

## 【24】

氏 名	まつざわ りえ 松 澤 理 恵
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第641号
学位授与の日付	平成26年3月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (麻酔・疼痛学)
学位論文題目	<b>Presynaptic inhibitory actions of pregabalin on excitatory transmission in superficial dorsal horn of mouse spinal cord : further characterization of presynaptic mechanisms</b> (マウスの脊髄後角表層内の興奮性神経伝達におけるプレガバリンのシナプス前抑制作用：シナプス前機構の特性解明)
論文審査委員	(主査) 教授 奥 田 泰 久 (副査) 教授 下 田 和 孝 教授 松 野 健二郎

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

プレガバリン (pregabalin : PGB) は糖尿病性神経障害や帯状疱疹後神経痛などの神経障害性痛の治療に用いられるracemic 3-isobutyl GABAのS-enantiomerである。PGBは電位依存性Ca<sup>2+</sup>チャネルの $\alpha 2\delta$ -1サブユニットに結合し、この結合によってシナプス前終末へのCa<sup>2+</sup>の流入が抑制され、それに続く神経伝達物質の放出を抑制することで鎮痛効果を発揮する。

#### 【目 的】

本研究の目的は、電気生理学的記録法を用いてPGBのシナプス前抑制作用の分子メカニズムを解明し、脊髄後角表層の興奮性シナプス伝達におけるPGBの作用を明らかにすることである。さらに、syntaxin 1Aノックアウト (KO) マウスを用いて、PGBの興奮性シナプス伝達に対する抑制作用やその機序を解明する手がかりを得ることを試みた。

#### 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得て、その指針に従って行われた。

6 - 8週の雄マウス68匹を対象とし、麻酔下にSeltzer法による坐骨神経部分結紮マウスを作成した。また、脊髄内のCa<sup>2+</sup>チャネル $\alpha 2\delta$ -1サブユニットの発現をノックダウンさせるため、Hyldenらの方法により、 $\alpha 2\delta$ -1サブユニットに対するantisense oligodeoxynucleotides (ODN) の髄腔内投与を行った。さらに、C57BL/6Jを遺伝的背景にもつsyntaxin 1A-KOマウスを用いた同実験も行った。

## 1. 行動学的評価 (von Frey test)

侵害刺激に対するアロディニアの程度を評価するため、von Freyフィラメントを用いて、10回の反復刺激で足を引き込む回数 (逃避行動回数) を記録した。

## 2. 電気生理学的評価

① 脊髄スライスの準備とTight-seal whole-cell recording: 麻酔下にマウスの腰椎仙骨レベルの脊髄を摘出し、リンゲル液の持続灌流下に顕微鏡ステージ上で350-450  $\mu$  mの脊髄横断スライス標本の後角表層 (第II層) ニューロンのTight-seal whole-cell recordingを施行した。

② 電気刺激誘発性興奮性シナプス後電流 (evoked excitatory post-synaptic currents: eEPSCs) と微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory post-synaptic currents: mEPSCs) の測定: ストリキニンとピククリン存在下に、後根流入部位に置いたガラス管微小電極から電気刺激を加えてeEPSCsを記録した。この記録では、Paired pulse ratio (PPR) を観察するために2対刺激を用いた。さらにテトロドトキシンを加えてmEPSCsを記録した。

③ 定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応:  $\alpha 2\delta$ -1サブユニットmRNAの発現において、坐骨神経結紮とantisense ODN髄腔内投与の影響を評価するために坐骨神経結紮と同側の脊髄後角表層をL4-5脊髄スライスから取り出し、リアルタイムPCRを施行し、comparative  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  methodによる比較定量による検討を行った。

### ④ 統計学的分析

結果はすべて平均  $\pm$  標準誤差で示し、統計学的解析はpost hoc多重比較に続いてone-wayもしくはtwo-way ANOVAで行った。さらにStudent's t-testも行い、 $p < 0.05$ を有意とした。

