

【9】

氏 名	小 林 俊 策
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第725号
学位授与の日付	平成31年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (統合神経生理学)
学位論文題目	NMDA NR2B subunit antagonist may attenuate mechanical allodynia by increasing the release of enkephalin in the spinal dorsal horn (NMDA受容体NR2Bサブユニット拮抗薬は、脊髄後角内におけるエンケファリン放出を増加することによって機械的異痛症を減弱する)
論文審査委員	(主査) 教授 山 口 重 樹 (副査) 教授 町 田 繁 樹 教授 藤 田 朋 恵

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

グルタミン酸受容体のひとつである*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、脊髄後角表層に高濃度に分布し、痛覚情報伝達の調節に重要な役割を担っている。特に、NMDA受容体サブユニットのひとつであるNR2Bは末梢神経損傷によりその発現が増大し、神経障害性疼痛の発症に関与することが示されている。一方、Ca²⁺依存性高コンダクタンスKチャンネル（BKチャンネル）は、細胞内Ca²⁺によって開口し過分極性電位変化を惹起し、ニューロンの興奮性調節に関与する。最近、海馬あるいは嗅球のニューロンにおいて、NMDA受容体とBKチャンネルが機能的に密接に関係していることが示された。すなわち、NMDA受容体の活性化にともなうCa²⁺細胞内流入によりBKチャンネルが開口し、過分極性電位変化が誘発される。さらに、脊髄後角スライス標本において、NMDA受容体拮抗薬によってBKチャンネルが閉口し、内因性オピオイドであるエンケファリン（Enk）の放出が増大することが示されている。

【目 的】

脊髄後角表層において、NMDA受容体とBKチャンネルが機能的に密接に関与してEnk含有ニューロンの興奮性が調節されているか否かについて、マウスの行動観察からその手がかりを得ることを目的として実験を行った。

【対象と方法】

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の了承を得て、指針にしたがって行った。生後6～8週のICRマウスを用いた。Seltzer法に準拠して坐骨神経を部分結紮し、機械的アロディニア（異痛症）を発症したモデルマウスを作成した。NR2B拮抗薬（ifenprodil, IFN）およびBKチャネル拮抗薬（charybdotoxin, CTX）をHyldenらの方法によって髄腔内投与（i.t.）し、アロディニアに対する効果を観察した。疼痛の程度は、von Freyフィラメントによる痛み刺激に対する逃避反応の発生によって評価した。また、IFN i.t.およびCTX i.t.の効果が、エンケファリン放出量変化によるものであるかを知る手がかりを得るために、オピオイド μ 受容体拮抗薬（naloxone, NAL）および δ 受容体拮抗薬（naltorindole, NTL）腹腔内投与（i.p.）の影響についても観察した。

【結 果】

IFN i.t.によって逃避反応の発生が有意に減少した。この効果は、NAL i.p.およびNTL i.p.によってブロックされた。CTX i.t.も同様に、逃避反応の発生を有意に減少させ、その効果は、NAL i.p.およびNTL i.p.によってブロックされた。さらに、IFN i.t.とCTX i.t.を同時に行ったところ、その効果はIFN i.t.単独あるいはCTX i.t.単独と同等であった。

【考 察】

NMDA受容体のブロックにより鎮痛効果が惹起された。これは従来の報告と一致するものである。さらに、今回の研究で、その鎮痛効果の少なくとも一部は脊髄内のEnk放出量の増加による可能性が示された。BKチャネルの疼痛情報処理への関与については不明な点が多いが、今回の研究ではBKチャネルのブロックにより鎮痛効果が惹起された。また、IFN i.t.とCTX i.t.の同時投与では、相乗効果は見られなかった。

【結 論】

脊髄後角表層において、NMDA受容体がBKチャネルと密接に関与してEnk含有ニューロンの興奮性を調節していることが強く示唆された。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

グルタミン酸受容体のひとつである*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、脊髄後角表層に高濃度に分布し、痛覚情報伝達の調節に重要な役割を担っている。特に、NMDA受容体サブユニットのひとつであるNR2Bは末梢神経損傷によりその発現が増大し、神経障害性疼痛の発症に関与することが示されている。一方、Ca²⁺依存性大コンダクタンスKチャネル（BKチャネル）は、細胞内Ca²⁺濃度上昇によって開口し過分極性電位変化を惹起し、ニューロンの興奮性調節に関与する。

