

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 29 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462303

研究課題名(和文) 脊髄後角における顆粒球コロニー刺激因子がもたらす鎮痛作用メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanisms of analgesic action by granulocyte colony-stimulating factor in the spinal dorsal horn

研究代表者

筒井 俊二 (Tsutsui, Shunji)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：70423960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：顆粒球コロニー刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF)の脊髄後角におけるシグナル伝達に及ぼす影響についてパッチクランプ法により解析を行った。脊髄横断スライスを用いた解析では興奮性シナプス後電流は増強傾向にあった。また、抑制性シナプス後電流は特に変化を認めなかった。一方、生体環境に近いin vivoパッチクランプ法ではsEPSCは抑制傾向がみられた。脊髄後角ニューロンによってG-CSFに対する反応は細胞特異性があるものと思われるが、弱いながらも興奮性シナプス伝達を抑制する事でG-CSFの鎮痛効果の一役を担っている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated effects of Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) onto the synaptic transmission of the rat spinal dorsal horn neurons by patch-clamp methods. In our study, bath application of G-CSF tended to enhance spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) of dorsal horn neurons. On the other hand, G-CSF had no effect onto spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSCs) of dorsal horn neurons. Moreover, we analyzed how G-CSF affected dorsal horn neurons by in vivo patch-clamp. It showed that sEPSCs were slightly inhibited by bath application of G-CSF. These results suggest that dorsal horn neurons have cell-specific response to G-CSF. We think that inhibitory effects onto excitatory neurotransmission by G-CSF lead analgesic actions.

研究分野：整形外科学

キーワード：顆粒球コロニー刺激因子 G-CSF パッチクランプ法 in vivoパッチクランプ法 脊髄後角 シグナル伝達 興奮性シナプス後電流 抑制性シナプス後電流

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛、とりわけ神経因性疼痛は既存の非ステロイド性抗炎症薬 (NSAIDs) やオピオイドなどの鎮痛薬に抵抗する 경우가多く、治療に難渋する。近年、顆粒球コロニー刺激因子 (Granulocyte colony-stimulating factor; G-CSF) には脊髄損傷における神経保護作用があり、運動機能回復のみならず脊髄損傷後疼痛の改善に寄与していることが報告されている。脊髄損傷による後遺症の一つ脊髄損傷後疼痛は神経障害性疼痛の一形態で有るが、G-CSF が脊髄損傷後疼痛のみならず、神経障害性疼痛全般にわたって、鎮痛効果をもたらす可能性があると思われる。しかしながら、G-CSF の鎮痛作用のメカニズムはいまだ明らかでない。

### 2. 研究の目的

G-CSF がどのような作用機序で神経障害性疼痛に鎮痛効果をもたらすのか分子メカニズムは未だ不明である。G-CSF が脊髄損傷後疼痛に効果があることから G-CSF は痛覚伝達の中継基地である脊髄後角においてシナプス伝達になんらかの影響を与えているものと考えられる。本研究では脊髄後角における興奮性シナプス伝達および抑制性シナプス伝達に対して G-CSF の影響を脊髄スライスパッチクランプ法および *in vivo* パッチクランプ法を電気生理学的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

《ラット脊髄横断スライスからのパッチクランプ記録》

5~6 週齢の雄性ラットをウレタン (1.2~1.5g/kg を腹腔内投与) で深麻酔した後、L1~S3 レベルの脊髄を摘出し、酸素飽和した人工脳脊髄液 (2~4 ) に浸した。実体顕微鏡下で硬膜を除去した後、後根、前根をすべて切除し、その後、クモ膜と軟膜を除去した。脊髄を寒天ブロックに設けた浅い溝の上に置き、マイクロスライサーを用いて厚さ 650  $\mu$ m の脊髄横断スライス標本作製した。切り出したスライスを直ちに記録用チャンパーに移し、酸素付加、加温 (36 ) した人工脳脊髄液により、15~20 ml/分 の速度で灌流した。人工脳脊髄液の組成 (mM) は、NaCl, 117; KCl, 3.6; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgCl<sub>2</sub>, 1.2; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; glucose, 11; NaHCO<sub>3</sub>, 25 (pH=7.4) であった。パッチ電極を脊髄後角表層に刺入し、ギガオーム・シールを形成した後、後角ニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行った。電極は入力抵抗が 10~15M  $\Omega$  のものを用い、その内液組成は、K-gluconate, 135; KCl, 5; CaCl<sub>2</sub>, 0.5; MgCl<sub>2</sub>, 2; EGTA, 5; HEPES, 5; Mg-ATP, 5 あるいは、Cs-sulfate, 110; CaCl<sub>2</sub>, 0.5; MgCl<sub>2</sub>, 2; EGTA, 5; HEPES, 5; tetraethylammonium (TEA) chloride, 5; Mg-ATP, 5 (pH=7.2) であった。前者は興奮性応答、後者は抑制性応答を記録するのに使用

