

硫酸デヒドロエピアンドロステロンは脊髄後角の痛覚伝達を増強する

山本 豪 (主指導教員：馬場 洋教授)
新潟大学医歯学総合研究科 麻酔科学分野

Enhancement of Pain Transmission in the Dorsal Horn of the Spinal Cord by Dehydroepiandrosterone Sulfate

Goh Yamamoto

Division of Anesthesiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Hiroshi Baba)

[要旨]

神経ステロイドである硫酸デヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone Sulfate : DHEAS) は、脊髄において痛覚過敏作用があるが、その作用機序の詳細は明らかになっていない。本研究では DHEAS の脊髄後角ニューロンのシナプス伝達機構に及ぼす影響について明らかにするために、行動学的実験とラット脊髄横断スライス標本を用いたパッチクランプ記録法による電気生理学的実験を行い、シグマ 1 受容体や N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体、ガンマアミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid : GABA)_A 受容体との関連を調べた。

ラットの脊髄くも膜下腔に DHEAS を投与すると、von Frey フィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値は用量依存的に低下し、その最大効果時間は 15 分後であった。また電流固定法によるパッチクランプ記録により、DHEAS は脊髄後角第 II 層ニューロンにおいて神経発火を増加させたことから、ニューロンの興奮が痛覚過敏として現れたものと考えられた。電圧固定法によるパッチクランプ記録により、DHEAS による微小興奮性シナプス後電流の頻度増加が認められたことから、DHEAS には興奮性ニューロンのシナプス前終末からのグルタミン酸放出を増加させる作用もあることが分かったが、この反応は NMDA 受容体及びシグマ 1 受容体に非依存的であった。DHEAS による微小興奮性シナプス後電流の振幅の増大は、NMDA 受容体拮抗薬およびシグマ 1 受容体拮抗薬により認められなくなったことから、シナプス後膜の NMDA 受容体やシグマ 1 受容体に DHEAS が作用することが示唆された。微小抑制性シナプス後電流の頻度と振幅はともに DHEAS により減少したが、GABA_A 受容体拮抗薬やシグマ 1 受容体拮抗薬を同時使用すると観察できなくなったことから、抑制性ニューロンのシナプス前終末からの GABA 放出抑制作用とシナプス後膜の GABA_A 受容体抑制作用がありそれにシグマ 1 受容体が関わっていることが分かった。

DHEAS は脊髄後角ニューロンにおいて、シグマ 1 受容体や NMDA 受容体、GABA_A 受

容体に作用し、興奮性シナプス伝達の増強と抑制性シナプス伝達の抑制をすることで、ニューロンを興奮させ痛覚伝達を増強すると考えられた。

キーワード: 硫酸デヒドロエピアンドロステロン、シグマ 1 受容体、N-methyl-D-aspartate 受容体、ガンマアミノ酪酸_A受容体、パッチクランプ記録法

別冊請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1-757 新潟大学医歯学総合研究科 麻酔科学分野 山本豪

Reprint requests to: Goh Yamamoto Division of Anesthesiology, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, 1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku, Niigata 951 - 8510, Japan

[緒言]

硫酸デヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone sulfate : DHEAS) を含む神経ステロイドは神経組織で生合成、代謝されるステロイドの総称であり、シナプスの情報伝達を調整していると考えられている¹⁾⁻¹⁰⁾。この反応は、核内での転写活性や遺伝子発現を介すゲノミック作用だけではなく、転写や蛋白合成を介さないで細胞膜や細胞質内の受容体に作用するノンゲノミック作用もあるとされる¹¹⁾。神経ステロイドのノンゲノミック作用としては、硫酸プレグネノロンによる海馬での N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体を介する Ca²⁺電流の増強作用¹²⁾や小脳の Purkinje 細胞にシナプス結合するガンマアミノ酪酸 (gamma-aminobutyric acid : GABA) ニューロンからの GABA 放出増加作用¹³⁾が知られている。

神経ステロイドは性ステロイドが合成される過程でできる中間産物および性ステロイド自身であり、神経組織内で複数の酵素によってコレステロールから生合成される。それらの酵素のうち、プレグネノロンからデヒドロエピアンドロステロン (Dehydroepiandrosterone : DHEA) を合成する cytochrome P450c17 が脊髄に存在すること¹⁴⁾¹⁵⁾から、DHEA とその硫酸塩である DHEAS が脊髄で合成されていると考えられている。DHEA や DHEAS は脳においてアルツハイマー型認知症¹⁶⁾¹⁷⁾やうつ病¹⁸⁾¹⁹⁾への関わりが指摘されているが、脊髄においては痛覚伝達に関わる報告がある。Yoon ら²⁰⁾²¹⁾は、マウスに DHEAS を脊髄クモ膜下投与すると、急性期には機械刺激、熱刺激に対する疼痛閾値が低下し、その作用がシグマ 1 受容体拮抗薬の BD1047 や GABA_A 受容体作動薬の muscimol で阻害されることを報告している。つまり DHEAS には痛みを増強する作用があり、それは脊髄後角のシグマ 1 受容体や GABA_A 受容体を介して発揮されている可能性がある。シグマ受容体はかつてオピオイド受容体の一種と考えられていた²²⁾が、現在では非オピオイド受容体に分類され、シグマ 1 とシグマ 2 の異なるタイプが存在する。特にシグマ