本研究の目的は、脊髄後角表層において、NMDA受容体とBKチャネルが機能的に密接に協調することによりエンケファリン（Enk）含有ニューロンの興奮性が調節されているか否かを行動学的に明らかにすることである。Seltzer法により坐骨神経を部分結紮して神経障害性疼痛を惹起したマウスの機械的アロディニア（異痛症）の程度をvon Frey testにより評価した。その結果、NR2B拮抗薬

(ifenprodil, IFN) およびBKチャネル拮抗薬 (charybdotoxin, CTX) によって逃避反応が有意に減弱した。この効果は、オピオイド μ 受容体拮抗薬 (naloxone, NAL) および δ 受容体拮抗薬 (naltrindole, NTL) によってブロックされた。さらに、IFNとCTXを同時に投与したところ、その効果はIFN単独あるいはCTX単独投与と同等であった。本研究ではNMDA受容体の阻害により鎮痛効果が惹起されることは従来の報告と一致したが、さらに、その鎮痛効果の少なくとも一部は脊髄内のEnk放出の増加による可能性が示された。BKチャネルの疼痛情報処理への関与については不明な点が多いが、本研究ではBKチャネルの阻害により鎮痛効果が惹起された。また、IFNとCTXの同時投与では、相乗効果は見られなかった。したがって、脊髄後角表層において、NMDA受容体がBKチャネルと密接に協調してEnk含有ニューロンの興奮性を調節していることが強く示唆された。

【研究方法の妥当性】

本研究で用いたSeltzer法は、神経障害性疼痛モデル作成の方法としてマウスにおいても確立されており、機械的刺激性アロディニアが誘発され、病態生理学的な痛みの研究を行うために広く用いられている方法である。またvon Frey testは、機械的刺激における慢性疼痛の評価や、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、一般的に行われている行動学的解析方法である。ゆえに、上記マウスモデルへのNMDA受容体あるいはBKチャネルの阻害薬投与による疼痛評価は、両分子がEnk放出制御に機能していることを行動学的に解明する方法として妥当であると考えられる。

【研究結果の新奇性・独創性】

Enk含有ニューロンは、脊髄後角表層に高濃度で分布しており、侵害受容情報の伝達および調節において重要な役割を果たしている。しかしながら、脊髄後角におけるEnk放出制御のメカニズムの詳細は不明である。本研究は、脊髄後角表層におけるEnk放出が、NMDA受容体とBKチャネルの機能的共役によって制御されていることを行動学的に示し、未だ不明点の多いEnk含有ニューロンの興奮性の調節機序の解明に有益な情報を与え、神経障害性疼痛という非常に治療困難な疾患の理解に寄与すると考えられる。

【結論の妥当性】

本研究ではvon Frey testという確立された行動評価法を用いて、NMDA受容体あるいはBKチャネルの拮抗薬投与により鎮痛効果が惹起されることを、逃避行動の有意な減弱として行動学的に明確に示している。また、その鎮痛効果がオピオイド受容体拮抗薬によって阻害されること、さらにはNMDA受容体拮抗薬とBKチャネル拮抗薬の同時投与では相乗的な鎮痛効果が見られないことを行動学的に示している。したがって、脊髄後角表層において、NMDA受容体とBKチャネルが共役しEnk含有ニューロンの興奮性を調節していることが強く示唆されたとする結論は妥当であると考えられる。

【当該分野における位置付け】

神経障害性疼痛は、神経の障害、機能不全など様々な原因によって発症し、様々な種類の痛みを生じる慢性疼痛であるが、この痛みの多様性ゆえに治療を非常に困難にしている。それゆえ、現在、慢性痛の発生機序の解明とそれに対する鎮痛薬の開発は世界的な研究課題のひとつとなっている。本研

究結果によって、神経障害性疼痛の発症に関与する機序として、脊髄後角表層においてNMDA受容体の活性化にともなうCa²⁺流入によりBKチャンネルが開口し、過分極性電位変化が誘発されEnkの放出が減少する可能性が示された。

【申請者の研究能力】

申請者は疼痛の神経生理学について研鑽を重ね、神経障害性疼痛モデルマウスを対象として、行動学的解析手法をはじめとする種々の解析手法を用いた基礎研究を継続してきた。そして、適切な解析手法・統計学的手法を用いて本研究の結論を導き出している。よって、申請者は研究遂行に必要な知識や能力を十分に有している。

【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）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(46 : 1-7, 2019)