

【10】

氏 名	佐 藤 雄 也 （き とう ゆう や）
学 位 の 種 類	博士（医学）
学 位 記 番 号	甲第775号
学位授与の日付	令和3年3月3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	Pre and post synaptic mechanisms about the peripheral nerve-injured plasticity of nociceptive transmission in the superficial dorsal horn of mouse spinal cord （マウス脊髄後角表層での末梢神経障害可塑性に関するシナプス前後
論文審査委員	のメカニズムについて） （主査）教授 徳 田 信 子 （副査）教授 美津島 隆 教授 藤 田 朋 恵

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

神経可塑性において観察される長期増強（LTP：Long-Term Potentiation）や長期抑制（LTD：Long Term Depression）といったシナプス伝達での長期的変化は侵害受容器からの伝達と調整において重要な役割を担うが、神経障害性疼痛の発生機序の詳細はいまだ不明である。

【目 的】

本研究では、神経障害性疼痛の神経可塑性の機序を明らかにするため、神経障害性疼痛マウスの脊髄スライス標本においてホールセルパッチクランプ記録を行い、脊髄後角表層の誘発興奮性シナプス後電流（eEPSC：evoked Excitatory Postsynaptic Current）と非同期シナプス後電流（aEPSC：asynchronous Excitatory Postsynaptic Current）の末梢神経障害の影響について評価した。

【対象と方法】

1. 動物

本研究は獨協医科大学動物実験委員会の承認を得た後に、生後6～8週のオスのICRマウスを用いた。

2. 神経障害性疼痛モデルマウスの作製

神経障害性マウスはセボフルラン麻酔下にSeltzer法により坐骨神経を結紮することにより作成した。また、対照マウスでは坐骨神経を表出するのみで結紮は行わないsham手術とした。

3. 行動学的評価

von Frey test により神経障害性疼痛の発症を評価した。

4. 電気生理学的評価

処置（結紮あるいはsham手術）10日後に作製した脊髄スライス標本を用いて脊髄後角表層のホールセルパッチクランプ記録を行った。eEPSCは、標的とするニューロンから100 μ m~200 μ m離れた脊髄の背外側縁にガラスピペットを誘導し、電気刺激誘発性シナプス後電流が誘発されるよう刺激強度を調整し、0.1msの持続時間で刺激して記録した。LTPとLTDは、脊髄背外側縁にガラスピペットを誘導し、テタヌス刺激（100Hz、5秒）を加えて、標的ニューロンから記録した。aEPSCはクレブス溶液のCaCl₂をSrCl₂に置き換えて記録した。

5. 統計学的分析

全ての結果は平均値±標準誤差で示した。データの分析には、一元配置分散分析または二元配置分散分析法と、それに続く事後分析としてTukey検定を用いた。神経障害性マウスと対照マウス間のLTPとLTDの頻度の比較には、3×2分割表を使用した χ^2 乗検定を用いた。aEPSC振幅の累積度数分布にはKolmogorov-Smirnov検定を用いた。統計的有意水準は $p < 0.05$ とした。

【結 果】

1. 行動学的評価

処置（結紮あるいはsham手術）後10日間、神経障害性マウス群では逃避行動誘発閾値の有意な低下が認められ、対照マウス群では観察されなかった。

2. 電気生理学的評価

神経障害性マウス群と対照マウス群の何れにおいても、脊髄後角表層においてテタヌス刺激後にLTP、LTD、無変化の3種類のニューロンが確認された。神経障害性マウス群では対照マウス群と比較してLTPを認めたニューロン数は有意に多く、一方でLTDあるいは無変化のニューロンは神経障害性マウス群に比較して対照マウス群で有意に多かった。テタヌス刺激後のaEPSC振幅は、LTPが観察されたニューロンでは変化が認められなかったが、LTDが観察されたニューロンでは減少が認められた。

【考 察】

本研究では、電気生理学的検討前に神経障害性マウス群と対照マウス群に対して、von Frey法により、アロディニア（異痛症）の出現の有無を確認した。神経障害性マウス群において処置後10日間わたってアロディニアの出現が観察されたが、対照マウス群では観察されず、これまでの報告と同様の結果が得られた。

脊髄後角表層での神経可塑性が痛覚過敏およびアロディニアの一因になるとされているが、テタヌス刺激のような頻繁なシナプス前刺激に惹起されるLTPは、神経可塑性の機序の一つであり、学習記憶に重要な海馬だけでなく脊髄後角でも観察されることが知られている。そのため、神経障害性マウスの脊髄スライス標本を作製して、脊髄後角表層のホールセルパッチクランプ記録を行い、テタヌス刺激後のLTP、LTDおよび反応なしのニューロンを観察し、対照マウスと比較した。神経障害性

