

原 著

慢性疼痛発症に伴う脊髄後角表層NMDA受容体の 性質の変化

獨協医科大学 麻酔科学

岩田 英明

要 旨 末梢からの疼痛情報の入り口である脊髄後角の表層において、N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体が慢性疼痛発症に強く関与していることが示されている。今回、脊髄スライス標本を使用し、興奮性シナプス後電流 (EPSC) をパッチクランプ記録し、慢性疼痛発症に伴う EPSC の性質の変化を調べた。さらに、パッチクランプ記録後に細胞を採取し、逆転写-遺伝子増幅法 (単一細胞 RT-PCR 法) によって後角細胞に発現する NMDA 受容体サブユニットの変化を検討した。慢性疼痛の発症に伴って、NMDA 受容体を介する EPSC の振幅の増大と、減衰時間の延長が見られた。それに付随して、NMDA 受容体サブユニット NR2A の発現減少と NR2B の発現増加が観察された。脊髄後角表層における NMDA 受容体を介するシナプス伝達の増強と NMDA 受容体サブユニットの発現の変化が、末梢神経損傷に伴う慢性疼痛の発症機序の一つであることが考えられる。慢性疼痛モデルマウスの脊髄後角表層における NMDA 受容体の生理学的、薬理的性質を検討することは、慢性疼痛の新しい治療薬の開発に貢献すると考えられる。

Key Words : NMDA 受容体, 坐骨神経部分損傷モデル, 脊髄後角表層, パッチクランプ法, 単一細胞 RT-PCR 法

緒 言

脊髄後角表層には侵害受容性の第一次求心性線維が終止し、侵害情報のシナプス伝達とその調節が行われている。一方、臨床において、アロディニアや痛覚過敏、そしてワインドアップ現象様疼痛などを伴う難治性のニューロパシックペインの治療に NMDA 受容体拮抗薬が使用されている。つまり、これらの発症に NMDA 受容体が深く関与していると考えられており、多くの研究が報告されている¹⁾。

今回の研究では、坐骨神経部分損傷モデル (Seltzer 法) を用いて慢性疼痛モデルを作成し、脊髄スライスを作成した。そして、脊髄後角表層における NMDA 受容体を有するニューロンをパッチクランプ記録にて電気生理学的性質を調べた後、その細胞を採取し、含まれる mRNA を逆転写-遺伝子増幅法 (単一細胞 RT-PCR 法²⁾) によ

り分析して、NMDA 受容体のサブユニットを同定しその性質を検討した。

方 法

坐骨神経部分損傷モデル作製

実験には生後7~9週の成熟雄マウスを用いた。Seltzer 法により作製したマウス (操作群) に、von Frey test を作製2日前から作製後10日間行い、疼痛閾値の変化を確認した。

脊髄スライス標本の作製

慢性疼痛モデルマウスの腹腔内にペントバルビタールナトリウム (5 mg/kg) を注入し、麻酔をかけた後、椎弓切除を行い、脊椎腰部膨大部を摘出した。マイクロライサー (堂阪 EM, DTK-1000) によって厚さ約 350 μm のスライスを作製した³⁾。

パッチクランプ記録とニューロンの採取

ステージ固定式の成立顕微鏡 (Carl Zeiss Axioskop-FS) のステージ上の記録槽に脊髄スライス標本を移し、近赤外線微分干渉装置によって、脊髄後角表層 (Rexed

