

## 【10】

氏 名	武 村 優
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第709号
学位授与の日付	平成30年3月6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	Peripheral nerve injury-induced rearrangement of neural circuit in the spinal dorsal horn revealed by cross-correlation analysis (末梢神経損傷により惹起される脊髄後角神経回路網の機能変化— 相互相関図による解析)
論文審査委員	(主査) 教授 美津島 隆 (副査) 教授 奥 田 泰 久 教授 藤 田 朋 恵

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

末梢神経障害によって、しばしば痛覚過敏あるいはアロディニアが惹起される。その発症機序について、多くの詳細な研究が報告されているが、いまだ不明なことが多い。特に、神経損傷に伴って脊髄後角表層内の神経回路網がどのような機能的あるいは解剖学的な変化を起こすかは十分には検討されていない。

#### 【目 的】

本研究は、末梢神経障害によるアロディニアの発症に伴い脊髄後角表層の神経回路網がどのように再構築されるかを解明することを目的とした。脊髄スライス標本にマルチ電極電位計測システムを適用し脊髄後角表層に分布する複数のニューロン活動を同時に細胞外記録し、2つのニューロンのスパイク列に対して相互相関解析を行った。さらに、脊髄後角表層の侵害受容経路に発現するTransient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1) 受容体を刺激するためカプサイシンを使用し、コントロール群と末梢神経結紮群との間で神経回路網の機能変化を比較した。

#### 【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会による承認を得て、指針に従って行った。

##### 1) 末梢神経損傷モデルの作製

実験動物として生後6週から8週齢の雄性ICRマウスを用い、セボフルラン麻酔下で神経結紮群は坐骨神経を部分結紮し、コントロール群では坐骨神経を露出のみ行った。von Frey試験を行いアロディ

ニアの発症を確認し、術後9日後に実験を行った。

## 2) 電気生理学的評価

①脊髄スライス標本の作製：ケタミン・キシラジン麻酔下に脊髄腰膨大部を摘出し、厚さ450 $\mu$ mの脊髄スライスを作製した。

②細胞外記録：作製したスライス標本をマルチ電極システム (MEA2100-System : Multi Channel Systems, Germany) 上に載せ、脊髄後角表層内に分布する複数のニューロンから活動電位を同時に細胞外記録し、パーソナルコンピュータに保存した。

③相互相関関係の解析：同時に記録された二つのニューロンのスパイク列について、DataView ver.10.8.1を用い、相互相関関係をオフラインに解析した。

④カプサイシンの灌流投与：コントロール群と神経結紮群にそれぞれカプサイシン1 $\mu$ Mを60秒間灌流投与し、相互相関関係の変化を解析した。

## 3) 統計解析

$\chi^2$ 検定とその後の残差分析を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 【結 果】

脊髄後角表層ニューロンペアにおいて相互相関図を作成した結果、ヒストグラムの0mmsを中心にしたピーク (central peak) を示すもの、0mmsからずれたピーク (lagged peak) を示すもの、0mmsからずれた谷 (lagged trough) を示すもの、0mmsを中心にした谷 (central trough) を示すものが観察された。また、このような有意な相関を示さないもの (flat cross-correlogram) も多く見られた。神経結紮群のニューロンペアについて、そのパターンの出現頻度をコントロール群と比較した。神経結紮群は相互相関関係のパターンの出現頻度に対して統計的に有意な影響をおよぼすことが確認された ( $\chi^2[4]=13.86$ ,  $p < 0.05$ )。末梢神経障害がそれぞれのパターンの出現頻度にどのような影響を及ぼすかについて残差分析を行った結果、central peakがコントロール群18.7%に対し神経結紮群では28.2%と有意な増加を示した (調整済残差[AR]=2.549,  $p < 0.05$ )。また、lagged troughがコントロール群7%に対し、神経結紮群は4.2%と有意な減少を示した (AR=2.153,  $p < 0.05$ )。さらに、lagged peakがコントロール群4.3%に対し、神経結紮群は8.1%と増加した (AR=1.803,  $p < 0.05$ )。カプサイシン1 $\mu$ Mを60秒間灌流投与した結果では、それぞれのニューロンに発生する活動電位はその頻度が著明に増加した。また、コントロール群ではlagged peakの発生率が有意に増加したが ( $\chi^2[4]=38.52$ ,  $p < 0.001$ , AR=5.919,  $p < 0.01$ )、他の発生率は統計的に有意な変化を示さなかった。神経結紮群では、central peakおよびlagged peakが有意に増加し ( $\chi^2[4]=71.89$ ,  $p < 0.001$ , central peak : AR=6.953,  $p < 0.01$  lagged peak : AR=2.219,  $p < 0.05$ )、central troughおよびflat cross-correlogramは有意に減少した (central trough : AR=1.848,  $p < 0.05$ , flat cross-correlogram : AR=7.657,  $p < 0.01$ )。

