

## 【15】

氏名	ぬま た ゆう き 沼 田 祐 貴
学位の種類	博士（医学）
学位記番号	甲第659号
学位授与の日付	平成27年3月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項 (麻醉・疼痛学)
学位論文題目	神経障害性疼痛は脊髄後角神経細胞のCl <sup>-</sup> ホメオスタシスを変化させ GABAによる抑制性反応を減弱させる
論文審査委員	(主査) 教授 下 田 和 孝 (副査) 教授 上 田 秀 一 教授 奥 田 泰 久

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【背 景】

神経障害性疼痛の原因として介在ニューロンによるシナプス抑制の減弱（脱抑制disinhibition）が示唆されているが、その詳細な機序はいまだ明らかにされていない。末梢神経障害を起こした状態では、脊髄後角介在ニューロンから放出されたGABAによりCl<sup>-</sup>チャンネルが開くと、正常状態とは逆にCl<sup>-</sup>が細胞内から細胞外へ流出し、ニューロンの脱分極が誘発され脊髄後角抑制性シナプス機能が変化することが示されている。さらに末梢神経障害はCl<sup>-</sup>トランスポーターであるNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体1 (NKCC1)およびK<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>共輸送体2 (KCC2)の発現レベルを変化させることが報告されている。神経障害性疼痛の発症に対しこれらの現象の関与が考えられる。

#### 【目 的】

本研究では末梢神経障害が脊髄後角抑制性シナプス伝達に与える影響を明らかにする目的で、膜電位感受性色素により染色した脊髄スライス標本を、高速イメージングシステムを用いて観察し、GABA灌流による膜電位変化を評価した。さらに末梢神経障害が脊髄後角におけるNKCC1及びKCC2発現量に与える影響をリアルタイム定量RT-PCR法を用いて評価した。

#### 【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行われた。

#### 1) 神経障害性疼痛モデルの作製

生後3～4週のICR雄性マウスを用いてケタミン、キシラジン麻酔下にSeltzer法による坐骨神経部分結紮を行い神経障害性痛モデルを作製した。

## 2) 行動学的評価 (von Frey test)

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、アロディニアの発症を確認した。

## 3) 電気生理学的評価

①脊髄スライス標本の作製と膜電位感受性色素による染色：坐骨神経結紮1週間後にマウスの腰部膨大部レベルの脊髄後角を摘出し、厚さ450 $\mu$ mの脊髄スライス標本を作製、直径1.3cmのフィルターの上で30分間留置した後、膜電位感受性色素であるdi-4-ANEPPSを滴下し、15分間暗所にてインキュベーションした。色素をクレブス液で洗浄し、さらに30分以上暗所に静置した。

②膜電位イメージング：スライス標本を記録用チャンバーに固定し、TTX 0.3 $\mu$ Mを含有したクレブス液灌流下にCCDカメラ(MiCAM2)を用いた高速蛍光測定法を行い、脊髄後角における蛍光強度変化を観察した。高速蛍光測定開始30秒後、GABA 100 $\mu$ Mを90秒間灌流し、計480秒間記録した。

### ③リアルタイム定量RT-PCR法

坐骨神経結紮1週間後に坐骨神経結紮側の腰部膨大部の脊髄後角を摘出、Isogenを用いて脊髄後角よりmRNAを抽出した。ランダムプライマーを用いて逆転写反応を行った後、TaqMan probeを用いてNKCC1およびKCC2の発現量を検討した。定量は非結紮マウスの腰部膨大部の脊髄後角を対照とし、ハウスキーピング遺伝子としてGAPDHを用い、 $\Delta\Delta$ Ct法によって比較定量した。

## 4) 統計学的分析

全ての結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で示し、対照群と坐骨神経結紮群における左右の後角の蛍光強度変化の比較には二元配置分散分析法(two-way analysis of variance: two-way ANOVA)を用いた。また事後の多重比較検定にはTukey法を用いた。統計処理は統計ソフトSPSSを使用し、統計的有意水準は $P<0.05$ 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。

### 2) 膜電位イメージング

膜電位イメージング法により脊髄スライスを観察した。TTX0.3 $\mu$ M存在下にGABA100 $\mu$ Mを90秒間灌流したところ、過分極性の蛍光強度変化が惹起された。またクレブス液によるwash outにより徐々に元の蛍光強度レベルに戻ることが観察された。坐骨神経結紮マウスの結紮側は、非結紮側及びshamマウス(対照群)と比較して蛍光強度変化が有意に減弱していた。

### 3) リアルタイム定量RT-PCR法

坐骨神経結紮マウスの後角において、KCC2発現量は対照群と比べ $77\pm 6\%$  ( $n=8$ )と有意に減少した。NKCC1発現は対照群と比べ $159\pm 14\%$  ( $n=9$ )と有意な増加を示した。

## 【考 察】

本実験では膜電位イメージング法を用いてGABA灌流時の脊髄後角の蛍光強度変化を観察し、坐骨神経結紮側の蛍光強度変化が非結紮側やshamマウス（対照群）と比較して減弱を認めた。さらにリアルタイムRT-PCR法を用いてCl<sup>-</sup>トランスポーターの発現量を調べた結果、末梢神経障害により脊髄後角におけるNKCC1の発現量は増加し、KCC2の発現量は減少していた。この変化により細胞内のCl<sup>-</sup>濃度バランスが変化すると考えられる。これは末梢神経障害においてGABAによりCl<sup>-</sup>チャンネルが開くと正常状態とは逆にCl<sup>-</sup>が細胞内から細胞外へ流出し、ニューロンの脱分極が誘発され脊髄後角抑制性シナプス機能が変化するという事実と矛盾しない。以上の結果から、Cl<sup>-</sup>トランスポーター発現量の変化によるGABA<sub>A</sub>受容体を介するシナプス抑制の減弱（脱抑制 disinhibition）が神経障害性疼痛の発症メカニズムのひとつであると考えられた。

