The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	The role of GABAA Receptor δ Subunit and its Agonist THIP in Thermal Hypersensitivity in a Mouse Model of Neuropathic Pain
Author(s)	博多, 紗綾
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69431
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

[Format-H07]

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）		博多　紗綾	
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主　査	大阪大学教授	藤野裕士
	副　査	大阪大学教授	吉川秀樹
	副　査	大阪大学教授	望月秀樹

論文審査の結果の要旨

本申請者は、坐骨神経Chronic Constriction Injury(CCI)マウスの神経障害性疼痛発症のメカニズムについて、脊髄後角度膠様質(substantia gelatinosa: SG)細胞における$GABA_A$受容体介在性抑制性tonic電流に着目し研究を行ってきた。本研究では、CCIマウスの脊髄後角におけるtonic電流に寄与する$GABA_A$受容体δサブユニットの特性を分子生物学実験および行動実験を用いて検証している。

4週齢雄のマウスの右後肢坐骨神経をポリエチレンチューブにて絞扼し、CCIマウスを作成した。CCIマウスは熱・機械刺激に対する痛覚過敏を術後7日頃より呈した。熱刺激への過敏性は術後21日ごろより回復傾向を示し、術後28日目には回復するが、機械刺激に対する閾値は28日を過ぎても継続していた。本実験では、CCI術後7日目、14日目、21日目、28日目にSGよりmRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いtonic電流に関与する$GABA_A$受容体サブユニットのうち、δサブユニットの発現量の変化を調べた。また、CCI術後7日目のマウスにδサブユニット特異的アゴニスト4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridine-3-ol (THIP)を髄腔内投与し、投与前後の疼痛閾値の変化を調べた。

CCIマウスSGにおいてδサブユニットmRNAの発現低下が術後7日目、14日目で認められた。一方、21日目、28日目ではδサブユニットの発現量は同週齢ナイーブマウスと有意差を認めなかった。δサブユニットの発現量の変化は、CCIマウスの熱刺激に対する疼痛閾値の変化と同様の経過をたどっていることが明らかとなり、CCIマウスの熱刺激過敏の発症にδサブユニットを介するtonic電流の減弱が関与するのではないかと考察できた。

また、THIPの髄腔内投与によりCCIマウスの熱刺激に対する疼痛閾値の改善を認めたが、Naïveマウスでは閾値に変化を認めなかった。

以上より、$GABA_A$受容体δサブユニットを介したtonic電流が、神経障害性疼痛治療のターゲットとなり得る可能性が本研究で示された。

本研究は分子生物学的検証と行動実験を併用し、神経障害性疼痛への治療の進歩が期待される内容をJournal of pain& Reliefで発表した。以上により、学位に値すると考える。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　名 Name	博多 紗綾
論文題名 Title	The Role of GABAA Receptor δ Subunit and its Agonist THIP in Thermal Hypersensitivity in a Mouse Model of Neuropathic Pain (神経障害性疼痛モデルマウスの熱知覚過敏におけるGABAA受容体δサブユニットとアゴニストTHIPの役割)

論文内容の要旨

〔目　的(Purpose)〕

$GABA_A$受容体を介した抑制性電流には、シナプス後膜の$GABA_A$受容体に高濃度GABA(数μM)が結合することにより一過性にチャネルが開いて発生するphasic電流と、シナプス間隙に漏出した低濃度GABA(数nM)が、シナプス周囲に存在するGABAに非常に親和性の高い$GABA_A$受容体に結合し持続的にチャネルが開いて発生するtonic電流の二種類がある。中枢神経細胞におけるtonic電流はアルコールや麻酔作用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なっている。一方、痛み伝達に重要である脊髄後角神経細胞にもtonic電流の存在が明らかになっているが、その生理学意義の詳細は明らかになっていない。これまでに我々は、神経障害性疼痛モデルマウスであるChronic cuff Injury(CCI)マウスで、tonic電流を有する脊髄後角度膠様質(substantia gelatinosa: SG)細胞が減少していることを明らかにした。また、SG細胞における$GABA_A$受容体δサブユニットの蛋白発現量の減少も判明した。

本研究では、δサブユニットを介するtonic電流の減少とCCIマウスの疼痛についてのより詳細な検証を目的とし、δサブユニットの経時的な発現の変化をリアルタイムPCR法を用いて検証した。また、δサブユニット特異的アゴニスト4,5,6,7-tetrahydroisoxazolo(5,4-c)pyridine-3-ol (THIP)の CCIマウス神経障害性疼痛に対する効果を行動学実験により検証した。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

＜疼痛モデル作成＞

5週齢のオスマウスをセボフルラン麻酔下に右後肢皮膚を切開し坐骨神経を露出させ、2mm長のポリエチレンチューブ（内径0.38mm）で神経を覆い絞扼した。これをCCI群とし同週齢のマウスをNaïve群とした。

＜リアルタイムーPCR＞

カフ装着術後7～28日目のマウスを麻酔後、L4 レベルを中心に上下1cm長の脊髄を摘出し、500μmのスライスを作成後、拡大鏡下に右SGを摘出した。RNeasy Rapid Mini Kit(QIAGEN)を用いてmRNAを精製し、High Capacity RNA to cDNA Kit (Thermo Fisher)を用いcDNAを合成した。合成したcDNAをテンプレートとし、Taq Man Gene Expression Assay(Thermo Fisher)、Fast Master Mix(Thermo Fisher)を用いてPCR増幅させた。GAPDHを比較対象とし、検量線を作製した。

＜疼痛行動実験＞

Hargreaves 法に従い、赤外線投射による熱刺激に対する後肢の逃避時間を測定した。$GABA_A$受容体δサブユニット特異的アゴニストであるTHIP(7μg)を髄腔内投与し、投与前後の閾値の変化を調べた。

＜結果＞

術後7、14日目において、CCIマウスSG細胞における$GABA_A$受容体δサブユニットのmRNAの発現は有意に低下していた。この発現量の低下は、CCIマウスの熱への知覚過敏が消失する術後21日目から回復し、28日後にはNaïveマウスと同程度の発現量になった。

術後7日後にδサブユニット特異的アゴニストであるTHIPを髄腔内投与したところ、CCIマウスでは熱刺激に対する疼痛閾値の改善を認めた。一方、Naïveマウスの熱刺激に対する逃避時間には変化を及ぼさなかった。

〔総　括(Conclusion)〕

CCIマウスが熱刺激に対する知覚過敏を呈する期間と、SG細胞における$GABA_A$受容体δサブユニットmRNAの発現量の低下時期に相関性が見られたことから、CCIマウスの熱知覚過敏は、SG細胞におけるδサブユニット介在性tonic電流の減少が関与している可能性が高いと考えられた。またTHIPは、熱刺激に対する知覚過敏の鎮痛に有効であったことから、神経障害性疼痛の治療に貢献する可能性があることが示唆された。