

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861224

研究課題名(和文) 脊髄後角における神経ステロイドによる痛覚伝達制御の解明

研究課題名(英文) Effects of neurosteroid on pain transmission in the rat dorsal horn.

研究代表者

山本 豪 (YAMAMOTO, Goh)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40710463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：デヒドロエピアンドロステロンサルフェート(DHEAS)は神経ステロイドの一種であり、脊髄後角において痛覚過敏作用があることは知られているが、その作用機序は明らかでない。我々はラットの脊髄標本を用いて、脊髄後角における神経ステロイドDHEASの痛覚伝達路への作用を電気生理学的手法を用いて検討した。その結果、DHEASは脊髄後角第Ⅱ層の痛覚伝達路において、興奮性シナプス伝達を増強し、抑制性シナプス伝達を抑制することが分かった。

研究成果の概要(英文)：Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) is a kind of neurosteroids and is known to have pronociceptive effects on the spinal cord. However, its underlying mechanisms has not been elucidated. We investigated the effect of DHEAS on excitatory synaptic transmission in the dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord using electrophysiological technique. We demonstrated that DHEAS enhanced excitatory transmission and suppressed inhibitory transmission in spinal lamina II neurons, resulting in showing pronociceptive effects on the spinal cord.

研究分野：医歯薬学 麻酔 ペインクリニック

キーワード：神経ステロイド デヒドロエピアンドロステロンサルフェート 脊髄後角 シグマ1受容体 痛覚過敏

1. 研究開始当初の背景

性ステロイド合成の中間産物である神経ステロイドが、中枢神経系の機能制御に関与していることが以前から明らかになっている。例えばデヒドロエピアンドロステロン (DHEA) は高齢者で減少することから、記憶学習への関与が示唆されている。一方、神経ステロイド合成酵素は脊髄後角にも存在しているため、神経ステロイドは脊髄レベルでの疼痛コントロールに関与している可能性がある。実際に、神経ステロイドのひとつである DHEA 硫酸塩 (DHEAS) をマウス脊髄クモ膜下に投与すると、急性期には機械的刺激、熱刺激に対する痛覚過敏を生じると報告されている。一方、神経ステロイドはシグマ受容体の内因性リガンドと考えられている。脊髄クモ膜下に DHEAS を投与したマウスでは脊髄後角第 7 層で NMDA 受容体が活性化し、その作用はシグマ 1 受容体アンタゴニストで拮抗されることから、脊髄のシグマ 1 受容体の活性化は鎮痛ではなく疼痛促進に関与すると考えられている。しかし、脊髄後角における神経ステロイドの痛覚伝達に及ぼす作用を、電気生理学的に検討した報告はない。脊髄後角における痛覚伝達メカニズムは未だ解明すべき点が多く、創薬標的としても重要である。

2. 研究の目的

神経ステロイドの脊髄後角ニューロンに及ぼす作用の詳細なメカニズム、特にシグマ 1 受容体との関係についてあきらかにするため、以下の点について検討した。

(1) DHEAS の脊髄クモ膜下投与によって惹起される疼痛行動を、機械的刺激に対する疼痛閾値により検討した。

(2) 脊髄後角ニューロンにおける興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current : EPSC) 及び抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current : IPSC)、AMPA や NMDA などの伝達物質投与で誘起される電流に対する DHEAS の修飾作用を検討した。

(3) 神経ステロイドの作用は細胞膜に存在するどの受容体やイオンチャネルを介しているのか、特にシグマ 1 受容体との関連を検討するため、シグマ 1 受容体拮抗薬の灌流投与による EPSC への修飾について検討した。

3. 研究の方法

Wistar 系成熟雄性ラット (週齢 6~8 週) を用い実験を行った。

(1) 行動学的実験

ラット脊髄クモ膜下腔にカテーテルを留置し、カテーテルより DHEAS (3、10、30 $\mu\text{g}/\text{body}$) または vehicle 群として DHEAS の溶媒である 20% Dimethyl sulfoxide in

saline を脊髄クモ膜下投与した。各群 4 匹ずつ投与し、von Frey フィラメントの機械的刺激 (1、1.4、2、4、6、8、10、15、26、60 g) に対する疼痛反応閾値を投与前、投与後 5 分、15 分、30 分、60 分、120 分の各時点で計測した。von Frey テストは左後肢に対し各フィラメントで 8 回刺激し、2 回以上反応を認めたものを陽性とした。結果は平均 \pm 標準偏差で表した。Student の t 検定で統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