平成17年10月20日受付, 平成17年11月30日受理
別刷請求先: 岩田英明

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林880
獨協医科大学 麻酔科学

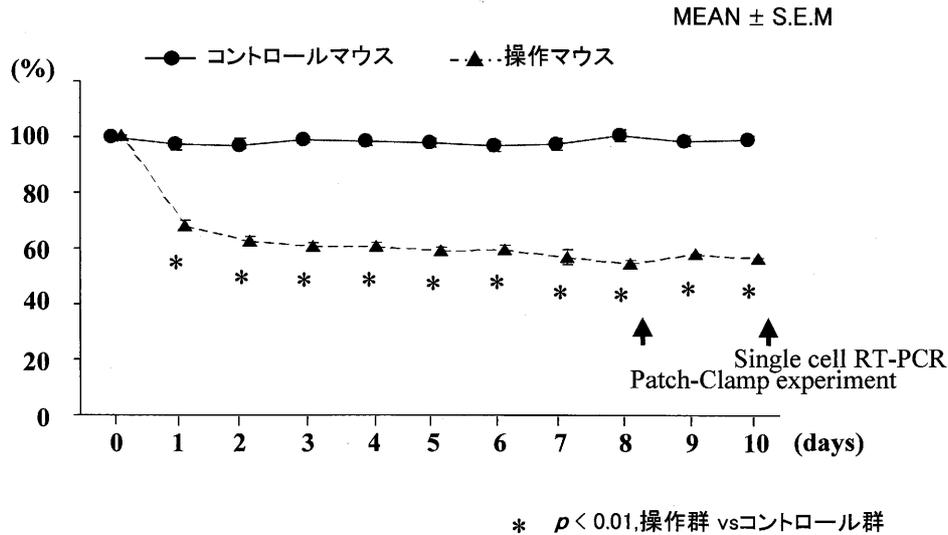


図1 von Fray testの結果

コントロール群の結果を100%とした時の操作群の推移であり、有意に操作群において疼痛閾値が低下していた。

第II～III層)に分布するニューロンを直視した。

パッチクランプ記録用のガラス管電極を記録するニューロンの細胞膜に密着させ、ギガシールドを形成した。さらにガラス管電極に陰圧を掛けることによりパッチ膜を破り、ホールセル記録の状態を得た。膜電位固定下にニューロンの電気生理学的、薬理学的性質を調べた後、2 μ lのリン酸緩衝液(PBS)を入れた先端直径約5 μ mのガラス管ピペットを記録しているニューロンに近づけて、陰圧によってピペット内に吸引、採取した。

記録槽は、クレブス液(組成: NaCl, 113 mM; KCl, 3 mM; NaHCO₃, 25 mM; NaH₂PO₄, 1 mM; CaCl₂, 2 mM; MgCl₂, 1 mM; D-glucose, 11 mM)によって灌流した。パッチクランプ記録には、KCl, 140 mM; MgCl₂, 3 mM; EGTA, 5 mM; HEPES, 10 mMの組成の内液を充填した、抵抗4～10 M Ω のガラス管電極を用いた。また刺激電極には、1 MのNaClを充填した。

記録は全て、膜電位を-70 mVに固定した状態でnon-NMDA受容体の誘発性興奮性シナプス後電流(eEPSCs)を確認した後、ピククリン(10 μ M)およびストリキニン(2 μ M)によって、 γ -aminobutyric acid (GABA)_A受容体及びグリシン受容体を遮断し、膜電位を+50～+70 mVに固定し、eEPSCsを記録した²⁾。さらに、膜電位を+50～+70 mVにて、6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX, 5 μ M)を用い、non-NMDA受容体も遮断することにより、NMDA受容体を介する成分を分離し、NMDA受容体のeEPSCsを記録した。

記録はAxoscope9.2で行い、Mini Analysis Pro-

gram6.0にて解析を行った。両群間の比較はMann-Whitney U-testを用い、また群間内の比較は繰り返しのある2元配置分散分析を用い、 $P < 0.05$ を有意とした。

Single-cell RT-PCR

記録した細胞を他方よりガラス管ピペットを近づけ直視下に吸引し、採取した。採取した細胞は直ちにRNase inhibitor (Takara)を含むRT buffer溶液(5 μ M)内に入れ、-80℃に保存した。翌日、oligo (dT) primerを用いて1st strand cDNAの合成を行った。反応は、Superscript Preamplification Kit (Gibco BRL)のプロトコールに従った。その後、Ex-Taq (Takara)を用い、nestedプライマーによる1st及び2nd PCR反応を行った。