## 【結 果】

### 1. 行動学的評価 (von Frey test)

坐骨神経結紮によってvon Frey testによる逃避行動回数は増加したが、antisense ODNの髄腔内投与後には逃避行動回数が有意に減少した。

### 2. 電気生理学的評価

電気生理学的実験において、100  $\mu$  MのPGBはsham手術マウス群 (対照群) のeEPSCs振幅の可逆的な抑制とPPRの増加を示した。また、PGBはmEPSCsの振幅を変化させずにその頻度のみを有意に減少させた。さらに、PGBは坐骨神経結紮マウス群のeEPSCsの振幅を対照群と比較して有意に抑制した。リアルタイムRT-PCRでは、坐骨神経結紮マウス群で $\alpha 2\delta$ -1サブユニット発現量が有意に増加したが、antisense ODN髄腔内投与を行った坐骨神経結紮マウスでは $\alpha 2\delta$ -1サブユニット発現量が減少していた。さらに、antisense ODN髄腔内投与を行った坐骨神経結紮マウスでは、PGBのeEPSCsの振幅抑制効果が減弱した。syntaxin 1A-KOマウスを用いた実験で、PGBはsham手術+syntaxin1A-KOマウスでPPRの増加とともにeEPSCの振幅を $92.6 \pm 2.9\%$ まで低下させた。一方、sham手術+WTマウスではPGBはeEPSCの振幅を $83.1 \pm 5.0\%$ まで低下させ、PGBのeEPSC振幅抑制作用はこの2群間で有意差が認められた。

## 【考 察】

今回観察されたPPRの増加を伴うeEPSC振幅の低下は、以前より提唱されていたガバペンチンやPGBなどのガバペンチノイドのシナプス前性での作用と矛盾しないものであった。本実験において、PGBのシナプス前抑制作用は、antisense ODNの髄腔内投与を行う、若しくは行わないsham手術マウスと坐骨神経結紮マウスの間で比較検討されたが、PGBの作用は、 $\alpha 2\delta$ -1サブユニットが最も多く発現していた坐骨神経結紮マウスで最も顕著であった。また、antisense ODNの髄腔内投与は $\alpha 2\delta$ -1サブユニット発現量を減少させることでアロディニアを減弱させたために、PGBのシナプス前抑制作用を減少させたと考えられた。これらの結果は、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの $\alpha 2\delta$ -1サブユニットのリガンドとして状態依存性に作用することを示す根拠と考えられた。

一方で、mEPSCsの発生は脊髄後角表層のシナプス前終末内への $\text{Ca}^{2+}$ 流入には実質的には依存しておらず、それゆえ、本研究でみられたmEPSCs抑制は脊髄後角表層でのPGBのシナプス前抑制作用が $\text{Ca}^{2+}$ 流入抑制のみに寄与するとは言い難いものであった。

本研究で使用されたsyntaxin 1Aは、神経伝達物質の開口放出において重要な役割を果たしており、PGBの抑制作用がsyntaxin 1A-KOマウスでは減弱することが観察された。このことは、PGBが十分な薬理作用を発揮するためにはsyntaxin 1Aを必要とすることを示唆している。しかしながら、syntaxin 1AがPGBの鎮痛作用に関係するのか、またどのように関係しているのかを明らかにするには、更なる研究が必要である。

## 【結 論】

本研究は、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの $\alpha 2\delta$ -1サブユニットのリガンドとして状態依存性にシナプス前性に作用していることを明らかにした。加えて、syntaxin 1AのKOマウスにおける実験結果から、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ 流入以降の機序を通してシナプス前抑制作用をもたらすことが示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

