

【6】

氏 名	安 島 崇 晃 あ じま たか あき
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第802号
学位授与の日付	令和4年3月4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	Effects of peripheral nerve injury on the kinetics of electrically evoked GABA receptor-mediated currents in GABAergic and non-GABAergic neurons of the spinal dorsal horn (脊髄後角表層ニューロンのGABA _A 受容体機能に対する末梢神経損傷の影響)
論文審査委員	(主査) 教授 藤田 朋恵 (副査) 教授 徳田 信子 教授 鈴木 圭輔

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

疾患に伴う慢性疼痛には様々な病態がある。その中でも神経障害疼痛は、その難治性の特徴から、痛みについて研究する臨床医や基礎研究者の間で常に注目の的である。これまでの報告では、GABA作動性の抑制性シナプス伝達の低下が神経障害疼痛のメカニズムに重要な役割を果たしていることが明らかにされている。

【目 的】

本研究の目的は、電気生理学および分子生物学的手法を用いて、詳細な機序が明確にされていない末梢神経損傷による脊髄後角におけるGABA受容体の機能的・構造的変化について評価することである。

【対象と方法】

1. 実験動物

獨協医科大学実験委員会の承認を得た後に、実験動物としてInstitute of Cancer Research (ICR) マウスと内在性*Gad67*遺伝子プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) を発現するグルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase : GAD) -GFPノックインマウスを使用した。

2. 神経障害性疼痛モデルマウスの作製

神経障害性疼痛モデルマウス（結紮マウス）は、Selzer法により坐骨神経の直径の約半分の周囲を

9-0絹縫合糸できつく結紮することにより作製した。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手術を行った。

3. 脊髄スライス標本の作製

坐骨結紮術後7日目から10日目に、ケタミンとキシラジン麻酔下でマウスから脊髄を取り出し、人工脳脊髄液中で350 μ mの厚さの脊髄スライス標本を作製した。

4. ホール・セル・パッチクランプ法による記録

脊髄スライス標本を、人工脳脊髄液で灌流した記録チャンバーに移し、共焦点レーザーシステムを用いて脊髄後角表層のGFP陰性または陽性の神経細胞を同定した後、ホール・セル・パッチクランプ記録を行い、GABA_A受容体投与（100mM、0.3-1.0秒）によって誘発される電流（ I_{GABA} ）を記録した。また、電気パルスによる細胞外刺激で誘発されるGABA_A受容体を介した抑制性シナプス後電流（GABA-IPSCs）も記録した。

5. 定量的リアルタイムPCR解析

ホール・セル・パッチクランプ後に神経細胞を別のピペットにより吸引し、PCR解析を行った。また、GABA_A受容体サブユニット $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 δ のmRNAの発現プロファイルを解析し、GABA_A受容体遺伝子の相対定量を算出した。

6. 統計解析

結果は平均 \pm SEMで表示した。統計解析は、二元配置分散分析（ANOVA）に続いて単純効果検定を行い、Tukey's testを用いた事後多重比較を行った。必要に応じて、Yateの補正を加えた χ^2 検定も用いた。 $P<0.05$ の値を統計的に有意とした。

【結 果】

1. 脊髄後角の神経細胞におけるGABA誘発性内向き電流

GABA受容体拮抗薬（ビククリン）によって抑制されるGABA誘発性内向き電流を確認した。

2. 脊髄後角の神経細胞におけるGABA受容体を介した電流の反転電位に及ぼす坐骨神経結紮の影響

結紮マウスのGABA受容体を介した反転電位（ $n=3$ 、 -28.1 ± 3.3 mV）は、対照マウスの反転電位（ $n=7$ 、 -36.8 ± 1.75 mV）よりも有意に増大した（ $P<0.05$ ）。

3. 脊髄後角のGFP陰性および陽性神経細胞の I_{GABA} に及ぼす坐骨神経の結紮の影響

坐骨神経結紮により、GFP陰性神経細胞では I_{GABA} の振幅が有意に減少し（ $P<0.01$ ）、GFP陽性神経細胞では有意に増加した（ $P<0.01$ ）。