NMDA受容体のサブユニットであるNR2A, NR2BのmRNA発現を検討した。また、個々のニューロンにおけるRT-PCR反応の検証を行うため、全てのニューロンに普遍的に発現していると考えられるNeuron Specific Enolase (NSE)をコントロールとして用いた。

結 果

慢性疼痛モデル

坐骨神経部分損傷マウス32例とコントロールマウス13例のvon Fray testの結果を比較した。手術操作する前の記録結果を100%とし、操作後10日間に渡り記録を行った。操作群の疼痛閾値がコントロール群に比べ有意に低下していた(図1)。

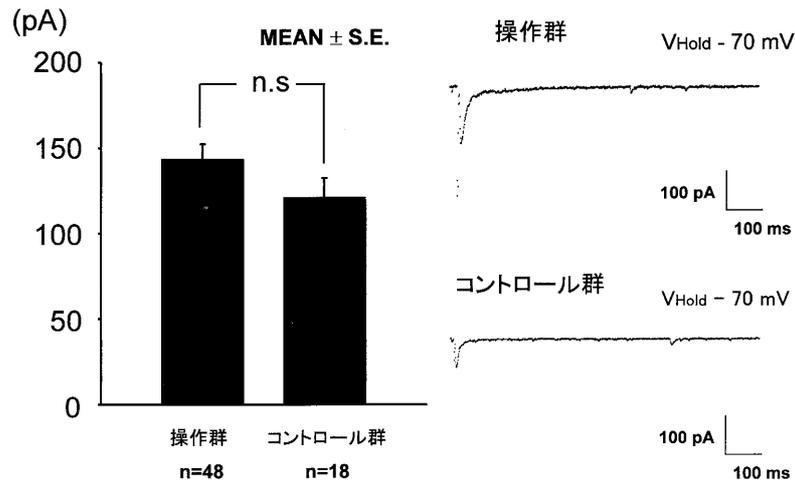


図2 non-NMDA受容体におけるeEPSCsの振幅比較
操作群 (n = 48) の振幅は 143.58 ± 9.00 pAであり, コントロール群 (n = 18) の振幅は 121.17 ± 11.58 pAであり, 有意差を認めなかった. また, グラフに隣接して実際に記録した波形を示す.

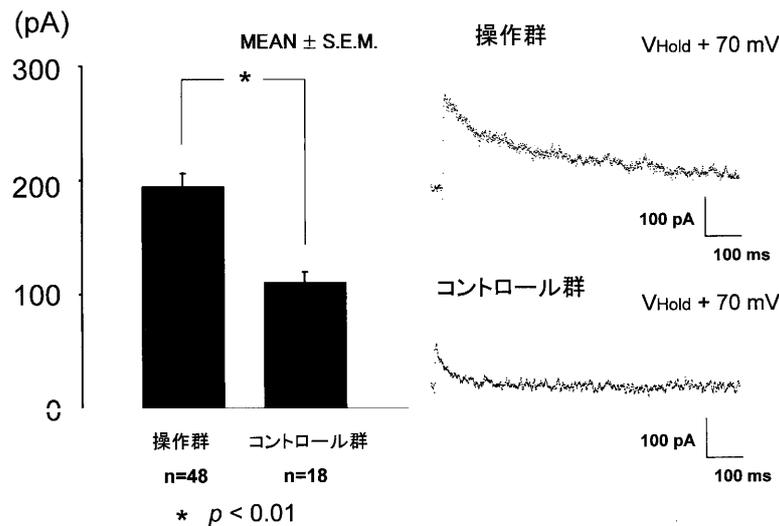


図3 NMDA受容体におけるeEPSCsの振幅比較
操作群 (n = 48) の振幅は 193.98 ± 11.82 pAであり, コントロール群 (n = 18) の振幅は 109.39 ± 10.63 pAであり, 有意差 ($p < 0.01$) を認めた. また, グラフに隣接して実際に記録した波形を示す

脊髄後角表層のパッチクランプ記録

膜電位を -70 mV に固定した状態における non-NMDA 受容体及び, $+70$ mV に固定した状態における NMDA 受容体の eEPSCs の振幅を, コントロール群 18 例と操作群 48 例にて比較検討した.

