***In vivo* patch–clamp analysis of dopaminergic antinociceptive actions on dorsal horn neurons in the spinal cord**

Wataru Taniguchi¹, Terumasa Nakatsuka², Nobuyuki Miyazaki¹
Noboru Takiguchi¹, Yae Sugimura¹, and Munehito Yoshida¹

¹Department of Orthopaedic Surgery, Wakayama Medical University

²Pain Research Center, Kansai University of Health Sciences

Abstract

Dopamine (DA) is well known as a neurotransmitter and neuromodulator in the brain, not only as a precursor in the synthesis of other catecholamines. DA controls a variety of functions including locomotor activity, cognition, emotion, positive reinforcement, food intake, and endocrine regulation. Compared with the enormous literature devoted to DA actions in the brain, little is known about the roles of DA in the spinal cord. To elucidate the mechanisms of antinociception mediated by the dopaminergic descending pathway in the spinal cord, we investigated the actions of DA on substantia gelatinosa (SG) neurons by *in vivo* whole–cell patch–clamp methods. In the voltage–clamp mode ($V_H = -70$ mV), the application of DA induced outward currents in about 70% of SG neurons tested. DA also significantly suppressed the frequency and amplitude of glutamatergic spontaneous excitatory postsynaptic currents (EPSCs). DA–induced outward current was observed in the presence of TTX or a non–NMDA receptor antagonist, CNQX. DA also significantly decreased the frequency of miniature EPSCs in the presence of TTX. These results suggest that DA has both presynaptic and postsynaptic inhibitory actions on synaptic transmission in SG neurons. The DA–induced outward current was completely blocked by either GDP- β -S in the pipette solution or by perfusion of a non–selective K⁺ channel blocker, Ba²⁺. Moreover, the DA–induced outward currents were mimicked by a selective D2–like receptor agonist, quinpirole, but not by a D1–like receptor agonist, SKF 38393. In addition, the DA–induced outward current was attenuated by a selective D2–like receptor antagonist, sulpiride. These findings suggest that the DA–induced outward current is mediated by G–protein–activated K⁺ channels through D2–like receptors. Furthermore, we investigated whether DA has direct antinociceptive actions into noxious and innocuous stimuli on the receptive field skin of recording SG neuron. The results showed that DA produced direct analgesic effects in SG neurons to both noxious and innocuous

stimuli to the skin. These findings suggest the dopaminergic descending pathway has an antinociceptive effect via D2-like receptors on SG neurons in the spinal cord.

Keywords

Dopamine; *in vivo* patch-clamp; D2-like receptor; Pain; Analgesia

Received: 2 March 2011

Accepted: 8 April 2011

in vivo patch-clamp 法を用いた脊髄後角におけるドパミン疼痛抑制作用機序の解析

谷口 亘¹／中塚 映政²／宮崎 展行¹／瀧口 登¹／杉村 弥恵¹／吉田 宗人¹

¹和歌山県立医科大学 整形外科教室

²関西医療大学 保健医療学部 疼痛医学分野

はじめに

内因性鎮痛機構の一つに下行性疼痛抑制系があり、ノルアドレナリン作動神経系、セロトニン作動神経系がその役割を担っていることはよく知られている。しかしながら、ノルアドレナリンの前駆物質であるドパミンが知覚に関してどのような作用を及ぼすか未だ明らかではない。ドパミンは脳内に広範囲に分布する主要な神経伝達物質である¹⁾。ドパミン受容体は7回膜貫通型のペプチド構造を有し、G蛋白と共役している。サブタイプにはD1からD5が存在し、D1, D5のD1-like受容体、D2, D3, D4のD2-like受容体に大別できる^{1,2)}。ドパミンは脳レベルにおいて運動、認知、感情、動機強化、食欲、内分泌調整など多彩な生理活性作用を有する。また、近年、脳レベルにおいてドパミンが疼痛に関連することを示唆する研究報告が散見されるようになり³⁾、各領域でドパミン

が直接の疼痛抑制作用を有することが指摘されている。しかしながら、脊髄レベルでのドパミン作動性神経系の役割については依然不明な点が多い。ドパミン作動性神経系として、黒質線条体路、中脳辺縁路、視床下部下垂体路、そして視床下部脊髄路の4経路が知られている。視床下部脊髄路は視床下部の後部A11から脊髄に投射されていることが比較的古くから知られていたが^{4,5)}、他の経路と違ってその機能は不明である。過去に視床下部A11電気刺激で鎮痛効果が得られることや^{6,7)}、ドパミンあるいはドパミン作動薬の髄腔内投与での鎮痛効果が行動学的に報告されていることから^{8,9,10)}、ドパミン作動神経系には既知のセロトニン作動神経系やノルアドレナリン作動神経系と同様に下行性疼痛抑制系としての機能を有する可能性がある。今回、我々は*in vivo*パッチクランプ法を用いて脊髄後角感覚ニューロンでのドパミンの作用を解析したので報告する。

Fig.1 Schematic diagrams of *in vivo* rat preparation.

