OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Reductions in tonic GABAergic current in substantia gelatinosa neurons and GABAA receptor δ subunit expression after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice
Author(s)	井浦, 晃
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69737
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

論文審査の結果の要旨及び担当者

（申請者氏名）井浦　晃

	（職）	氏　名
論文審査担当者		
主　査	大阪大学教授	藤野裕士
副　査	大阪大学教授	鶴島晴彦
副　査	大阪大学教授	磯井秀樹

論文審査の結果の要旨

GABAA受容体を介した抑制性電流には、一過性にチャネルが開いて発生するphasic電流と、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。神経障害性疼痛の発症機序として、GABA性phasic電流の減弱が示唆されているが、tonic電流と神経障害性疼痛との関連は不明であり、これを解明することが本論文の目的である。

マウスの坐骨神経絞扼モデルを作成し、疼痛行動実験で機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値の低下を確認した。また、電気生理学的実験ではGABA性tonic電流の低下が示された。RT－PCR及びWestern blottingでは、tonic電流に関与していると考えられるGABAA受容体δサブユニットのmRNAとタンパク発現量が低下していた。

神経障害性疼痛発生のメカニズムにGABAA受容体介在性tonic電流の減弱が関与していることが示唆された。また、その原因としてGABAA受容体δサブユニットの発現の低下が考えられた。δサブユニットを対象として神経障害性疼痛の新たな治療法が生まれる可能性がある。

この論文は学位の授与に値すると考えられる。

論　文　内　容　の　要　旨
Synopsis of Thesis

氏　　名 Name	井浦 晃
論文題名 Title	Reductions in tonic GABAergic current in substantia gelatinosa neurons and $GABA_A$ receptor δ subunit expression after chronic constriction injury of the sciatic nerve in mice（坐骨神経絞扼マウスの脊髄後角における、SGニューロンのGABA性tonic電流及び$GABA_A$受容体δサブユニット発現の減少）

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、一過性にチャネルが開いて発生するphasic電流と、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。神経障害性疼痛の発症機序として、GABA性phasic電流の減弱が示唆されているが、tonic電流と神経障害性疼痛との関連は不明であり、これを解明することを目的として今回の研究を行った。

〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕

＜疼痛モデル作成＞セボフルラン麻酔下にマウスの右後肢付け根を切開して坐骨神経を露出させ、ポリエチレンチューブで神経を覆い絞扼した。これをCCI群とし、手術をしていない同週齢のマウスをNaïve群とした。

＜疼痛行動実験＞von Frey testにて足底への機械刺激に対する疼痛閾値を測定した。また、Hargreaves 法に従い、赤外線投射による熱刺激に対する疼痛閾値を測定した。

＜電気生理学的実験＞モデル作成2週間後ウレタン麻酔下にマウスより脊髄を摘出し、冷却酸素化した人工脳脊髄液(ACSF)中で500μmの脊髄水平断スライスを作成した。スライスを室温下に酸素化したACSF中で保存し、1時間回復を待った。スライスを記録用チャンバーに移しACSFを 36 ºCに加温し持続灌流を行った。拡大鏡下に脊髄後角膠様質(SG)を同定し、ホールセルモードにてブラインドパッチクランプを行い0mVに電位固定した。tetrodotoxin (0.5 mM) と strychnine (2 mM)をACSF中に加えてGABA性電流を記録した。さらに$GABA_A$受容体antagonistであるbicuculline (20mM)をスライスに投与し、電流の変化を検討した。

＜RT－PCR＞モデル作成2週間後、ウレタン麻酔下マウスより脊髄を摘出し、顕微鏡下にSGを抽出した。トリゾール法を用いてmRNAを精製し、oligo-dTprimer、PrimeScript II (Takara)を用いcDNAを合成した。合成したcDNAをテンプレートとし、$GABA_A$ 受容体α5サブユニット及びδサブユニットに対するプライマーを使用し、PCR増幅させた。1.5% agarose gel にて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにて染色を行った。得られた測定値はGAPDHで補正した。

＜Western blotting＞同様に脊髄より採取したSGからProteoJET 膜タンパク質抽出キットを用いてタンパクを抽出し、濃度を調整した後、SDS-PAGEゲルで電気泳動を行った。これをPVDFメンブレンに転写した後、一次抗体・二次抗体と反応させた。一次抗体は抗α5サブユニット抗体 (1:1000; abcam no. ab10098), 抗δサブユニット抗体(1:1000; Millipore no. AB9752)を使用した。二次抗体はHRP標識抗体 (1: 2000; GE Healthcare)を使用した。得られた測定値はβactinで補正した。

＜結果＞疼痛行動実験においては、CCI群はNaïve群と比較して機械刺激・熱刺激ともに疼痛閾値が有意に低下し、疼痛過敏を示した。電気生理学的実験では、$GABA_A$受容体介在性IPSCに関してAmplitude及びDecayには両群で差がなかったが、CCI群はNaive群と比較してFrequencyが減少していた。また、bicuculline投与による基線の変化（tonic電流の有無及び電流値）について調べたところ、CCI群ではtonic電流陽性細胞の比率が低下していた。tonic陽性細胞のtonic電流値そのものは、両群で有意差がなかった。RT-PCRの結果では、$GABA_A$受容体α5サブユニットの発現には差がなかったが、δサブユニットはCCI群で発現量が低下していた。同様にWestern blottingでは、CCI群においてδサブユニットのタンパク発現量が低下していた。

〔総　括(Conclusion)〕

坐骨神経をカフで絞扼したCCIマウス群では、Naïveマウス群と比較して機械刺激及び熱刺激に対する疼痛閾値の低下が認められた。このマウスの脊髄後角SG細胞において$GABA_A$受容体介在性tonic電流が減少していることが示された。RT-PCRとWestern blottingにより、tonic電流に関連すると考えられる$GABA_A$受容体δサブユニットのmRNAとタンパクの発現が低下していることが示された。神経障害性疼痛発生のメカニズムに$GABA_A$受容体介在性tonic電流の減弱が関与していることが示唆された。また、その原因として$GABA_A$受容体δサブユニットの発現の低下が考えられた。δサブユニットを対象として神経障害性疼痛の新たな治療法が生まれる可能性がある。