マウス群においてLTPが観察されたニューロンの比率が有意に多かったことは、侵害受容伝達が亢進され、抑制性伝達が抑制されたことを意味している。

LTPとLTDがシナプス前性あるいはシナプス後性の変化の何れであるか確認するために、脊髄後角表層のaEPSCを評価した。LTDが観察されたニューロンではテタヌス刺激後aEPSCの振幅が減少しており、シナプス後性の感度の低下がLTDの発現に寄与することが示唆された。一方、aEPSCの振幅はLTPが観察されたニューロンでは変化せず、シナプス後性の感度がLTPの発現に寄与していない可能性が示唆された。そのため、aEPSCの頻度をLTPが観察されたニューロンで評価したところ、頻度の増加が確認され、シナプス前性の感度の増加がLTPの発現に寄与していることが示唆された。

【結 論】

LTP後のaEPSCに変化が乏しく、LTD後のaEPSCの減少という結果から、末梢神経損傷後の脊髄後角における中枢性感作には、LTPのシナプス前性の機序とLTDのシナプス後性の機序の両者が重要な役割をしていると結論づけた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

脊髄後角表層において、長期増強Long Term Potentiation (LTP) や長期抑圧Long Term Depression (LTD) が観察されるニューロンの存在は既に知られている。しかし、これらのニューロンと末梢神経障害後に生じる神経障害性疼痛との関係はいまだ不明である。

本研究では、末梢神経障害による、LTPやLTDを示す脊髄後角表層のニューロンへの影響と、シナプス前機序と後機序への関与を明らかにすることを目的とした。個々のニューロンの反応を解析するため、マウスの脊髄スライス標本を用いて、ホールセルパッチクランプ法により、個々のニューロンの刺激誘発興奮性シナプス後電流 (eEPSC) と非同期興奮性シナプス後電流 (aEPSC) への末梢神経障害の影響を明らかにした。

まず、脊髄後角表層において、テタヌス刺激後にLTPあるいはLTDが誘発、何れも誘発されない三種類のニューロンの割合を計測した。末梢神経障害により、脊髄後角表層においてLTPが誘発されたニューロンの割合が有意に増加していた。

続いて、LTPとLTDがシナプス前機序あるいは後機序の変化の何れに起因するものであるか確認するために、刺激後のaEPSCを評価した。LTPが誘発されたニューロンではaEPSCの頻度のみの増加、LTDが誘発されたニューロンでは振幅の減少が確認された。これらの結果から、LTPはシナプス前機序の変化、LTDはシナプス後機序の変化であることが明確となった。

以上より、シナプス前機序の変化によるLTPを示すニューロンの増加と、シナプス後機序の変化によるLTDを示すニューロンの減少が、末梢神経損傷後の脊髄後角における中枢性感作に重要な役割をしていると結論づけた。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、神経障害性疼痛モデル (Selzer法による坐骨部分結紮により作製) から脊髄スライ

ス標本を作製し、パッチクランプ・ホールセル記録を行った。そして、脊髄後角表層のシナプスの eEPSCやaEPSCを観察、末梢神経障害による影響を調べた。これらの研究方法は本申請論文の作業仮説を証明するために妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

脊髄後角表層においてLTPやLTDが観察されるニューロンの存在は既に知られている。しかし、LTPやLTDがみられるニューロンの割合が末梢神経障害によってどのように変化するかは知られていない。申請論文は、末梢神経障害後にLTPを示すニューロンが増加しLTDを示すニューロンが減少することを初めて示した。同時に、ホールセルパッチクランプ法により、LTPやLTDが観察される個々のニューロンのaEPSCを初めて観察した。これにより、LTPがシナプス前機序、LTDがシナプス後機序であることを明らかにした。本研究の新奇性と独創性は、末梢神経障害後に生じる脊髄後角の個々のニューロンの変化をシナプス前機序と後機序に分けて解析したことである。

【結論の妥当性】

申請論文では、適切な統計解析により神経障害性疼痛マウスの脊髄スライス標本から観察した eEPSCsやaEPSCなどの脊髄後電気生理学的変化を適切な対照マウスと比較した。脊髄後角表層における興奮性シナプス伝達の可塑的变化の機序を、シナプス前機序と後機序に分けて評価して導き出した結論の妥当性に疑いの余地はない。

【当該分野における位置付け】

申請論文は、脊髄後角表層における興奮性シナプス伝達の可塑的变化の機序をシナプス前機序と後機序の機序に分けて評価することを提議している。得られた結果は、神経障害性疼痛に対する新たな薬物療法の開発や確立された鎮痛法の作用機序を理解する上で極めて重要である。申請論文はこれからの研究の進歩にも大いに役立つ意義深い研究と評価できる。また、本研究では、aEPSCの検討が素量解析に有用であることも示し、電気生理学的な研究の発展にも寄与した。

【申請者の研究能力】

申請者は、電気生理学の理論を学び、単一ニューロンに対するパッチクランプ・ホールセル記録の技術を習得、実践した。そして、臨床的疑問でもある末梢神経障害後の神経障害性疼痛発症のメカニズムについての作業仮説を立て、実験計画を立案、実施した。得られた結果を適切に分析、解析し、作業仮説を証明できたことから、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的な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）

Dokkyo Journal of Medical Sciences

(48 : 23-31, 2021)