Whole-cell patch-clamp recordings were done while supplying oxygen to a urethane-anesthetized rat through a nose cone. Drugs were dissolved in Krebs solution and applied by perfusion. The noxious and innocuous mechanical stimuli were applied to the receptive field of the ipsilateral hindlimb with toothed forceps and air puffs.

方 法

本実験の計画は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

(1) ラット脊髄 *in vivo* 標本の作製

ラット脊髄 *in vivo* 標本の作製は Sonohata らの方法¹¹⁾に従った。5~8 週齢の成熟 Sprague-Dawley 系雄性ラットを使用した。ラットをウレタン (腹腔内投与: 1.2~1.5 g/kg) で麻酔後、呼吸管理はマスクによる酸素投与を

行った。胸腰椎部で背側に皮切を行い、傍脊柱筋群を切離した。脊椎を露出し、Th13 から L2 まで椎弓切除を行った。この状態でラットを脊髄固定器に移す。まず、イヤーパーおよび中胸椎部と下位腰椎で 3 点固定し、皮切部の辺縁を鉦で 4 方向に引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約 36°C の酸素負荷した人工脳脊髄液 (NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, and NaHCO₃ 25 mM) で灌流した (Fig.1)。実体顕微鏡下に硬膜を縦切開・切除し、後根を露出し、腰傍大部レベルで後根を内外側に分け、電極刺入スペースを作成した。この時点で電極刺入部近くの頭側と尾側の脊椎固定を追加し、合計 5 点固定とする。呼吸による脊髄の振動が抑制できていることを確認した上で、クモ膜と軟膜に電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を行った。

(2) 神経細胞からのパッチクランプ法

マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、5 mV ステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形成するいわゆるプラインドパッチクランプ法によって記録を行う。記録用電極には potassium gluconate 135 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM, and Hepes-KOH 5 mM を充填した先端電極抵抗 8~12 MΩ の微小電極を用いた。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行う。ドパミンおよびその関連物質を灌流投与し、それらが脊髄後角感覚ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を検討する。また、記録ニューロンの皮膚受容野を同定した上で同部位に疼痛刺激と触刺激を加え、コントロール時とドパミン存在下において興奮性シナプス後電流 (excitatory

postsynaptic currents; EPSC) および興奮性シナプス後電位 (excitatory postsynaptic potentials; EPSP), 活動電位 (action potential; AP) の大きさを比較した。疼痛刺激には有鉤鉗子, 触刺激には定圧の空気を噴霧することにより, 末梢刺激を定量的に行った。得られた記録電流・電位はパッチクランプ用アンプ (Molecular Devices 社 Axopatch200B), A/D 変換器 (Molecular Devices 社 Digidata 1440A), データ記録・解析用ソフト (Molecular Devices 社 pClamp10, Synaptosoft 社 Mini Analysis 6.0) を用いて記録および解析を行った。データは $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ で表示した。検定には paired t-test, t-test を用いた。危険率 5% ($p < 0.05$) をもって有意と判断した。

結 果

電圧固定法により記録膜電位を -70 mV に固定した。ドパミン ($100 \mu\text{M}$) を 2 分間灌流させると細胞膜の過分極を示す外向き電流の発生を認めた (Fig.2-A)。外向き電流は記録した 219 細胞中 155 細胞 (70.8%) で認め, 平均振幅は $19.5 \pm 1.6 \text{ pA}$ ($n=64$) であった。また, 記録したニューロン中で EPSC の頻度, 振幅を解析したところ, spontaneous EPSC の頻度・振幅が有意に減少していた (Fig.2-B)。次に, ドパミンの作用が脱感作するかどうかを調べた。ドパミンの反復投与や長時間投与にても外向き電流の減弱はなく, 脱感作はみられなかった。

ナトリウムチャネル阻害薬であるテトロドトキシン (TTX, $1 \mu\text{M}$) 存在下では微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSC; mEPSC) が観察できる。TTX 存在下にドパミンを投与した

Fig.2

A: In voltage-clamp mode ($V_H = -70 \text{ mV}$), bath application of DA ($100 \mu\text{M}$) produced an outward current. B: The three traces, shown in an expanded scale in time, indicate that the frequency and amplitude of EPSCs are clearly reduced during DA perfusion compared with those of controls.