膜電位を -70 mV 及び $+70$ mV に固定した両操作において, -70 mV に固定した操作においては両群に有意差は認められず (図2), $+70$ mV に固定した操作におい

ては, 操作群の振幅がコントロール群に比較して有意に増大していた (図3).

膜電位を $+50 \sim 70$ mV に固定した状態で記録した eEPSCs の減弱過程に当て嵌めた指数関数の時定数 (τ_1 及び τ_2) を比較検討した結果, コントロール群に比べ操作群で減衰時間が有意に延長した (図4, 図5).

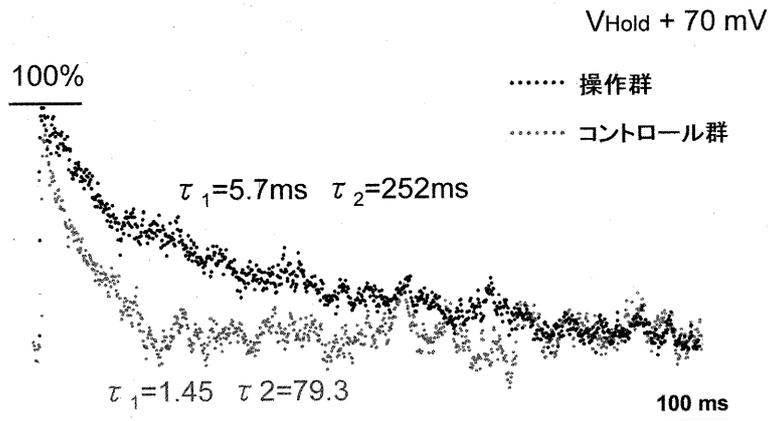


図4 NMDA受容体におけるeEPSCsの波形
操作群とコントロール群の記録波形を重ねてみても、グラフ中央付近まではっきりと別れている。
ゆっくりと下降する波形が操作群による波形であり、急な下降を示すのがコントロール群の波形である。

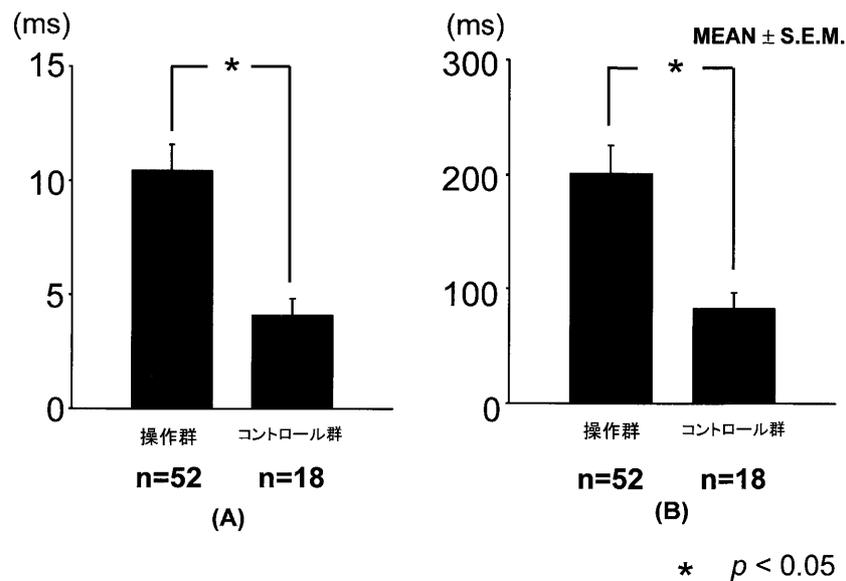


図5 時定数 (τ_1 と τ_2)での比較形
(A)(B)ともに操作群 (n = 52)とコントロール群 (n = 18)を比較した。
(A) τ_1 の比較では、操作群 10.40 ± 1.20 、コントロール群 4.11 ± 0.67 であり、両者間に有意差 ($p < 0.05$)を認めた。
(B) τ_2 の比較では、操作群 200.85 ± 24.17 、コントロール群 82.20 ± 14.91 であり、両者間に有意差 ($p < 0.05$)を認めた。