(2) 電気生理学的実験

ラットより脊髄横断スライスを作成した。このスライス標本を記録用チェンバーに移して、34~36 に加温したクレブス液で灌流した (15 mL/min)。クレブス液の組成 (mM) は、NaCl 117, KCl 3.6, CaCl_2 2.5, MgCl_2 1.2, NaH_2PO_4 1.2, NaHCO_3 25, D-glucose 11.5 とした。

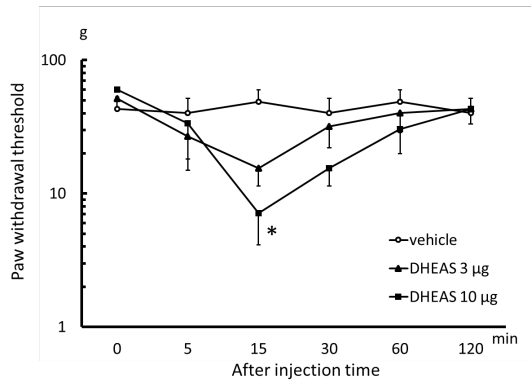
脊髄横断スライスの下部からの透過光で観察される後角第 7 層の膠様質は、明るい部位として容易に視認できた。その膠様質ニューロンから先端電極抵抗約 10 M のガラス微小電極を用いて、実体顕微鏡下にブラインドホールセルパッチクランプ記録を行った。ガラス微小電極内液の組成 (mM) は、Cs-sulfate 110, CaCl_2 0.5, MgCl_2 2, EGTA 5, HEPES 5, TEA 5, ATP-Mg 5 とした。

薬液の灌流はクレブス液と同ラインを用い、クレブス液に溶解して投与した。保持電位は興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current : EPSC) 観察時は -70 mV、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current : IPSC) 観察時は 0 mV とした。得られた電流は、Axopatch 200B (Molecular Devices、米国) により増幅、Digidata 1322A (Molecular Devices、米国) により A/D 変換しコンピュータに記録後、pCLAMP10.3 (Molecular Devices、米国) および Minianalysis 6.0 (Synaptosoft、米国) を用いて解析した。結果は平均 \pm 標準偏差で表した。Student の t 検定で統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

4. 研究成果

(1) 行動学的実験

von Frey フィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値は、薬剤投与前には各群において有意な差を認めなかった。脊髄クモ膜下投与 15 分後に DHEAS 3 μg 群 (15.5 ± 8.2 g, $p < 0.05$) および 10 μg 群 (7.1 ± 5.9 g, $p < 0.05$) は vehicle 群 (48.8 ± 22.5 g) と比較して有意に低下し、投与後 120 分で投与前と同じ閾値に戻った。DHEAS 30 μg 群では興奮して飛び跳ねる、後肢や尾を噛むといった異常行動が出現したため von Frey テストは行えなかった。

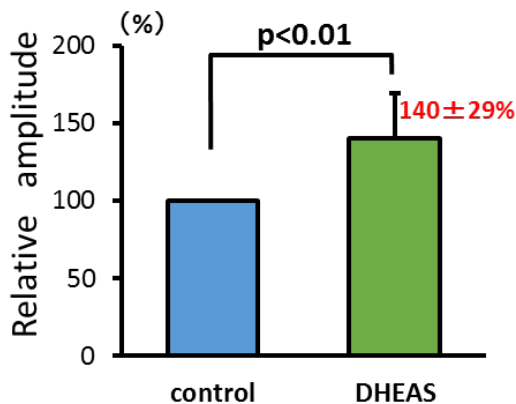
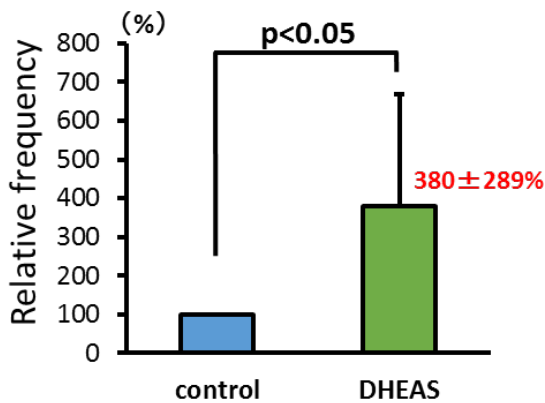
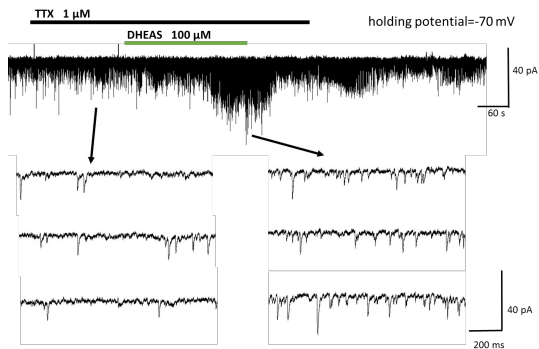