した。得られた膜電流はパッチクランプ用増幅器 (Axopatch 200B) により増幅し、A/D 変換後、データ記録および解析用のソフトウェア (pCLAMP10) を用いてコンピュータにより記録・解析した。実験結果は平均  $\pm$  標準誤差で表し、検定は Student の paired t-test で行い、 $P < 0.05$  をもって有意と判定した。

### 《*in vivo* パッチクランプ法》

*In vivo* パッチクランプ法に関しては Taniguchi (Pain, 2011) による。ラットをウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5g/kg) で麻酔後、胸腰椎部に縦切開を行い、Th12 から L2 まで椎弓切除術を行う。次にラットを脊髄固定器で固定し、皮切部の辺縁を引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36 の酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流する。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、腰傍大部レベルで後根を内外側に分け、電極刺入スペースを作る。呼吸による脊髄の振動が抑制できていることを確認した上で、クモ膜と軟膜に微細ハサミ、鑷子を用いて電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を終える。マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、5mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成するいわゆるブラインドパッチクランプ法によって記録を行う。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行う。記録細胞は第 1 層の膠様質を狙うが、記録電極を刺入する深さからある程度の同定は可能である (脊髄表面から約 150  $\mu$ m 以内)。

### 4. 研究成果

顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) が脊髄後角ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼす影響について、ラット脊髄横断スライスにパッチクランプ法を適応して解析を行った。-70mV の電位固定下に脊髄第 1 層のニューロンから自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents: sEPSCs) に対する G-CSF の影響を調べた。G-CSF を 100  $\mu$ g/100ml を 5 分間灌流投与した場合の sEPSC の頻度・振幅の変化率はそれぞれ平均  $131.2 \pm 14.5\%$ 、及び  $98.6 \pm 4.2\%$  ( $n = 11$ ) であった。平均すると全体的には sEPSCs は頻度が増強傾向にあったが Student paired t 検定による統計処理上では有意差を認めなかった。この理由として、脊髄後角内におけるニューロン特性が存在する可能性が考えられた。個々のニューロンの変化の内訳は頻度、振幅ともに 10% 以上の変化を有意な変化として判定すると、頻度で増強していたものが 45.5%、減少していたものが 18.2%、変化なしが 36.3% であった。振幅に関しては増強していたものが 18.2%、減少していたものが 18.2%、変化なしが 63.6% であった。次に自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic currents: sIPSCs) に対する

G-CSF の作用を解析した。G-CSF を 100  $\mu$ g/100ml を 5 分間灌流投与した場合の sIPSCs の頻度・振幅の変化率はそれぞれ平均 104.7  $\pm$  6.8 %, 及び 88.7  $\pm$  5.0 % (n=9)であった。その結果、統計学上は特に IPSC に対する有意な作用は認めなかった。本研究の計画段階では G-CSF は脊髄後角レベルで sEPSC の抑制をもたらす、あるいは IPSC の増強をもたらすと仮説をたてていたが、今回の結果は仮説と異なる結果となった。そこで、次により生体環境に近い状態である in vivo 標本を用いた in vivo パッチクランプ法により、G-CSF の sEPSCs に対する反応を解析した。脊髄スライスの時と同様に -70mV の電位固定下に脊髄第 層のニューロンから sEPSCs に対する G-CSF の影響を調べた。G-CSF を 100  $\mu$ g/100ml を 5 分間灌流投与した場合の sEPSCs の頻度・振幅の変化率はそれぞれ平均 94.5  $\pm$  4.8 %, 及び 103.4  $\pm$  5.5 % (n=16)であった。平均するとスライス標本とは違い、全体的には sEPSCs は頻度が抑制傾向にあったが、統計処理上では有意差を認めなかった。個々のニューロンの変化の内訳は頻度、振幅ともに 10%以上の変化を有意な変化として判定すると、頻度で増強していたものが 18.8%、減少していたものが 12.5%、変化なしが 68.7%であった。振幅に関しては増強していたものが 25%、減少していたものが 25%、変化なしが 50%であった。G-CSF に対する脊髄後角細胞の反応は二相性であることから、やはり何らかの細胞特性を有する可能性があるとと思われる。その鎮痛機序は複雑なものであると考えられる。生体環境に近い in vivo 標本では sEPSCs が抑制傾向を認めたことから、G-CSF は脊髄後角ニューロンに対する一次求心性線維からの興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の放出を弱いながらも抑制する事で、鎮痛効果を有する可能性が示唆された。さらに G-CSF の鎮痛機序には短期的な作用のみならず、長期的な作用機序が存在する可能性もある。そのような観点から、今後、脊髄損傷後疼痛モデルや末梢神経障害モデルラットを用いた in vivo パッチクランプ法やこれらのモデルに G-CSF を髄注したモデルなどでの解析を行い、本研究を継続する予定にしている。