単一細胞RT-PCRによる検討

操作群の脊髄後角表層における、NR2Bを発現しているニューロンの頻度がコントロール群と比べ、有意に増加発現していた。(図6, 表1)また、コントロール群に比較して、NR2Aの発現しているニューロン細胞数を減少させた(図7)。

考 察

NMDA型グルタミン酸受容体

NMDA型グルタミン酸受容体はグルタミン酸受容体のsubtypeの1つであり、その機能からionotropic受容体とmetabotropic受容体に大別されている。metabo-

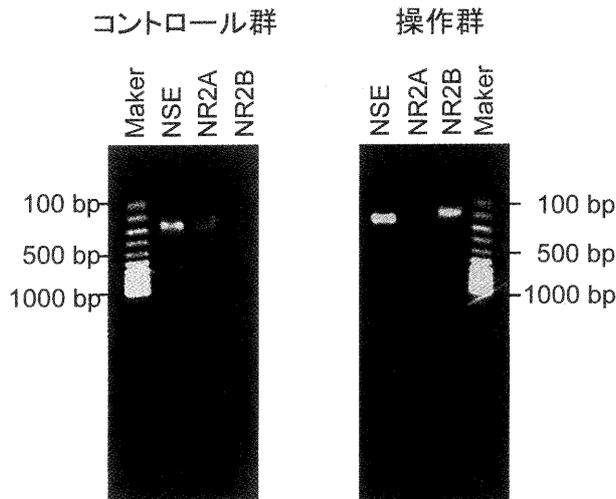


図6 単一細胞RT-PCRの電気泳動
コントロール群、操作群共に神経細胞である指標のNSEが認められた。コントロール群で、NR2Aが、操作群でNR2Bが認められた。

表1 単一細胞RT-PCRにおける、NR2AとNR2B発現比較

NR2A	expression		total	$p < 0.05$
	(+)	(-)		
コントロール群	13	8	21	
操作群	10	17	27	
NR2B	expression		total	$p < 0.01$
	(+)	(-)		
コントロール群	6	15	21	
操作群	21	6	27	

コントロール群：n = 21の内NR2Aが13, NR2Bが6認められた。

操作群：n = 27の内NR2Aが10, NR2Bが21認められた。両者を比較したところ、NR2Aにおいては $p < 0.05$ であり、NR2Bにおいては $p < 0.01$ であり、有意差を認めた。

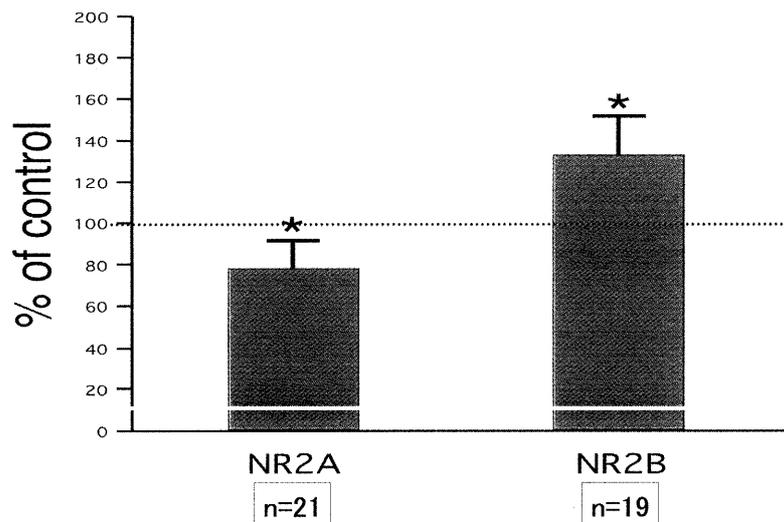


図7 単一細胞RT-PCRによるNR2A, NR2Bの分析
コントロール群のNMDA受容体サブユニットそれぞれの発現率を100%とし、操作群での発現率と比較した。操作群においてNR2Aの発現量が減少し、NR2Bの発現量が増加したと考えられる。