### 【考 察】

本研究では、脊髄後角表層におけるニューロンペアの相互相関関係が末梢神経損傷によって有意に影響を受けることが観察された。また、カプサイシンの灌流投与は活動電位の頻度を増加させ、この

カプサイシンの影響は、コントロール群と神経結紮群との間で有意に異なっていた。コントロール群においてcentral peakをはじめとして様々なパターンが見られたことは、脊髄後角表層内で隣接するニューロンが互いに同期している事を示している。また、神経結紮群においてcentral peakの発生率が増加した結果は、痛覚過敏およびアロディニアが脊髄後角表層の神経回路における同期活動の非可逆的な変化と関係していることを示唆している。TRPV1受容体が脊髄後角表層において興奮性および抑制性ニューロンに発現することは以前より示唆されていたが、どのように神経障害性疼痛に関与するのかについては完全には解明されていなかった。カプサイシンの作用は、コントロール群と比較して神経結紮群においてより顕著であった。これは、TRPV1受容体の発現の増加による可能性がある。脊髄後角表層神経回路網におけるTRPV1受容体の発現増加は、末梢神経損傷によって引き起こされる痛覚情報のシナプス伝達の感作において重要な役割を果たすと推測される。さらに、今回の電気生理学の実験の結果は、末梢神経損傷によるTRPV1受容体の発現の増加が、抑制性ニューロンと比較して興奮性ニューロンに強いことを示唆している。

### 【結 論】

マルチ電極電位計測システムを中枢神経スライス標本に適用し、記録されたスパイク列の相互相関関係を検討することにより、神経回路網の機能変化を電気生理学的に検討した。末梢神経損傷にともなって脊髄後角表層の神経回路網が変化しており、この結果は神経障害性疼痛のメカニズムを解明する一助となりえると考えられる。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

末梢神経障害によって、しばしば痛覚過敏あるいはアロディニアが惹起される。申請論文は、末梢神経障害によるアロディニアの発症に伴い脊髄後角表層の神経回路網がどのように再構築されるかを解明することを目的として、脊髄スライス標本にマルチ電極電位計測システムを適用し脊髄後角表層に分布する複数のニューロン活動を同時に細胞外記録し、2つのニューロンのスパイク列に対して相互相関解析を行っている。さらに、脊髄後角表層の侵害受容経路に発現するtransient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) 受容体を刺激するためカプサイシンを使用し、コントロール群と末梢神経結紮群との間で神経回路網の機能変化を比較している。その結果、神経結紮群は相互相関関係のパターンの出現頻度に対して統計的に有意な影響をおよぼすことが確認された。また、カプサイシンの灌流投与は活動電位の頻度を増加させ、この影響はコントロール群と神経結紮群との間で有意に異なっていることを明らかにしている。これらの結果は、神経障害性疼痛のメカニズムを解明する一助になりえると結論づけている。

### 【研究方法の妥当性】

申請論文では、マルチ電極電位計測システムを中枢神経スライス標本に適用し、記録されたスパイク列の相互相関関係を検討することにより、神経回路網の機能変化を電気生理学的に検討している。適正な対象群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

### 【研究結果の新奇性・独創性】

TRPV1受容体が脊髄後角表層において興奮性および抑制性ニューロンに発現することは免疫染色などにより示されていたが、どのように神経障害性疼痛に関与するのかについては完全には解明されていなかった。申請論文では、脊髄後角表層に分布する興奮性ニューロンにおいて、TRPV1受容体の機能増強が、神経障害性疼痛の発症に関与している事を電気生理学的に示唆しており、この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

### 【結論の妥当性】

申請論文では、適切な対象群の設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、末梢神経障害に伴う脊髄後角表層の神経回路網の変化を検討している。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、生理学、疼痛学など関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

### 【当該分野における位置付け】

申請論文では、脊髄後角表層における末梢神経障害の影響を電気生理学的に検討し、その結果、神経回路網に変化が見られることを明らかにしている。これは、神経障害性疼痛のメカニズムの解明のみならず、神経障害性疼痛おける創薬の研究の進歩にも大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

### 【申請者の研究能力】

申請者は、臨床疼痛学や神経生理学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験結果を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載が承認されており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

### 【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。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

662 : 259-263, 2018