Fig.3

A: During the simultaneous application of TTX ($1 \mu\text{M}$), DA also induced outward currents. B: In the presence of CNQX ($10 \mu\text{M}$), DA induced an outward current without any decrease in the amplitude.

ところ, mEPSC は振幅に有意差はでなかったものの, 頻度は有意に抑制されていた ($73.6 \pm 9.4\%$ of the controls; $n=10$, $p < 0.05$)。本結果から, ドパミンは脊髄後角感覚ニューロンの膜を

Fig.4

A: The outward current was significantly reduced in the presence of Ba^{2+} ($34.7 \pm 7.8\%$ of the controls; $n=8$; $p<0.05$). B: An outward current was recorded with potassium gluconate pipette solution containing GDP- β -S. DA produced an outward current just after establishing whole-cell recording, but it was markedly attenuated when DA was again applied 30 min later ($22.3 \pm 8.9\%$ of control amplitude; $n=8$; $p<0.01$).

過分極するとともに一次求心性線維から興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸の遊離を抑制することが判明した。また、TTX 存在下でも外向き電流は減弱しなかった ($n=10$) (Fig.3-A)。次に、グルタミン酸受容体拮抗薬の 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione (CNQX, $10 \mu\text{M}$) 存在下でドパミン投与を行うと EPSC は完全に消失したが、外向き電流は減弱しなかった ($n=5$) (Fig.3-B)。

さらに、ドパミンによって惹起される外向き電流に関与するイオンチャネルを調べるため、非選択的カリウムチャネル拮抗薬であるバリウム (1 mM) 存在下でドパミンの作用を観察した。バリウム非存在下と比較してバリウム存在下では有意に外向き電流は減少した ($34.7 \pm 7.8\%$ of the controls; $n=8$, $p<0.05$) (Fig.4-A)。

Fig.5

A: Quinpirole ($100 \mu\text{M}$), a D2-like receptor agonist, mimicked the DA-induced outward current. SKF 38393 ($100 \mu\text{M}$), a D1-like receptor agonist, induced no outward current, whereas quinpirole induced an outward current in the same neuron. B: In the presence of a D2-like receptor antagonist, sulpiride ($30 \mu\text{M}$), a DA-induced outward current was markedly attenuated.

また、細胞膜 G タンパク質の活性を阻害する GDP- β S を電極内に混入して記録すると、記録当初はドパミンによる外向き電流が発生したが、30 分以上において再度ドパミン投与すると、その振幅は有意に減少した ($22.3 \pm 8.9\%$ of the controls; $n=8$, $p<0.01$) (Fig.4-B)。以上の結果から、ドパミン受容体の活性化によって、細胞膜 G 蛋白質の活性化を介してカリウムチャネルを開口し、抑制性電流が発生することが判明した。

ドパミンによって惹起される外向き電流がどのようなサブタイプの受容体によるものかを検討した。D1-like 受容体作動薬である SKF 38393 ($100 \mu\text{M}$) 投与を行ってもほとんど外向き電流

Fig.6 A response to innocuous (air puff) or noxious (pinch) mechanical stimuli.

The pinch stimulus produced a large barrage of EPSCs.

は発生しなかったが (1.9 ± 0.6 pA; $n=9$), D2-like 受容体作動薬である quinpirole ($100 \mu\text{M}$) を投与すると, ドパミン投与時と同様の外向き電流が観察できた (15.7 ± 2.0 pA; $n=9$) (Fig.5-A)。また, D2-like 受容体拮抗薬の Sulpiride ($30 \mu\text{M}$) 存在下ではドパミンによって惹起される外向き電流は有意に阻害された ($34.1 \pm 10.0\%$ of the controls; $n=6$, $p<0.05$) (Fig.5-B)。以上の結果から, 脊髄後角感覚ニューロンには D2-like 受容体が発現していることが判明した。

ラットの下肢に刺激を加えると EPSC が激しく連続して発火するが (Fig.6), その反応をドパミン存在下と非存在下で比較し, 末梢皮膚刺激に対するドパミンの作用を検討した。触刺激は圧刺激装置を使用し, 一定の圧で5秒間空気を吹き付けることで定量化した。空気を吹き付けると脊髄後角ニューロンにおいて EPSC の増加が記録された。ドパミン投与下では非存在下と比較して触刺激による EPSC の発生頻度, 基線と EPSC 波形の形成する面積は有意に減少した (発生頻度 [$70.9 \pm 11.0\%$ of control;

