

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 26 日現在

機関番号：34438

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462386

研究課題名(和文)脳幹からの下行性抑制ニューロンは脊髄後角の深層ニューロンを興奮させる

研究課題名(英文)Discending neurons in the brain stem excite deep dorsal horn neurons of the rat spinal cord

研究代表者

榎葉 均 (KASHIBA, Hitoshi)

関西医療大学・保健看護学部・教授

研究者番号：10185754

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脳幹より脊髄後角に投射する下行性ニューロンの働きについては不明な部分が多い。我々はパッチクランプ法を用い検討した結果、後角深層における多くのニューロンがSPに応答することが分かった。これは深層ニューロンもまた侵害受容ニューロンからの入力を受けることを意味する。また、深層ニューロンの20～40%のニューロンはセロトニンおよびアドレナリンにより興奮性に応答することも分かった。そして、これらのニューロンはSPにも反応したのである。つまり、末梢からの侵害情報を受け取る深層ニューロンはセロトニン作動性およびアドレナリン作動性ニューロンにより興奮性に制御されていることを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Little is known about physiological functions of nociceptive neurons in the deep dorsal horn of spinal cord, as compared with those in the superficial dorsal horn. In this study, deep dorsal horn neurons were examined by using the blind patch clamp technique used freshly sliced spinal cord of the rat. More than half of deep dorsal horn neurons receive substance P (SP) receptors-mediated excitatory inputs, suggesting that these are nociceptive neurons (multireceptive or selectively nociceptive). Of the neurons recorded, about 40% and 20% displayed the slow inward currents by 5-HT and adrenaline, respectively, and these neurons excitatory were activated by substance P. On the other hand, the slow outward currents by 5-HT and adrenaline were observed in a few neurons. The present study suggested that some nociceptive neurons in the deep dorsal horn received 5-HT and adrenaline receptors-mediated excitatory inputs.

研究分野：神経科学

キーワード：疼痛 下行性ニューロン 脊髄後角 パッチクランプ サブスタンスP セロトニン ノルアドレナリン
ラット

1. 研究開始当初の背景

疼痛は、人体への警告信号であると知られており、我々にとって不快で出来れば遭遇したくない感覚であり、身体の機能にも悪影響を及ぼす事が知られている。これが原因で患者の多くは病院やクリニックを訪れる事になる。痛みの原因を大別すると、侵害受容性疼痛、神経因性疼痛、心因性疼痛に分類できる。侵害受容性疼痛は、健全な組織を傷害するかその危険性を持つ傷害刺激が加わった為に生じるもので、これらは侵害受容器を介して生じる。神経因性疼痛は、末梢あるいは中枢神経系そのものの障害により発生し、機能異常による病的な痛みである。心因性疼痛は、身体の異常によるものではなく、心理的な原因(ストレス等)に由来する痛みである。一方、これらの痛みを抑制的に制御する神経メカニズムの存在が知られている。代表的な内因性疼痛機構の一つに脳幹由来の下行性抑制機構がある。これは動物実験において脳幹のある神経群を興奮させた時、実験動物が痛みが減弱したかのような振る舞いをする事から想定された仮説である。しかしながら、この神経メカニズムについては不明な部分が多く残されている。

2. 研究の目的

下行性抑制機構の神経メカニズムに加え、脊髄後角の働きについても不明な部分が多い。特に後角深層の働きについては広作動域(wide dynamic range : WDR)ニューロンの存在が知られているものの、その他のニューロンの働きや構築についてはほとんど情報が得られていないのが現状である。そこで我々は、電気生理学的手法や形態学的手法を駆使し、脳幹-脊髄後角を含む局所神経回路を解明すべく実験を進めている。

3. 研究の方法

実験には3~4週令のSprague-Dawley (SD)系雄性ラットを使用した。麻酔したラットより脊髄を取り出し、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に浸す。実体顕微鏡下にて、硬膜、くも膜、軟膜、前根、後根を除去しマイクロスライサーを用いて厚さ約650 μ mの脊髄新鮮横断スライス標本を作製する。作製したスライス標本を透明アクリル製の記録用チャンバーに移し、後角深層部のニューロンよりホールセルレコーディングを行い、様々な試薬を用い膜電流応答を記録する。

4. 研究成果

A. 脊髄後角における速いシナプス伝達と遅いシナプス伝達

これまで我々が行ってきた脊髄新鮮スライスを用いたブラインド・パッチクランプ法による後角深層領域における実験より、速い興奮性のシナプス伝達はGluにより、また、速い抑制性のシナプス伝達はGABAもしくはGlyにより仲介されている事が明らかとなっている。更に、脊髄後角ニューロンに含まれるEnKやダイノルフィンなどのオピオイドペプチドや、一次求心性の侵害受容ニューロンに含まれるSPやカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)、ソマトスタチン(成長ホルモン抑制ホルモン)などの神経ペプチドが、これらの速い興奮性及び抑制性の伝達を修飾していると考えられている。ちなみに、脊髄後角の表層に分布するSPそのものの起源については、一次求心性の侵害受容ニューロン、上位中枢からの下行性ニューロン、及び脊髄後角内のインターニューロンが考えられるが、SPの遺伝子発現の結果をしてみると、後根神経節において約30%のニューロンが陽性であるのに対し、脊髄後角ではこの遺伝子を発現するニューロンがほとんど見られない事や、これを示唆する結果もいくつか報告されてお