## 【結 論】

膜電位イメージング法を用いて神経障害後の脊髄シナプス伝達におけるGABA作動性シナプス抑制の減弱を認めた。神経障害性疼痛によりCl<sup>-</sup>トランスポーターの発現量の変化が起こり、これが抑制性シナプス伝達を減弱させている可能性が示唆された。

## 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

### 【論文概要】

神経障害性疼痛発症の機序にGABA作動性シナプス伝達の変化が関与している。また、Cl<sup>-</sup>トランスポーターにより制御されるCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化が、シナプス伝達におけるGABA作用の抑制および興奮の調節を行っていると考えられている。そこで、神経障害性疼痛の発生機序として、末梢神経障害後のCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化によって生じるGABA作用の減弱が関与しているのではないかと仮説を立てた。本研究では、その仮説を検証するために、1) 膜電位イメージング（膜電位感受性色素により染色したマウス脊髄スライス標本を用いて、高速イメージングシステムによる膜電位記録を行い、GABA灌流による変化を記録し、末梢神経障害による影響を観察する）と2) Cl<sup>-</sup>トランスポーターの発現量（リアルタイム定量RT-PCR法により、脊髄後角におけるCl<sup>-</sup>トランスポーターであるNa<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter 1 (NKCC1) 及びK<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> cotransporter 2 (KCC2) の発現量に与える末梢神経障害の影響について調べる）の2つの検討を行った。尚、末梢神経障害は坐骨神経を部分結紮すること（Seltzer法）により発生させ、機械的アロディニアの評価法であるvon Frey testにより神経障害性疼痛の出現を確認した。それぞれの検討において以下の結果が得られた。1) 膜電位イメージング：正常マウス（sham手術施行）において観察されたGABA（100 μM）の灌流によるマウス脊髄スライス標本の後角表層における蛍光強度の増強（過分極）が、神経障害性疼痛マウス（坐骨神経部分結紮施行）では減弱していた。2) Cl<sup>-</sup>トランスポーターの発現量：神経障害性疼痛マウス（坐骨神経部分結紮施行）では、脊髄後角におけるNKCC1の発現量が増加し、KCC2の発現量が減少していた。以上の2つの結果から、神経障害性疼痛の発症機序に、末梢神経障害後に脊髄後角表層においてCl<sup>-</sup>トランスポーター発現量が増加して、GABA受容体を介するシナプス抑制が減弱（脱抑制）

disinhibition) することが関与している可能性が考えられた。

#### 【研究方法の妥当性】

今回、坐骨神経部分結紮モデルを神経障害性疼痛のモデルとして使用したが、このモデルは Seltzerらによって確立された方法で、小動物を用いた神経障害性疼痛に関する研究で広く使用されている。また、膜電位感受性色素により染色したマウス脊髄スライス標本における高速イメージングシステムを用いた膜電位記録は、GABA (100  $\mu$ M) の灌流により通常GABA作動性ニューロンが多く存在するとされている脊髄後角表層において蛍光強度の変化(過分極)を測定することにより、GABA受容体を介したシナプス抑制を観察する方法として妥当である。また、Cl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化を観察するために、TaqMan probe法によりCl<sup>-</sup>トランスポーターであるNKCC1およびKCC2の発現量をRT-PCR法により定量したが、この方法も既に確立され、広く使用されている手法である。よって研究方法の妥当性に問題はないと考えられた。

#### 【研究結果の新奇性・独創性】

これまで、神経障害性疼痛の機序を解明するための電気生理学的検討は、whole cell patch clamp 記録が主流であり、これらは単細胞での膜電位記録であった。しかし、今回用いた膜電位感受性色素により染色したマウス脊髄スライス標本における高速イメージングシステムを用いた膜電位記録は、脊髄後角表層における変化を多面的に評価できるという点で画期的な手法であり、末梢神経損傷後のGABA受容体を介するシナプス抑制の変化を多面的に捉えたという結果は新奇性・独創性に富んでいる。また、同時にCl<sup>-</sup>トランスポーターであるNKCC1およびKCC2の発現量の変化を測定したことで、神経障害性疼痛の発生機序として末梢神経障害後のCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化によって生じるGABA作用の減弱が関与しているのではないかという仮説を十分に説明できるものであった。

#### 【結論の妥当性】

末梢神経障害後の神経障害性疼痛の発症は複雑であり、複数の機序が関与していることが定説となっている。また、侵害伝達の亢進と内因性下行性抑制系の破綻が主な機序であることも推測されている。本研究結果で得られた神経障害性疼痛の発生機序として末梢神経障害後のCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化によって生じるGABA作用の減弱が関与しているのではないかという結論は、GABA受容体がシナプス伝達において抑制系の役割をしているため内因性下行性抑制系の破綻という機序と矛盾しないものであり、結論は妥当であると判断する。

#### 【当該分野における位置付け】

末梢神経障害後のCl<sup>-</sup>ホメオスタシスの変化によって生じるGABA作用の減弱によって末梢神経障害後に神経障害性疼痛が惹起されるということが検証されたことによって、今後、Cl<sup>-</sup>トランスポーターに関与する薬剤あるいはGABA受容体に作用する薬剤を用いた神経障害性疼痛の発症予防、発症後の治療が確立されていくものと考えられ、本研究の結果は有益な情報である。

#### 【申請者の研究能力】

申請者は、神経障害性疼痛の診断、評価、治療といった臨床的経験を重ねることで麻酔学の研鑽を積んだうえで、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。そういった経験を通して今後の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 Journal of Medical Sciences

42 : 31-36, 2015