Fig.7

A: EPSCs elicited by air puff in voltage-clamp mode ($V_H = -70$ mV) in control. DA suppressed repeated EPSCs during air puff. B: EPSCs elicited by pinching in voltage-clamp mode ($V_H = -70$ mV) in control. DA ($100 \mu\text{M}$) suppressed repeated EPSCs during pinching in a reversible manner. C: Pinch stimuli produced a barrage of EPSPs accompanied by action potentials under a current-clamp condition. DA hyperpolarized SG neuron and inhibited the action potentials in a reversible manner.

$n=18$, $p<0.01$], 面積 [$80.6 \pm 6.3\%$ of control; $n=18$, $p<0.01$]) (Fig.7-A)。また, 疼痛刺激を定量的に行うために有鉤鉗子で5から10秒間挟んだ。触刺激と同様にドパミン存在下では非存在下と比較して疼痛刺激による EPSC の発生頻度, 面積は有意に減少した (発生頻度 [$74.6 \pm 7.5\%$ of control; $n=6$, $p<0.05$], 面積 [$78.0 \pm 8.0\%$ of control; $n=6$, $p<0.05$]) (Fig.7-

B)。また、電流固定法で AP, EPSP の発生を観察すると、ドパミン存在下では非存在下と比較して AP, EPSP は発生頻度ならびに面積が有意に減少した（発生頻度 $[70.2 \pm 12.4\% \text{ of control}; n=9, p<0.05]$, 面積 $[42.7 \pm 6.9\% \text{ of control}; n=9, p<0.01]$ ）(Fig.7-C)。

考 察

既知の下行性疼痛抑制系として橋レベルの青斑核由来のノルアドレナリン作動性神経系、延髄レベルの大縫線核由来のセロトニン作動性神経系が確立されているが^{12,13,14)}、同じアミン類のドパミン作動神経系に下行性疼痛抑制系の働きがあるかどうかは不明であった。過去に視床下部 A11 電気刺激で鎮痛効果が得られることや、ドパミンあるいはドパミン作動薬の髄腔内投与での鎮痛効果が行動学的に報告されていることから同じアミン類のドパミンにも下行性疼痛抑制性の作用があると我々は仮説を立て、本研究を行ってきた。我々は脊髓スライスパッチ標本にクランプ法を適用した研究により、脊髓後角の感覚ニューロンには D2-like 受容体が発現し、細胞膜を過分極させる作用が存在することを報告した¹⁰⁾。今回、*in vivo* パッチクランプ法にても同様にドパミンは脊髓感覚ニューロンの膜を過分極させる作用を確認した。また、この作用は脊髓後角感覚ニューロンには D2-like 受容体が発現していて、ドパミンによって活性化されると細胞膜 G タンパク質の活性化を介してカリウムチャネルが開くことで細胞膜が過分極することが判明した。この作用はシナプス後性作用であるが、TTX 存在下で miniature EPSC の頻度も抑制されたことか

ら、ドパミンはシナプス前性にも作用することが判明した。すなわち、ドパミン受容体は一次求心性線維終末部にも発現しており、その活性化によってグルタミン酸の放出を抑制することが明らかになった。また、これらのドパミンの作用は皮膚侵害・非侵害刺激に対しても脊髓レベルにおいてドパミンが直接抑制する作用を有することが本研究において証明された。

ドパミンの経路としては黒質線条体路、中脳辺縁路、視床下部下垂体路、視床下部脊髓路の 4 経路が存在する。視床下部脊髓路は A11 から脊髓に投射されていることが比較的古くから知られていた。脊髓内にはドパミンを含有する神経線維や終末は存在するが細胞体は存在しないこと¹⁵⁾、後根神経節においては少量存在するがその濃度は脊髓の 1/10 であること¹⁶⁾、また神経根を刺激して脊髓後角で記録した際に今回ドパミンによって発生した外向き電流が観察されないことから¹⁷⁾、脊髓レベルで作用するドパミンの供給は視床下部脊髓路からの投射によると考えるのが妥当である。この点を考慮すると、今回の我々の研究結果から、末梢皮膚刺激が後根神経節を経由して後角感覚ニューロンに伝わるが、その刺激は視床下部 A11 ニューロンから投射されるドパミンによってシナプス前性・後性に制御を受けている、つまり、ドパミン作動性神経系は下行性疼痛抑制系として機能していることが示唆された。