(2)電気生理学的実験

DHEAS の灌流濃度は行動学的実験の結果より 100 μM とした。

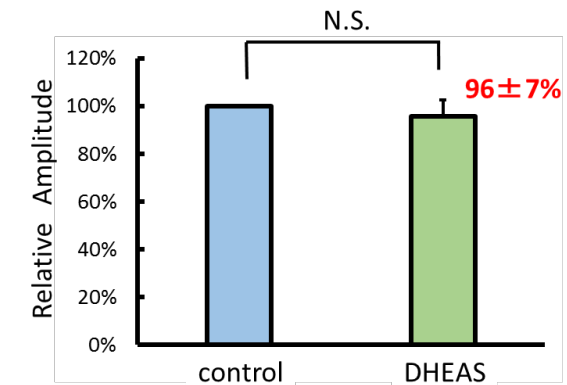
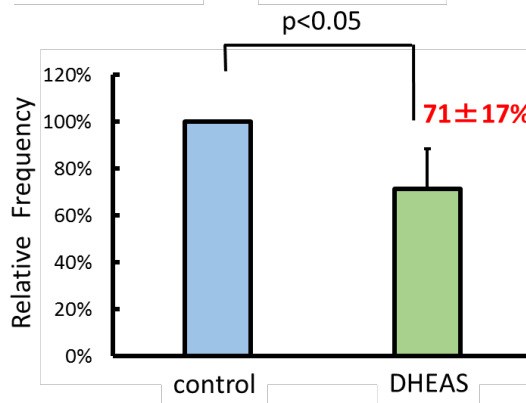
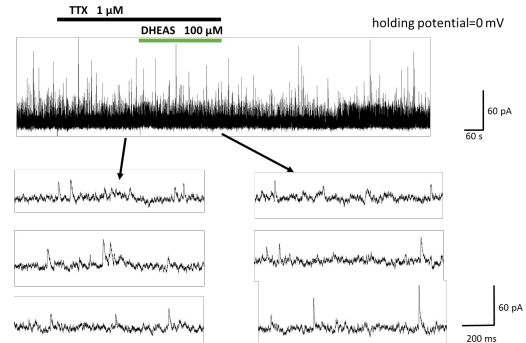
DHEAS の miniature-EPSC (m-EPSC) に対する作用

電位依存性ナトリウムチャンネル阻害薬である TTX(1 μM)存在下において、DHEAS(100 μM)の灌流投与により、m-EPSC の頻度は有意に増加(対照比 380 ± 289%, p<0.05)し、振幅は有意に増大(対照比 140 ± 29%, p<0.01)した。



DHEAS の miniature-IPSC (m-IPSC) に対する作用

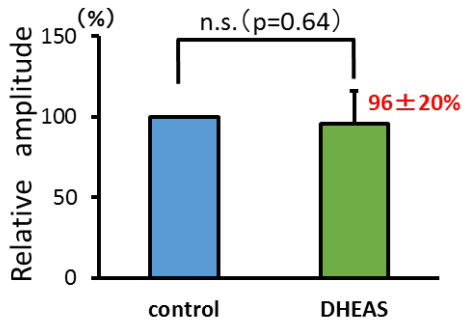
DHEAS (100 μM) の灌流投与により、m-IPSC の頻度は有意に減少(対照比 71 ± 17%, p<0.05)したが、振幅には有意な変化はなかった(対照比 96 ± 7%, n.s.)



