

氏名(本籍)	はたけ やま しん じ 島山伸二(茨城県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博甲第2933号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	医学研究科
学位論文題目	痛み情報伝達における膜電位依存性N型カルシウムチャネルの役割に関する研究
主査	筑波大学教授 医学博士 豊岡秀訓
副査	筑波大学教授 薬学博士 幸田幸直
副査	筑波大学講師 博士(医学) 尾崎繁
副査	筑波大学講師 医学博士 佐藤英世

論文の内容の要旨

(目的)

痛み情報は、末梢から一次感覚神経を通過して脊髄後角表層に入り、ここでシナプスを介して二次感覚神経に伝えられる。膜電位依存性N型カルシウムチャネルは一次感覚神経終末に存在し、神経伝達物質であるサブスタンスPやグルタミン酸などの遊離を調節していることが*in vitro*の研究で示されている。しかしながら、*in vivo*における一次感覚神経終末の神経伝達物質遊離に対してのN型カルシウムチャネルの関与は確認されておらず、また、N型カルシウムチャネル遺伝子を欠損した動物の痛み刺激に対する行動は確認されていない。そこで、本研究では、(1) N型カルシウムチャネルを構成する α_{1B} サブユニット遺伝子欠損マウスの痛み刺激に対する行動を解析し、さらに(2) N型カルシウムチャネルの選択的阻害剤、 ω -コノトキシンMVIIAの鎮痛作用に対するD-セリン(NMDA型受容体のグリシン結合部位に対する内因性のリガンド)の影響を*in vivo*で検討した。

(対象と方法)

- (1) N型カルシウムチャネルを構成する α_{1B} サブユニット遺伝子欠損($\alpha_{1B}^{-/-}$)マウス、その野生型($\alpha_{1B}^{+/+}$)およびヘテロ型($\alpha_{1B}^{+/-}$)マウスを用いた。N型カルシウムチャネル阻害剤として(ω -コノトキシンGVIAを、P型カルシウムチャネル阻害剤として ω -アガトキシンIVAを、L型カルシウムチャネル阻害剤としてニモジピンあるいはニフェジピンを使用した。脊髄後根神経節細胞を使い、ホールセルパッチクランプ法によりN、P/Q、L、R型カルシウムチャネルに依存する Ba^{2+} 電流を、それぞれのチャネルの選択的な阻害剤を用いて測定した。また、10mM KCl刺激時にN、P/Q、L型カルシウムチャネルを介して脊髄シナプトニューロソームに流入するカルシウムイオン量を、同様の阻害剤を加えることによって測定した。マウスの疼痛行動は、ホルマリン試験、ホットプレート試験、テイルピンチ試験を行って観察した。
- (2) ω -コノトキシンMVIIA脊髄内投与時(1.5, 3, 6pmples)の鎮痛作用をマウスホルマリン試験で検討した。また、 ω -コノトキシンMVII(6pmples)の鎮痛作用に対するD-セリン(30 μ g)の影響を確認するため、それぞれを脊髄内に同時投与してホルマリン試験を行った。

(結果)

- (1) 脊髄後根神経節細胞の全Ba²⁺電流量は $\alpha_{1B}+/+$ マウスと比較して $\alpha_{1B}-/-$ マウスにおいて有意に減少した。 $\alpha_{1B}-/-$ マウスにおいてはN型カルシウムチャネルを介したBa²⁺電流は認められなかった。10mM KCl 刺激時、 $\alpha_{1B}+/+$ マウスおよび $\alpha_{1B}-/-$ マウスにおいてはシナプトニューロソーム内に流入するカルシウムイオンは ω -アガトキシン IVA, ω -コノトキシン GVIA およびニフェジピンにより抑制されたが、 ω -コノトキシン GVIA により抑制されるカルシウムイオン流入は $\alpha_{1B}-/-$ マウスにおいて $\alpha_{1B}+/+$ マウスより有意に減少した。ホルマリン試験第2相(化学刺激誘発の持続性痛み)およびホットプレート試験(熱刺激による急性痛)において $\alpha_{1B}-/-$ マウスの痛み行動が有意に減少した。しかし、ホルマリン試験第1相(化学刺激による急性痛)およびテイルピンチ試験(機械刺激による急性痛)においては疼痛行動に変化が認められなかった。
- (2) ω -コノトキシン MVIIA 脊髄内投与により、ホルマリン試験において用量依存的に鎮痛作用が認められた。 ω -コノトキシン MVIIA 脊髄内投与によって認められる鎮痛作用はD-セリン脊髄内同時投与により、第2相においてほぼ完全に抑制され、第1相は部分的に抑制された。

(考察)

- (1) N型カルシウムチャネルを構成する α_{1B} サブユニット遺伝子欠損マウスでは脊髄後根神経節細胞および脊髄シナプトニューロソームにおいて ω -コノトキシン GVIA 感受性のカルシウムチャネル活性が認められないことが示された。また、N型カルシウムチャネルが寄与する痛み情報伝達は、化学刺激誘発の持続性痛み、熱刺激による急性痛において強く関与し、化学刺激による急性痛、機械刺激による急性痛においては比較的関与が薄いことが示唆された。
- (2) マウスホルマリン試験第2相における ω -コノトキシン MVIIA の鎮痛作用が、NMDA型受容体の活性を増強するD-セリンによりほぼ完全に抑制されたことから、第2相においてシナプス前からのグルタミン酸遊離およびNMDA型受容体を介した情報伝達の関与が高いことが示された。

審査の結果の要旨

膜電位依存性N型カルシウムチャネルは脊髄後の角における痛みの一次感覚神経終末の神経伝達物質の遊離を調節していることが幾つかの研究により示唆されている。本研究はN型カルシウムチャネルを構成する α_{1B} サブユニットのノックアウトマウスを用いて痛み刺激に対する行動を解析し、N型カルシウムチャネルが主にslow painの伝達と修飾に重要な働きを有していること、および、同チャネルがグルタミン酸を介した痛み情報伝達系路に関与することを*in vivo*で示した画期的な研究である。病的疼痛におけるN型カルシウムチャネルの関与の可能性や、新しい鎮痛薬としてのN型カルシウムチャネル阻害剤の可能性など、臨床的な示唆にも富んだ研究として高く評価される。

よって、著者は博士(医学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。