4. 脊髄後角のGABA作動性および非GABA作動性神経細胞のGABA-IPSCに及ぼす坐骨神経結紮の影響

GFP陰性ニューロンでは、坐骨神経結紮はGABA-IPSCの振幅に影響を与えなかったが、時間経過に伴う減衰を短縮した（ τ_{fast} ： $P<0.05$ 、 τ_{slow} ： $P<0.05$ ）。一方、GFP陽性神経細胞では、坐骨神経結紮はGABA-IPSCの振幅に影響を与えなかったが、その減衰は時間の経過とともに延長した（ τ_{fast} ：有意差なし、 τ_{slow} ： $P<0.01$ ）。

5. 脊髄後角の神経細胞におけるGABA_A受容体サブユニットの発現量に及ぼす坐骨神経結紮の影響

坐骨神経結紮により、GABA受容体サブユニット ($P<0.01$) と $\alpha 5$ ($P<0.05$) の発現が有意に増加し、 $\alpha 1$ ($P<0.05$) と δ ($P<0.05$) の発現が有意に減少した。

【考 察】

本研究では坐骨神経結紮により脊髄後角の神経細胞の電気生理学変化を観察した。坐骨神経結紮によるGFP陰性（興奮性）の神経細胞での I_{GABA} の振幅の有意な減少とGABA-IPSCの減衰時間の短縮は、末梢神経損傷後に脊髄後角の興奮性神経細胞におけるGABAergicの抑制作用が減弱する可能性を示唆している。一方、坐骨神経の結紮によるGFP陽性（抑制性）の神経細胞での I_{GABA} の振幅の有意な増加とGABA-IPSCの減衰時間の延長は、末梢神経損傷後に抑制性神経細胞におけるGABAergicの抑制作用が増強される可能性を示唆している。これら脊髄後角の興奮性および抑制性神経細胞に観察された現象は、末梢神経損傷後の神経障害性疼痛の発症の一因であることが推測され、脊髄後角における抑制性神経伝達物質GABAの活性低下が神経障害性疼痛の一因であるというこれまでの仮説を証明するものである。さらに本研究では、坐骨神経結紮後に脊髄後角におけるGABA_A受容体サブユニットの発現量の変化を確認した。これらの電気生理学および分子生物学的変化を確認したことで、末梢神経傷害後に脊髄後角神経細胞においてGABA_A受容体の機能変化を伴った構造的変化が神経障害性疼痛の発生に重要な役割をしていることを裏付けるものとなった。今後は、神経障害性疼痛の新たな治療法の開発のために、末梢神経損傷後の脊髄後角における興奮性および抑制性神経細胞ごとのGABA_A受容体サブユニットの発現量の変化についての詳細を評価する予定である。

【結 論】

本研究の結果は、末梢神経傷害後にみられる脊髄後角において興奮性および抑制性神経細胞の I_{GABA} およびGABA-IPSCsの変化とGABA_A受容体サブユニット発現量の変化が神経障害性疼痛の発生機序に重要な役割をしていることを示唆している。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

【論文概要】

本研究は、末梢神経損傷を受けた脊髄後角の神経細胞においてGABA受容体の機能、構造に変化が生じるという仮説を証明するために計画された。実験動物として、内在性グルタミン酸脱炭酸酵素 (glutamate decarboxylase : GAD、GABA合成酵素) 67遺伝子プロモーターの制御下で緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein : GFP) を発現するGAD67-GFPノックインマウスを用い、ホールセル・パッチクランプ記録によって測定したGABA関連の電流とRT-PCR法により定量したGABA_A受容体サブユニットの発現量を調べ、末梢神経損傷を受けた脊髄後角の神経細胞におけるGABA_A受容体の機能、構造への影響を確認した。末梢神経損傷モデルとして、坐骨神経を半分結紮するSeltzer法を用いた。GFP陰性（非GABA作動性、興奮性）の神経細胞では、末梢神経損傷モデルにおいてGABAの圧投与により誘発される電流 (I_{GABA}) の振幅が減少し、電気パルスによる細胞外刺激で誘発されるGABA_A受容体を介した抑制性シナプス後電流 (GABA-IPSC) の減衰時間が短縮した。