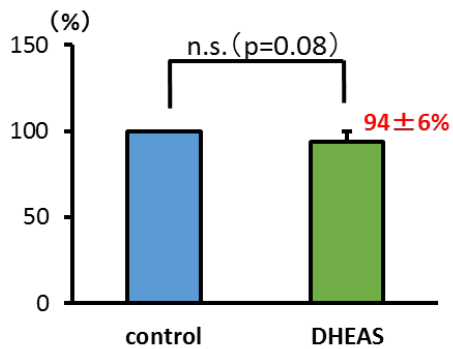
DHEAS の後根への電気刺激による evoked-EPSC に対する作用

後根への電気刺激による興奮性シナプス後電流の最大振幅は、DHEAS を灌流投与しても C 線維刺激 (97 ± 6%, p = 0.97) および A 線維刺激 (96 ± 20%, p = 0.97) とともに増大しなかった。

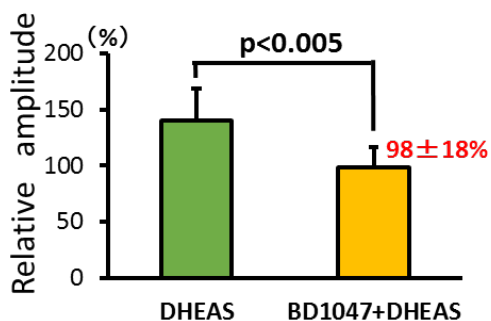
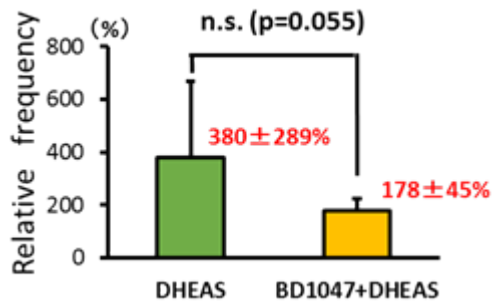
● Aδ-fiber stimulation



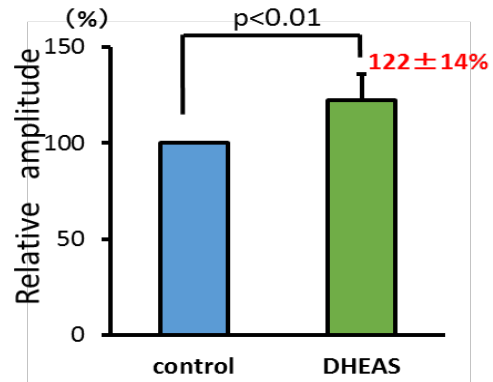
● C-fiber stimulation



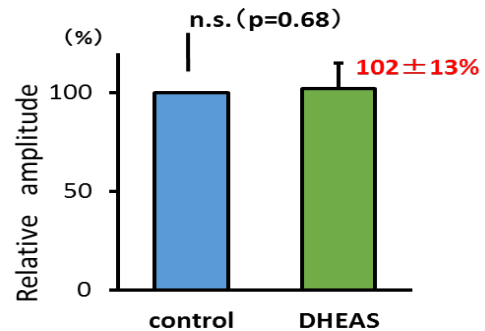
シグマ 1 受容体アンタゴニスト (BD1047) 同時灌流投与時の DHEAS の m-EPSC に対する作用
 BD1047 (シグマ 1 受容体拮抗薬) の先行灌流投与により DHEAS による m-EPSC の振幅増大は有意に拮抗され (control : 140 ± 29% vs. BD1047 : 98 ± 6%, $p < 0.005$)、頻度増加は拮抗される傾向があった (control : 380 ± 289% vs. BD1047 : 178 ± 45%, $p = 0.055$)、



DHEAS の NMDA 灌流投与による内向き電流に対する作用
 NMDA の灌流投与による内向き電流の振幅は DHEAS の先行灌流投与により有意に増大した (122 ± 14%, $p < 0.01$)、

