性期における脊髄損傷モデルラットの疼痛行動の減弱を認めた。N 型 VGCC は脊髄や後根神経節を含む神経細胞に高密度に分布しており、痛覚過敏やアロディニアの成立や維持に深く関与している。また、脊髄損傷後疼痛の成立には、損傷部以外の脊髄や脳内の神経可塑的な変化も深く関与しており、脊髄損傷部より尾側の可塑的变化には、損傷部での下行性抑制経路の遮断も関与している。よって、申請者の予備実験結果は脊髄損傷後の急性期に N 型 VGCC 阻害剤を投与することで脊髄損傷部の障害が最小限となり、その後生じる神経可塑的变化および痛覚過敏・アロディニアを抑制できる可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は脊髄損傷後の痛覚過敏やアロディニアにおける N 型 VGCC の役割と脊髄損傷後急性期の N 型 VGCC 阻害剤くも膜下投与の効果を、電気生理学実験、および行動学的実験を行い、多角的に検討することである。

3. 研究の方法

(1) 脊髄損傷モデルラットの作成～薬剤投与

全身麻酔下に成熟ラットの椎弓切除を行い、第 8 - 10 胸椎高位で専用デバイス (Infinite Horizons Impactor) で脊髄に圧挫を加え (100 kdyn)、不全脊髄損傷モデルを作成した。脊髄損傷後 4 時間で第 4 腰椎 L4 高位より N 型 VGCC 阻害剤 (-conotoxin MVIIA 200 pmol) をくも膜下投与した。

(2) 行動学的実験

脊髄損傷後 14 日間の後肢運動機能を Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) スコアで評価した。また、損傷後 14 日目に痛みの評価として両足底の von Frey test による痛み閾値 (機械刺激) を測定した。

(3) In vivo パッチクランプ法 (細胞外記録法) による電気生理学的実験

脊髄損傷モデルラットを用いて顕微鏡下に電極を脊髄後角に誘導し、活動電位の発生頻度を解析した。また 8 g の von Frey Filament (vFF) を使用して後肢刺激を行い、その反応を記録した。

(4) In vitro 脊髄標本からのパッチクランプ記録

脊髄損傷モデルラットの後根付き脊髄横断スライスを作成し、ガラス微小記録電極を顕微鏡下にマニピュレーターを用いて脊髄後角 (II 層) に誘導しパッチクランプ記録を行った。-conotoxin MVIIA (1 μM, 30 秒間灌流投与) に対する反応を解析した。A および C 線維の後根刺激により誘発される単シナプス性 EPSC も同様に記録した。

4. 研究成果

(1) 行動学的実験

後肢運動機能については、脊髄損傷後 1 日目より MVIIA 投与群で有意に改善し、損傷後 14 日まで維持されていた (図 1)。また、von Frey test では、MVIIA 投与群で疼痛閾値が有意に改善していた (MVIIA 投与群 23.0 ± 9.8g, 非投与群 4.1 ± 2.3g, p < 0.01)。以上より、-conotoxin MVIIA は運動機能および痛みを改善させることが明らかとなった。

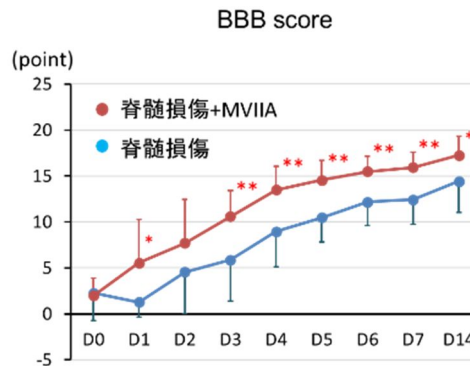


図1. 後肢運動機能評価

(2) In vivo パッチクランプ法

脊髄後角における自然発火の頻度は脊髄損傷モデルラットで 0.98 ± 0.78 Hz であり、MVIIA 投与群で 0.21 ± 0.24 Hz であり、有意に小さかった ($p < 0.001$; 図 2A)。後肢刺激による活動電位の発生頻度も MVIIA 投与群で有意に小さかった (MVIIA 非投与群 13.3 ± 6.8 Hz, MVIIA 投与群 2.9 ± 1.4 Hz, $p < 0.001$; 図 2B)。

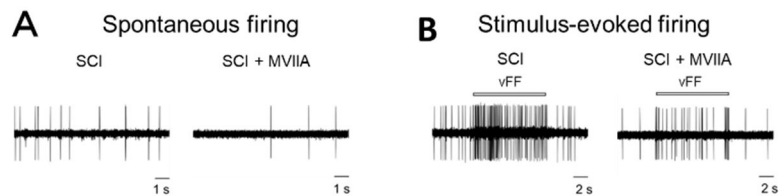


図2. In vivoパッチクランプ記録

(4) In vitro パッチクランプ法

脊髄損傷モデルラットの脊髄後角第 II 層において、 ω -conotoxin MVIIA 投与により微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) の頻度は 7.8 ± 8.2 Hz から 4.6 ± 5.2 Hz へと有意に減少した ($p < 0.01$) が振幅は有意な変化を認めなかった (図 3)。また、A および C 線維の後根刺激により誘発される単シナプス性 EPSC はそれぞれ 212.7 ± 227.3 pA から 149.5 ± 171.1 pA、および 337.8 ± 296.5 pA から 270.9 ± 247.8 pA へと有意に減少した ($p < 0.01$)。

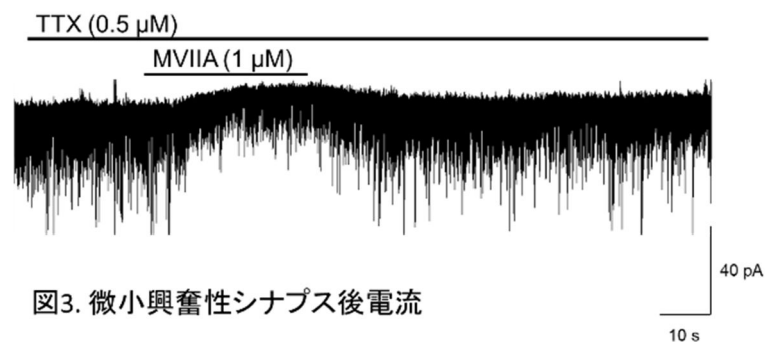


図3. 微小興奮性シナプス後電流

以上の結果から、N 型電位依存性カルシウムチャネル遮断薬である ω -conotoxin MVIIA は、脊髄後角の興奮性シナプス前終末に存在するカルシウムチャネルの活性を阻害することで興奮性の伝達を抑制し、脊髄損傷後疼痛に対する鎮痛効果を発揮すると考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ohashi N, Uta D, Ohashi M, Hoshino R, Baba H	4. 巻 18
2. 論文標題 Omega-conotoxin MVIIA reduces neuropathic pain after spinal cord injury by inhibiting N-type voltage-dependent calcium channels on spinal dorsal horn.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1366829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2024.1366829	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大橋正幸
2. 発表標題 脊髄損傷後疼痛におけるN型電位依存性Ca ²⁺ + チャネルの役割と新規急性期治療の開発
3. 学会等名 Spine Expert Meeting（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大橋正幸、大橋宣子、歌大介、川島寛之、渡辺慶
2. 発表標題 脊髄損傷後疼痛におけるN型電位依存性Ca ²⁺ + チャネルの役割
3. 学会等名 整形外科痛みを語る会
4. 発表年 2023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
研究分担者	馬場 洋 (Baba Hiroshi) (00262436)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	大橋 宣子 (Ohashi Nobuko) (70706712)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	

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