これらの結果は、末梢神経損傷により興奮性神経細胞においてGABA作動性の抑制作用が弱められることを示唆した。GFP陽性（GABA作動性、抑制性）の神経細胞では、末梢神経損傷により I_{GABA} の振幅が増加し、GABA-IPSCの減衰時間が延長した。これらの結果は、末梢神経損傷によりGABA作動性の抑制作用が増強されることを示唆した。また、末梢神経損傷を受けた脊髄後角の神経細胞のGABA_A受容体サブユニットの遺伝子発現量は、 $\alpha 3$ および $\alpha 5$ が増加し、 $\alpha 1$ および δ が減少した。これらの結果から、GABA_A受容体の構造変化が生じたことが推測された。本研究で得られた結果から、末梢神経損傷を受けた脊髄後角のGABA神経細胞の機能および構造変化が、神経障害性疼痛の発生機序に重要な役割を果たすことが示唆された。

【研究方法の妥当性】

末梢神経損傷を受けた脊髄後角のGABA作動性神経細胞における構造、機能変化について、GAD67-GFPノックインマウスを用いて、坐骨神経を半分結紮するSeltzer法により神経障害性疼痛モデルを作成し、sham手術を行った対照マウスと比較し、ホール・セル・パッチクランプ記録によって測定したGABA関連の電流とRT-PCR法により定量したGABA_A受容体サブユニットの発現量の違いを評価している。これらの電気生理学的、分子生物学的な研究方法は、本研究の仮説を証明するために妥当である。

【研究結果の新奇性・独創性】

GABA作動性抑制性シナプス伝達の低下が神経障害性疼痛の発症機序に重要な役割を果たすと考えられていたが、その詳細なメカニズムは不明であった。本研究では、GAD67-GFPノックインマウスに神経障害性疼痛モデルを適用し、末梢神経損傷後の興奮性神経細胞と抑制性神経細胞それぞれの電気的活動変化を、 I_{GABA} とGABA-IPSCという2つの指標を用いて調べた。また、末梢神経損傷後のGABA_A受容体サブユニットの遺伝子発現量の変化を調べた。適切な疾患モデルを用いて、電気生理学および分子生物学的に評価したことは、神経障害性疼痛における脊髄後角GABA_A受容体サブユニットの役割について新たな情報を提示するものであり、本研究結果は、新奇性・独創性に優れていると判断した。

【結論の妥当性】

神経障害性疼痛ではアロディニアの出現や疼痛閾値が低下することが知られている。本研究結果で得られた、末梢神経損傷を受けた脊髄後角の神経細胞においてGABA_A受容体サブユニット発現量が増加し、興奮性神経細胞でGABA作動性抑制作用が減弱し、抑制性神経細胞で同作用が増強するという結果は、神経障害性疼痛の臨床像に矛盾せず、妥当である。

【当該分野における位置付け】

本研究では、末梢神経損傷を受けた脊髄後角の神経細胞において、GABA_A受容体作動性電流(I_{GABA} 、GABA-IPSC)という機能変化とGABA_A受容体各サブユニットの遺伝子発現量という構造変化を併せて調べており、神経障害性疼痛の臨床像の機序解明に重要な情報を提供している。今後、末梢神経損傷後のGABA_A受容体サブユニットの変化と電気生理学的変化の関係性の詳細がより明らかになれば、新たな治療法の確立、治療薬の開発に発展すると考えられる。

【申請者の研究能力】

申請者は、麻酔学を研鑽したうえで、神経障害性疼痛の診断、評価、治療といった臨床的な経験を習得し、神経障害性疼痛の機序を解明するために電気生理学的手法、分子生物学的手法等を用いた基礎研究に関与してきた。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）

Dokkyo Medical Journal

（1：99-107, 2022）