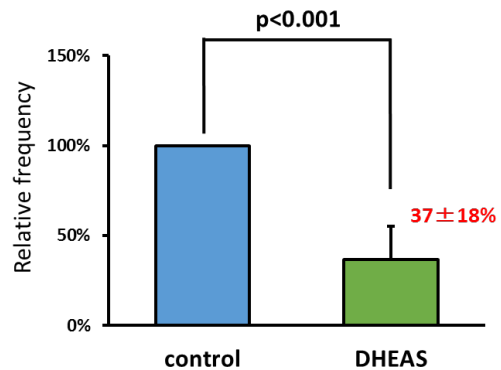


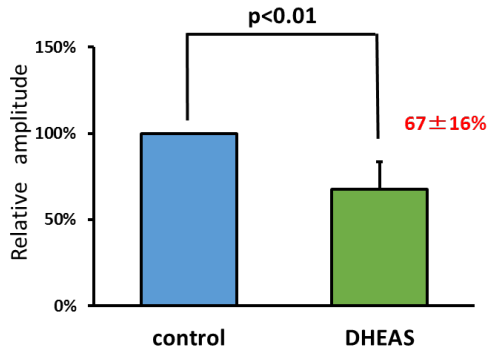
DHEAS の AMPA 灌流投与による内向き電流に対する作用
 AMPA の灌流投与による内向き電流の振幅は DHEAS の先行灌流投与による有意な変化はなかった (102 ± 13%, $p = 0.68$)



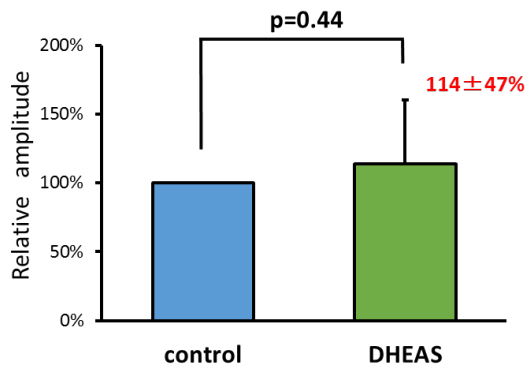
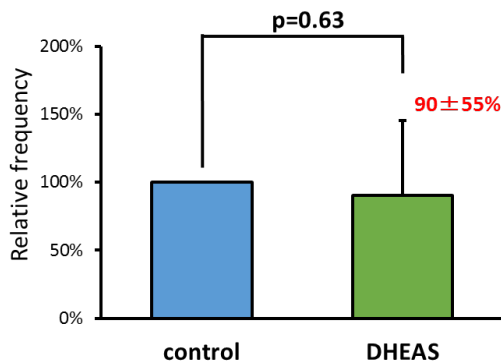
ストリキニン (グリシン受容体アンタゴニスト) 同時灌流投与時の DHEAS による m-IPSC への作用

ストリキニン存在下では、DHEAS の灌流投与により m-IPSC の頻度 (37 ± 18%, $p < 0.001$) と振幅 (67 ± 16%, $p < 0.01$) は共に有意に減少した。





ビククリン (GABAA 受容体アンタゴニスト) 同時灌流投与時の DHEAS による m-IPSC への作用
 ビククリン存在下では DHEAS を灌流投与しても、m-IPSC の頻度 ($90 \pm 55\%$, $p=0.63$) と振幅 ($114 \pm 47\%$, $p=0.44$) は共に変化はなかった。



これらの結果から、神経ステロイド DHEAS は脊髄後角の痛覚伝達路において、興奮性シナプス伝達を増強し、抑制性シナプス伝達を抑制することが分かった。興奮性シナプス伝達への作用は、興奮性ニューロンのシナプス前においてはシグマ 1 受容体、シナプス後においてはシグマ 1 受容体と NMDA 受容体を介していると考えられた。抑制性シナプス伝達への作用は GABAA 受容体を介していると考えられた。

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 1 件)

山本豪, 生駒美穂, 佐々木美佳, 大橋宣子, 倉部美起, 古谷健太, 紙谷義孝, 馬場洋, 河野達郎. 硫酸デヒドロエピアンドロステロンの脊髄後角における痛覚伝達への作用. 脊髄機能診断学 35;58-64, 2014 (査読あり)

〔学会発表〕(計 2 件)

山本豪, 生駒美穂, 紙谷義孝, 馬場洋, 河野達郎. 神経ステロイド DHEAS はラット脊髄後角においてシグマ 1 受容体と NMDA 受容体を介して痛覚増強作用を発揮する. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会. 2015 年 5 月 29 日. 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

山本豪, 佐々木美佳, 生駒美穂, 紙谷義孝, 馬場洋, 河野達郎. 神経ステロイド DHEAS はラット脊髄後角ニューロンのシナプス伝達を修飾し痛覚伝達を増強する. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会. 2014 年 5 月 15 日. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 豪 (YAMAMOTO Goh)

新潟大学医歯学総合病院・医員

研究者番号: 40710463

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者