#### 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 6 件)

1. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. Interferon-gamma potentiates NMDA receptor signaling in spinal dorsal horn neurons via microglia-neuron interaction. *Mol Pain*. 2016. 12: DOI: 10.1177/1744806916644927

2. Tsutsui S, Iwasaki H, Yamada H, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Nishi H, Yoshida M. Augmentation of motor evoked potentials using multi-train transcranial electrical stimulation in intraoperative neurophysiologic monitoring during spinal surgery. *J Clin Monit Comput*. 2015.29:35-9.doi:10.1007/s10877-014-9565-7.
3. Tsutsui S, Kagotani R, Yamada H, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Iwasaki H, Yoshida M. Can decompression surgery relieve low back pain in patients with lumbar spinal stenosis combined with degenerative lumbar scoliosis? *Eur Spine J*. 2013. 22:2010-4.
4. Tsutsui S, Yamada H, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Iwasaki H, Yoshida M. Quantification of the proportion of motor neurons recruited by transcranial electrical stimulation during intraoperative motor evoked potential monitoring. *J Clin Monit Comput*. 2013. 27:633-7
5. 谷口 亘, 吉田 宗人, 中塚 映政. 【慢性疼痛と原因療法】P2X 受容体を介した慢性疼痛メカニズムと鎮痛. *臨床整形外科* 2013; 48:1169-1174
6. Nishio N, Taniguchi W, Sugimura YK, Takiguchi N, Yamanaka M, Kiyoyuki Y, Yamada H, Miyazaki N, Yoshida M, Nakatsuka T: Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 2013. 247: 201-12 doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.05.023.

[学会発表](計 3 件)

1. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Hashizume H, Yoshida M, Nakatsuka T. Interferon-gamma activates NMDA receptors in the dorsal horn of spinal cord. Society for Neuroscience Annual meeting 2015. Chicago. 2015.10.17-21
2. Sonekatsu M, Taniguchi W, Yamanaka M, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Yoshida M, Nakatsuka T. The role of NMDA receptor activation by IFN in the spinal dorsal horn neurons. Orthopedic Research Society 2016 Annual meeting. Orlando. 2016.3.1-5
3. Tsutsui S, Iwasaki H, Yamada H, Hashizume H, Minamide A, Nakagawa Y, Nishi H, Yoshida M. Feasibility of novel transcranial electrical

stimulation technique in  
intraoperative neurophysiologic  
monitoring during spinal surgery:  
Multi-train stimulation. Cervical  
spine research society. Los  
Angeles,2013.12.3-7.

和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員  
研究者番号：40648359

〔図書〕(計 5 件)

1. 谷口亘, 中塚映政 : 痛みの Clinical Neuroscience 8 脊髄機能変化と痛み : アロディニアなどのメカニズムを巡って. 最新医学 71(2): 112-115, 2016 最新医学社
2. Wataru Taniguchi, Terumasa Nakatsuka. Chaptor31. Spinal synaptic plasticity in chronic pain. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014; 387-398, Springer Japan, Tokyo
3. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 A. 基礎知識 12. 痛みの研究手法-パッチクランプ法/C. 脊髄 1. 脊髄後角/D. 脳 2. 神経可塑性/D. 脳 3. 中枢性感作. 痛みの Science & Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.14, 41, 60, 61 文光堂, 東京
4. 谷口亘, 中塚映政. 第 2 章 痛みのメカニズムと最新治療 1. 痛みのメカニズム 「先端医療シリーズ 44 臨床医のための最新整形外科」2013; 51-54, 先端医療技術研究所, 東京
5. 谷口亘, 中塚映政. 1 章総論 5. 炎症痛のメカニズム 痛みの Science & Practice シリーズ 2 「痛みの薬物治療」2013; 58-66, 文光堂, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井俊二 (Tsutsui Shunji)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：70423960

(2) 研究分担者

谷口 亘 (Taniguchi Wataru)  
和歌山県立医科大学・医学部・助教  
研究者番号：20453194

(3) 連携研究者

曽根勝真弓 (Sonekatsu Mayumi)  
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教  
研究者番号：40725579

西尾尚子 (Nishio Naoko)