結 語

脊髓後角レベルにおけるドパミン作動性神経系を *in vivo* パッチクランプ法を用いて解析した。脊髓後角感覚ニューロンには D2-like 受

容体が発現しており、その活性化により細胞膜 G タンパク質を介してカリウムチャネルが開口し、感覚ニューロンの膜が過分極することが明らかとなった。さらに、皮膚侵害受容に対して、ドパミンは脊髄レベルで抑制作用を有することが明らかとなった。

本研究からドパミン作動性神経系である視床下部脊髄路には下行性疼痛抑制系としての作用を持つことが示唆された。

文 献

- 1) Missale, C., Nash, S.R., Robinson, S.W., Jaber, M., Caron, M.G., Dopamine receptors: from structure to function, *Physiol. Rev.*, 78 (1998) 189–225.
- 2) Vallone, D., Picetti, R., Borrelli, E., Structure and function of dopamine receptors, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 24 (2000) 125–132.
- 3) Potvin, S., Grignon, S., Marchand, S., Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception, *Synapse*, 63 (2009) 390–402.
- 4) Björklund, A., Skagerberg, G., Evidence for a major spinal cord projection from the diencephalic A11 dopamine cell group in the rat using transmitter-specific fluorescent retrograde tracing, *Brain. Res.*, 177 (1979) 170–175.
- 5) Skagerberg, G., Björklund, A., Lindvall, O., Schmidt, R.H., Origin and termination of the diencephalo-spinal dopamine system in the rat, *Brain. Res. Bull.*, 9 (1982) 237–244.
- 6) Fleetwood-Walker, S.M., Hope, P.J., Mitchell, R., Antinociceptive actions of descending dopaminergic tracts on cat and rat dorsal horn somatosensory neurons, *J. Physiol.*, 399 (1988) 335–348.
- 7) Wei, H., Viisanen, H., Pertovaara, A., Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group, *Pharmacol. Res.*, 59 (2009) 355–363.
- 8) Barasi, S., Duggal, K.N., The effect of local and systemic application of dopaminergic agents on tail flick latency in the rat, *Eur. J. Pharmacol.*, 117 (1985) 287–294.
- 9) Liu, Q.S., Qiao, J.T., Dafny, N., D2 dopamine receptor involvement in spinal dopamine-produced antinociception, *Life. Sci.*, 51 (1992) 1485–1492.
- 10) Tamae, A., Nakatsuka T., Koga, K., Kato, G., Furue, H., Katafuchi, T., Yoshimura, M., Direct inhibition of substantia gelatinosa neurons in the rat spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors, *J. Physiol.*, 568 (2005) 243–253.
- 11) Sonohata, M., Furue, H., Katafuchi, T., Yasaka, T., Doi, A., Kumamoto, E., Yoshimura, M., Actions of noradrenaline on substantia gelatinosa neurones in the rat spinal cord revealed by in vivopatchrecording, *J. Physiol.*, 555 (2) (2003) 515–526.
- 12) Millan, M.J., Descending control of pain, *Prog. Neurobiol.*, 66 (2002) 355–474.
- 13) Sandkühler, J., The organization and function of endogenous antinociceptive systems, *Prog. Neurobiol.*, 50 (1996) 49–81.
- 14) Yoshimura, M., Furue, H., Mechanisms for the anti-nociceptive actions of the descending noradrenergic and serotonergic systems in the spinal cord, *J. Pharmacol. Sci.*, 101 (2006) 107–117.
- 15) Holstege, J.C., Van Dijken, H., Buijs, R.M., Goedknecht, H., Gosens, T., Bongers, C.M., Distribution of dopamine immunoreactivity in the rat, cat and monkey spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, 376 (1996) 631–652.
- 16) Weil-Fugazza, J., Onteniente, B., Audet, G., Philippe, E., Dopamine as trace amine in the dorsal root ganglia, *Neurochem. Res.*, 18 (1993) 965–969.
- 17) Nakatsuka, T., Ataka, T., Kumamoto, E., Tamaki, T., Yoshimura, M., Alteration in synaptic inputs through C-afferent fibers to substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn during postnatal development, *Neuroscience*, 99 (2000) 549–556.

Address for correspondence: Wataru Taniguchi
Department of Orthopaedic Surgery,
Wakayama Medical University
811-1 Kimiidera, Wakayama City,
Wakayama 641-8509, Japan