tropic受容体は、G蛋白を介してその作用を発現する。ionotropic受容体は、イオンチャネルとして機能し、薬理的にNMDA受容体とnon-NMDA受容体（AMPA受容体とKainate受容体）に大別される⁴⁾。NMDA受容体は静止電位付近ではマグネシウムイオンによる障害が働きイオンチャネルは開放されないが、脱分極によってこのブロックが解除されカルシウムイオンが流入する。NMDA受容体は、2つのサブユニットからなり、全てに共通でNMDA受容体の機能を持つNMDAR1とそれに

結合して機能を強化し、また分化させる4種類のNMDAR2A～2Dのサブユニットがある^{5, 6)}。NR2は、神経系内の部位あるいは生後発達の時期によって、NR2AからNR2Dまでの異なったサブユニットが発現する。生後早い段階では、多くのシナプスのNMDA受容体はNR1とNR2Bから構成されている。このサブユニットの構成は非常に長いシナプス応答を生じさせる。その後、発育の数週間以内にNR2BサブユニットはNR2A（NR2Cにも）に置き換わり、短いシナプス電流

を示す様になる。どのサブユニットの組み合わせによって構成されているかによりNMDA受容体は異なった生理学的、薬理的性質を示す。また、脊髄内におけるNMDA受容体サブユニットの分布における多くの報告がある。NR2Aは脊髄前角から後角にわたって広く分布し、NR2Bは、脊髄後角表層に高密度に分布する事が報告されている。今回サンプリングした脊髄後角表層には、エンケファリンやGABAを含む抑制性ニューロンや、グルタミン酸を含む興奮性ニューロンが分布している。また、10 μ m前後の小型のstalk cellやislet cellが分布していることが知られている^{7~12}。それらをランダムにサンプリングした。なを、NMDA受容体を発現している神経細胞がどのような伝達物質を発現しているかは、検討していない。

脊髄後角表層のNMDA受容体は神経損傷あるいは炎症に伴う痛覚過敏の発症に関与していると考えられている。WillisやW.D.等によれば、脊髄後角表層の神経の一部は上行性の神経線維を脊髄上部へ投射し、痛覚の伝達に関与している。よって、今回検討したNMDA受容体は疼痛伝達に関与している^{13~15}。臨床の現場においても、難治性のニューロパシックペインの治療にケタミン^{16, 17}、デキストロメトルファン¹⁸、そしてメマンチン¹⁹のようなNMDA受容体拮抗薬の有効性が報告されている。ニューロパシックペインを発現するニューロンの現象については既に報告されているが、シナプス後膜に発現しているNMDA受容体サブユニットに着目して研究したのは、我々がはじめてである。

そこで、脊髄後角表層においてパッチクランプ記録法を用い、坐骨神経部分損傷マウスとコントロールマウスのNMDA受容体のeEPSCsを比較したところ、振幅、減衰過程の時間経過が坐骨神経部分損傷マウスにおいて有意に振幅が増大し、減衰時間が延長した。また、坐骨神経部分損傷マウスの脊髄後角表層には生後7週以上経過しているマウスであるが、NR2Aの発現がコントロールマウスに比較し有意に発減少し、NR2Bが有意に発現増加していることが確認された。

NR2Aはシナプス電流を短くする事が知られている。そのNR2Aが減少したことは、今回我々が観察したeEPSCsの減衰時間の延長に関与していることが想像される。そして、NR2Bを介するシナプス後電流は、その減衰時間が長いことが知られている。また、NMDA受容体はCaの透過性を示す事が知られている。末梢神経損傷で、NR2Bの増加は脊髄後角表層における痛覚情報のシナプス伝達の強化につながると想像される。また、NR2Bの発現の増強に伴ってCaイオンの流入が増大し、PKC等の細胞内セカンドメッセンジャーを介する変化