り、大部分は一次求心性の侵害受容ニューロン由来であると考えられている。

下行性抑制機構の神経メカニズムに加え、脊髄後角の働きについても不明な部分が多い。特に後角深層の働きについて広作動域 (wide dynamic range : WDR) ニューロン

B . 後角深層ニューロンは SP 作動性の侵害受容ニューロンの入力を受ける。

今回の実験において、記録した後角深層ニューロンの約 70% は SP に対して slow inward currents を示した。ラット後肢に侵害刺激に加えた時、主に後角深層ニューロンにおいて、ニューロキニン 1 (NK1) 受容体のインターナリゼーションを観察される事が報告されている。これらの結果から、後角深層ニューロンはその樹状突起を表層まで伸ばしており、そこで一次求心性の SP 作動性ニューロンからの入力を受けていると考えられる。電気生理学的に後角深層ニューロンを WDR ニューロン、侵害受容性ニューロン、及び非侵害性受容ニューロンに大別されており、少なくとも定性的には我々の結果と一致している。

また、この脊髄後角表層には、5-HT や NA を含有する脳幹からの下行性ニューロンが投射している。先に述べたように、これらのニューロンは内因性鎮痛機構の一つとして重要な役割を果たしていると考えられており、実際に、多くの脊髄後角膠様質ニューロン (SG) (約 70%) を抑制している事が報告されている。しかしながら、この抑制性の下行性ニューロンの支配を受ける SG ニューロンには、興奮性のものと抑制性のものが含まれているが、その詳細については不明な部分が多い。

C . 後角深層ニューロンは 5-HT/NA 作動性ニューロンの入力を受ける。

後角表層のうち、層においては、5-HT 作動性及び NA 作動性ニューロンのほとんどが抑

制性の入力であるのに対して、今回、我々が後角深層で行った結果では、これらのニューロンの大部分が興奮性に深層ニューロンと連絡している事が分かった。記録した深層ニューロンの約 40% もしくは約 20% のニューロンがそれぞれ 5-HT もしくは Ad にゆっくりした興奮性の slow inward currents を示し、slow outward current を示したものは少なかった。抗 5-HT 抗体や抗ドーパミン-β-ヒドロキシラーゼ (NA 合成酵素) を用いた免疫組織化学的解析から、5-HT 作動性及び NA 作動性ニューロンもまた、それらの大部分が後角表層に終末する事が報告されている。よって、本実験において、5-HT もしくは Ad の bath application (還流) によりゆっくりした膜電流変化を生じたニューロンは、やはり先に述べたようにその樹状突起を表層に伸ばしており、そこで 5-HT 作動性及び NA 作動性ニューロンより入力を受けると推察される。

D . 5-HT 作動性ニューロンから後角深層ニューロンへの入力は 5-HT_{6/7} 受容体が重要である。

5-HT 受容体は、多くのサブタイプに分類されている。その中で、唯一イオンチャンネル型受容体が 5-HT₃ 受容体である。したがって、この受容体を介するシナプス伝達は、迅速かつ確実性の高い情報のやり取りが行われる事になる。しかしながら、今回の実験において、5-HT₃ 受容体を発現する深層ニューロンは非常に少ない事が明らかとなった。つまり、5-HT により slow inward current を示す 8 個のニューロンのうち、5-HT₃ 受容体アゴニスト (biguanide) に応答するニューロンは僅かに 1 個であった。また、5-HT₂ 受容体アゴニスト (α-methyl-5HT) に興奮性に応答するニューロンは約 60% であったが、slow inward current の振幅 (amplitude) は比較的小さいものであった (解析はしていない)。一方、5-HT_{6/7}

受容体アゴニスト (5-CT) を投与すると、全てのニューロンに slow inward current が観察され、これらの応答は比較的大きいものであった。したがって今回の実験より、セロトニン作動性ニューロンから後角深層ニューロンの樹状突起への入力にはこの 5-HT_{6/7} 受容体が大きな役割を果たしているものと考えている。これらのニューロンの一部で、slow inward current に加え抑制性の IPSCs の顕著な増加が観察された。つまり、5-HT 作動性ニューロンが深層ニューロンに興奮性に入力し、一方で間接的に GABA 作動性ニューロンを介して抑制性の信号が同じ深層ニューロンに入力されるのではないかと考えている。この局所神経回路の意義については分からないが、5-HT 受容体作動薬が侵害受容性と考えられる後角深層ニューロンを興奮させることから、広く一般に知られている疼痛の抑制機構としての作用ではなく、これとは異なる未知の役割を果たしているのかもしれない。