プレガバリン (pregabalin : PGB) は神経障害性痛の治療に用いられるGABA誘導体の薬物であり、電位依存性 $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの $\alpha 2\delta$ -1サブユニットに結合してシナプス前終末への $\text{Ca}^{2+}$ の流入を抑制して神経伝達物質の放出を抑制することで鎮痛効果を発揮する。本研究では電気生理学的記録法を用いてPGBのシナプス前抑制作用の分子メカニズムを解明し、脊髄後角表層の興奮性シナプス伝達におけるPGBの作用に関しvon Frey testによる行動学的評価、ホールセル・パッチクランプ記録などによる電気生理学的研究を行っている。その結果、PGBはSeltzer法で作製した神経障害性痛マウスの単刺激誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSCs) の振幅を抑制し、antisense oligodeoxynucleotide (ODN) 髄腔内投与によって $\alpha 2\delta$ -1サブユニットの発現量が減少したマウスではその振幅抑制作用の減弱を示した。また、神経障害性痛マウスでは微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) の頻度が増加したが、PGB灌流によりその頻度は減少した。さらに、syntaxin 1A-KOマウスを用いた実験で、PGBはWTマウスよりもeEPSCの振幅を低下させなかった。以上の結果から、本研究ではPGBが $\text{Ca}^{2+}$ チャネ

ルの  $\alpha 2\delta$ -1サブユニットのリガンドとして状態依存性にシナプス前性に作用していることが明らかにされ、syntaxin 1AのKOマウスにおける実験結果から、PGBが十分な薬理作用を発揮するためにはsyntaxin 1Aを必要とし、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ 流入以降の機序を介するシナプス前抑制作用をもたらすことが示唆された。

#### 【研究方法の妥当性】

マウスにSeltzer法を用いて神経障害性痛モデルを作製し、各種薬物の効果を検討する方法は多くの研究で行われており、アロディニアに対する各種薬物の効果を検討する方法としてvon Frey testは確立された方法である。また、脊髄スライス標本における脊髄後角表層のmEPSCsやeEPSCsを測定するという電気生理学的手法は各種薬剤の興奮性シナプス伝達に対する作用を検討する方法として確立された方法である。したがって、本研究の手法はPGBの脊髄後角における作用機序を解明するために妥当であると判断した。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

PGBの神経障害性痛に対する有効性も動物実験の段階ではいくつか報告がなされているが、脊髄後角における詳細な作用機序は解明されていない。本研究では、PGBの神経障害性痛緩和作用が、 $\text{Ca}^{2+}$ チャンネルの $\alpha 2\delta$ -1サブユニットのリガンドとして状態依存性にシナプス前性に作用していることを明らかにし、さらに、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ 流入以降の機序を通してシナプス前抑制作用をもたらすことが示唆された。これらを解明した点で本研究は新奇性と独創性を有すると判断した。

#### 【結論の妥当性】

Von Frey testという確立された行動評価法を用いてPGBの投与による逃避行動の変化と、パッチクランプ・ホールセル記録という電気生理学的手法を用いてシナプス前神経細胞へのPGBの作用を検討した結果、PGBの投与は神経障害性痛によるeEPSCsの振幅とmEPSCsの頻度を抑制し、 $\alpha 2\delta$ -1サブユニットの発現量を減少させたマウスではPGBによるeEPSCs振幅抑制作用が減弱した。したがって、本研究ではPGBが $\alpha 2\delta$ -1リガンドとして状態依存性にシナプス前性に作用し、syntaxin 1A-KOマウスの実験結果から、PGBが薬理作用を発揮するためにはsyntaxin 1Aを必要とし、PGBが $\text{Ca}^{2+}$ 流入以降の機序を介するシナプス前抑制作用をもたらすことが示され、PGBの作用機序を解明したという結論は妥当であると判断した。

#### 【当該分野における位置付け】

神経障害性痛は非常に治療困難な疾患である。申請論文においてPGBが脊髄後角でシナプス前性に神経伝達物質の放出をシナプス前性に抑制し、今後のPGBによる神経障害性痛の薬物療法の発展において有益な報告であると考えられる。

#### 【申請者の研究能力】

申請者は臨床の麻酔・疼痛学について研鑽を重ねながら、ホールセル・パッチクランプ法などの電気生理学的手法を用いた基礎研究を行ってきた。これらの経験を通して研究遂行に必要な知識や能力は十分に獲得していると判断する。

**【学位授与の可否】**

本申請論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該研究分野への貢献度も高いと評価できる。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Neuroscience Letters

558 : 186-191, 2014