が生じて疼痛情報のシナプス伝達が強化される事が想像される。末梢神経損傷後、痛覚過敏はPKC拮抗薬やNR2B拮抗薬で減弱される事が報告されている。

NMDA受容体は海馬の得にCA1領域に高密度に発現し、海馬における長期増強(LTP)の発現に関与していることが良く知られている^{5, 6}。LTPは、記憶・学習の細胞レベルでの機序として注目されている^{5, 6}。脊髄後角においても、海馬に見られるLTPと類似した長期にわたるシナプス伝達の増強が報告され²⁰、脊髄後角における疼痛情報処理に中枢神経系における記憶と類似の現象が見られることは興味深いと思われる。今回の実験で観察されたNMDA受容体サブユニットの発現の変化が、脊髄後角におけるシナプス伝達の長期増強にどのように関連しているかは、今後解明すべき課題であろう。

この実験においてNMDA受容体の変化が痛覚過敏やアロディニアと言われる現象に関与していることを示唆する。つまり、慢性疼痛にこのNR2B発現が関与する事が示唆される。しかしながら、エンケファリンやGABA、グルタミン酸などを含む神経細胞が、どのNMDA受容体のサブユニットを発言しているかは、今現在明らかにされておらず、それを探究することは、今後の研究課題である。

結 語

慢性疼痛モデルマウスを作成し、その脊髄後角表層ニューロンに単一細胞RT-PCR法を適用し、パッチクランプ記録を行った後、記録したニューロンのNMDA受容体サブユニットの発現を確認する方法を確立した。

この方法によって、慢性疼痛モデルマウスの脊髄後角表層におけるNMDA受容体及びnon-NMDA受容体が電気生理学的に変化し、NMDA受容体のサブユニットの発現に変化が生じる事を明らかにした。脊髄後角表層におけるNMDA受容体の生理学的、薬理的性質を検討することによって、慢性疼痛の新しい治療薬の開発に貢献されると考えられる。

謝 辞 稿を終えるにあたり、本研究に対し終始ご指導ご高関を賜りました生理学教室堀教授、麻酔学教室北島教授に深甚なる感謝の意を表します。また、ご協力頂きました生理学教室員、麻酔学教室員の皆様に深謝いたします。

参考文献

- 1) Sindrup SH, Troels S, Jensen : Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain : an update and effect related to mechanism of drug action. Pain, **83** :