E . NA 作動性ニューロンから後角深層ニューロンへの入力は $\alpha 1$ 受容体が重要である。

今回の実験より、後角深層における約 20% のニューロンは、NA 作動性ニューロンより主に興奮性を入力を受ける事が示唆され、その入力には $\alpha 1$ 受容体が重要である事が分かった。Ad 投与により slow inward current を示した全てのニューロンは、 $\alpha 1$ 受容体アゴニストにより同様の膜電流変化を示した。Ad で抑制性のゆっくりした膜電流変化を示すニューロンのうち、一部は同様の応答を示したが、残りのニューロンはどんな膜電流変化も示さなかった。Ad 受容体のうち、抑制性の G 蛋白結合型のもは $\alpha 2$ 受容体であるが、Ad で抑制性の応答を示し $\alpha 2$ 受容体アゴニストで応答を示さない未知の受容体が存在するのかもしれない。あるいは、 $\alpha 1$ 受容体の一部に抑制性のサブタイプが存在する事も示唆されてい

る。また、一部のニューロンで、slow inward current に加え抑制性の IPSCs の顕著な増加が観察された。先に述べたように、このようなニューロンは 5-HT 及び 5-HT_{6/7} アゴニストの投与でも観察され、同様の神経回路が存在すると推測される。

F . 侵害受容ニューロン、下行性ニューロン、後角深層ニューロンを含む局所神経回路

今回の実験結果から、我々は以下に述べるような局所神経回路が存在すると考えている。深層ニューロンは多くの SP 作動性の侵害受容ニューロンより入力を受ける。更に、脳幹からの 5-HT 作動性及び NA 作動性ニューロンより入力を受けるが、これらのほとんどは興奮性で、それぞれ 5-HT_{6/7} 受容体及び $\alpha 1$ 受容体が重要な役割をしていると思われる。末梢からの侵害情報を受け取る後角深層ニューロンが、更に下行性のニューロンにより興奮させられるというわけである。ニューロンであれば SP 作動性ニューロンからの情報は減弱され、Glu 作動性ニューロンであればその逆の様相を呈する事になる。

後角に存在する GABA 作動性ニューロンは 3 割程度で、この中に Gly 作動性ニューロンが含まれると考えられている [Willis Jr. 2004]。特に、後角の中でも GABA 作動性ニューロンが密に分布すると考えられている層は、形態学的手法を取り入れたパッチクランプ法により解析が進み、ニューロンの分類が確立されてきたところである。この領域における興奮性ニューロンとしては、radial cell, transient (一過性の) な発火パターンを示す central cell, vertical cell が、抑制性ニューロンとしては、islet cell, tonic (持続性の) な発火パターンを示す central cell 等が知られている。この他に希ではあるが medial-lateral cell 等も報告されている。Hantman らは、層の GABA 作動性ニューロンは、tonic な発火パタ

ーンを示す central cell の特徴を有すると報告している。脊髄後角における GABA 作動性ニューロンは、後角表層、特に 層に局在しており深層には少ない。よって、我々が記録した 5-HT/Ad で興奮させられるニューロンは興奮性である可能性が高い。従来、5-HT/NA 作動性ニューロンは、侵害情報を減弱させると解釈されてきた。しかしながら、後角深層領域における我々の実験は、これまでの常識とされてきた神経メカニズムと異なる結果となった。この意味するところが何であるかは現在不明である。さらに、解析を進め、脊髄後角の局所神経回路、及び脳幹からの下行性ニューロンの役割についてこれまでとは違う角度から見つめ直し、新しい概念を模索したいと考えているところである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

下行性疼痛抑制系ニューロンの脊髄後角深層への興奮性入力 パッチクランプ法による解析、全日本鍼灸学会(松山 2014) 榎葉均 清行康邦

下行性疼痛抑制機構に関するパッチクランプ法による解析:5-HT/アドレナリン受容体の膜電流応答、全日本鍼灸学会(郡山 2015) 榎葉均 清行康邦

痛みまつわる物質と神経細胞の話 (教育講演) 第 67 回日本良導絡自律神経学会学術大会(京都 2015) 榎葉均

オピオイドペプチドに応答する脊髄後角の深層ニューロンについて:パッチクランプ法による解析、全日本鍼灸学会(札幌 2016) 榎葉均 清行康邦

〔図書〕(計 0 件)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎葉 均 (KASHIBA Hitoshi)
関西医療大学・保健看護学部・教授
研究者番号: 10185754

(2) 研究分担者

なし ()
研究者番号:

(3) 連携研究者

大島 稔 (OHSHIMA Minoru)
関西医療大学・保健医療学部・准教授
研究者番号: 20342230

内田 靖之 (UCHIDA Yasuyuki)
関西医療大学・保健医療学部・講師
研究者番号: 80388678

(4) 研究協力者

清行 康邦 (KIYOYUKI Yasukuni)
関西医療大学・大学院