- 389-400, 1999.
- 2) Tsuchiya M, Yamazaki H, Hori Y. : Enkephalinergic neurons express 5-HT₃ receptors in the spinal cord dorsal horn : single cell RT-PCR analysis. *Neuroreport*, **10** : 2749-2753, 1999.
 - 3) Hori Y, Endo K and Takahashi T. : Presynaptic inhibitory action of enkephalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of rat spinal cord. *J Physiol*, **450** : 673-685, 1992.
 - 4) Krosgaard-larsen P, Ebert B, Norskov T, et al. : Excitatory Amino Acid Agonists, Partial Agonists, Antagonists and Modulators : Design and Therapeutic Prospects. Wheal H, Thomson A, Excitatory amino acids and synaptic transmission 2nd ed, San Diego, ACADEMIC PRESS, 41-59, 1995.
 - 5) 小澤 滯司 : NMDA レセプター. *臨床麻酔*, **18** : 1697-1707, 1994.
 - 6) Dingledine R, Borges K, Bowie D, et al. : The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol Rev*, **51** : 7-61, 1999.
 - 7) Watanabe M, Mishina M and Inoue Y. : Distinct spatiotemporal distributions of the N-methyl-D-aspartate receptor channel subunit mRNAs in the mouse cervical cord. *J Comp Neurol*, **345** : 314-319, 1994.
 - 8) Gonzalez DL, Fuchs JL and Droge MH. : Distribution of NMDA receptor binding in developing mouse spinal cord. *Neurosci Lett*, **151** : 134-137, 1993.
 - 9) Chinnery RM, Shaw PJ, Ince PG, et al. : Autoradiographic distribution of binding sites for the non-NMDA receptor antagonist [³H] CNQX in human motor cortex, brainstem and spinal cord. *Brain Res*, **630** : 75-81, 1993.
 - 10) Shaw PJ, Ince PG, Johnson M, et al. : The quantitative autoradiographic distribution of [³H] MK-801 binding sites in the normal human spinal cord. *Brain Res*, **539** : 16416-16418, 1991.
 - 11) Luque JM, Bleuel Z, Malherbe P, et al. : Alternatively spliced isoforms of the N-methyl-D-aspartate receptor subunit I are differentially distributed within the rat spinal cord. *Neurosci*, **63** : 629-635, 1994.
 - 12) Yung KKL : Localization of glutamate receptors in dorsal horn of rat spinal cord. *Neuroreport*, **9** : 1639-1644, 1998.
 - 13) Minami T, Okuda-Ashitaka E, Hori Y, et al. : Involvement of primary afferent C-fibers in touch-evoked pain (allodynia) induced by prostaglandin E₂. *Eur J Neurosci*, **11** : 1849-1856, 1999.
 - 14) Garry MG, Sundeep M, Yu J, et al. : Knock down of spinal NMDA receptor reduces NMDA and formalin evoked behaviors in rat. *Neuroreport*, **11** : 49-55, 2000.
 - 15) Ossipov MH, Lai J, Malan TP Jr, et al. : Spinal and supraspinal mechanisms of neuropathic pain. *Annals NY Acad Sci*, **909** : 12-24, 2000.
 - 16) Eide PK, Ellen J, Stubhaug A, et al. : Relief of post-herpetic neuralgia with the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine : a double-blind crossover comparison with morphine and placebo. *Pain*, **58** : 347-354, 1994.
 - 17) Eide PK, Stubhaug A, Ivar O, et al. : Continuous subcutaneous administration of the N-methyl-D-aspartic acid receptor antagonist ketamine in the treatment of post-herpetic neuralgia. *Pain*, **61** : 221-228, 1995.
 - 18) Nelson KA, Park KM, Robinovitz E, et al. : High-dose oral dextromethorphan versus placebo in painful diabetic neuropathy and postherpetic neuralgia. *Neurology*, **48** : 1212-1218, 1997.
 - 19) Nikolajsen L, Gottrup H, Troels S, et al. : Memantine (N-methyl-D-aspartate receptor antagonist) in the treatment of neuropathic pain after amputation or surgery : a randomized, double-blinded, cross-over study. *Anesth Analg*, **91** : 960-966, 2000.
 - 20) Randic M, Jiang MC and Cerne R. : Long-term potentiation and long-term depression of primary afferent neurotransmission in the rat spinal cord. *Journal of Neuroscience*, **13** : 5228-5241, 1993.

Alterations in the Properties of NMDA Receptor Channels in the Mouse Spinal Cord Superficial Dorsal Horn Accompany Onset of the Chronic Pain

Hideaki Iwata

*Department of Anesthesiology, Dokkyo University School of Medicine
880 Kitakobayashi, Mibu, Tochigi 321-0293, Japan*

The N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels have been strongly implicated in mechanisms of persistent pain states. I investigated change of EPSC character of mice chronic pain model using patch-clamp recording. And we studied change of NMDA receptor subunits using single-cell RT-PCR after the neurons were picked up by aspiration into another glass pipette. According with onset of the chronic pain, the amplitude of NMDA receptor-mediated eEPSCs in the sciatic-nerve-ligated group was significantly larger than that in the sham group and the decay time of NMDA receptor-mediated eEPSCs in the ligation group was significantly longer than that in the sham group. And

the expression of the NR2B receptors were increased but the expression of the NR2A receptors were decreased. I thought the enhancement of synaptic transmission and onset of the NMDA-receptor subunits change were participated in one of the chronic pain with peripheral nerve injury. The study of NMDA receptor subunits in the spinal cord superficial dorsal horn of the ligated mice will contribute to development of new medicine on the chronic pain.

Key word : NMDA-receptor, partial ligation of the sciatic nerve, the spinal cord superficial dorsal horn, patch clamp, single-cell RT-PCR