1 受容体については脊髄後角細胞で高密度に存在しており、さらに神経ステロイドがその内因性リガンドではないかと考えられている²³⁾。また、DHEAS がマウスの脊髄後角において、シグマ 1 受容体を介して NMDA 受容体の NR1 サブユニットをリン酸化すること²¹⁾²⁴⁾から、脊髄後角の NMDA 受容体が活性化されることで痛覚過敏が引き起こされている可能性もある。しかし、これまで侵害受容に関わる最初のシナプスが存在する脊髄後角における DHEAS のシナプス伝達機構に及ぼす影響や、主要な興奮性シナプス伝達受容体である NMDA 受容体や抑制性シナプス伝達を担う GABA_A 受容体やグリシン受容体に対する作用について電気生理学実験による検討はされていない。

今回我々は、DHEAS が侵害受容知覚に影響をあたえるのかをラットを用いた行動実験で再確認すると同時に、パッチクランプ記録法を用いて痛覚伝達路である脊髄後角ニューロンのシナプス伝達機構に与える影響を電気生理学的に調べた。

[対象と方法]

1. 使用動物

動物実験を実施するのにあたっては、新潟大学動物実験規則の規定に基づき、動物の苦痛が最小限になるように努力し、事前に新潟大学動物実験倫理委員会の承認（承認番号 H25-342-4）をえた。

実験には Wistar 系成熟雄性ラット（週齢 6～8 週、体重 200～280 g）を用い、12 時間間隔で照明を点消灯し、水とエサは常に摂取可能な状態で飼育した。

2. 行動学的実験

簡便に薬剤を投与するために、Bahar らの報告²⁵⁾を参考にラット脊髄くも膜下腔にカテーテルを留置した。2%イソフルラン麻酔下に 0.5%リドカインによる局所浸潤麻酔を行い、皮膚切開し腰椎を露出した。第 5 腰椎の棘突起を切除し硬膜に切れ込みを入れ、第 4/5 腰椎間からポリエチレンカテーテル（PE-10、BD、ニュージャージ、米国）を先端が脊髄腰膨大部に位置するように約 2 cm 挿入し閉創した。術後 3 日以上経過してから、カテーテルより DHEAS（3、10、30 $\mu\text{g}/\text{body}$ ）または vehicle 群として DHEAS の溶媒である 20% Dimethyl sulfoxide in saline を脊髄クモ膜下投与した。von Frey フィラメントの機械的刺激（1、1.4、2、4、6、8、10、15、26、60 g）に対する疼痛反応閾値を投与前、投与後 5 分、15 分、30 分、60 分、120 分の各時点で計測した。von Frey テストは左後肢に対し各フィラメントで 8 回刺激し、2 回以上反応を認めたものを陽性とした。

3. 脊髄横断スライス標本の作製

成熟ラット脊髄横断スライスの作製は Yoshimura らの報告²⁶⁾に従って行った。ウレタン麻酔下（1～1.5 g/kg 腹腔内投与）に腰仙部脊髄を摘出し、O₂ 95%および CO₂ 5%で飽和した冷却クレブス液中に浸した。硬膜の除去後、腰膨大部の脊髄より神経根を切除した。脊髄

を寒天ブロックに設けた溝に設置した後、マイクロライザー（堂阪イーエム、京都、日本）を用いて厚さ約 650 μm の脊髄横断スライス標本を作製した。このスライス標本を記録用チェンバーに移して、34~36°Cに加温したクレブス液で灌流した（15 mL/min）。クレブス液の組成（mM）は、NaCl 117, KCl 3.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 25, D-glucose 11.5 とした。

4. パッチクランプ法による記録

脊髄横断スライスの下部からの透過光で観察される後角第II層の膠様質は、明るい部位として容易に視認できた。その膠様質ニューロンから先端電極抵抗約 10 M Ω のガラス微小電極を用いて、実体顕微鏡下にブラインドホールセルパッチクランプ記録を行った。ガラス微小電極内液の組成（mM）は、電圧固定法による測定時は Cs-sulfate 110, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, TEA 5, ATP-Mg 5 とし、電流固定法による測定時は K-gluconate 135, KCl 5, CaCl₂ 0.5, MgCl₂ 2, EGTA 5, HEPES 5, TEA 5, ATP-Mg 5 とした。

5. 薬剤投与法と実験プロトコル

薬液の灌流はクレブス液と同ラインを用い、クレブス液に溶解して投与した。電圧固定法による測定時の保持電位は、興奮性シナプス後電流（excitatory postsynaptic current : EPSC）観察時は -70 mV、抑制性シナプス後電流（inhibitory postsynaptic current : IPSC）観察時は 0 mV とした。微小興奮性シナプス後電流（miniature-EPSC : m-EPSC）および微小抑制性シナプス後電流（miniature-IPSC : m-IPSC）はテトロドトキシン 1 μM 存在下に測定した。電流固定法による活動電位の測定時には 60 pA の電流を 1000 ms 流した。DHEAS は 5 分間灌流投与しその前後で比較した。得られた電流は、Axopatch 200B（Molecular Devices、米国）により増幅、Digidata 1322A（Molecular Devices、米国）により A/D 変換しコンピュータに記録後、pCLAMP10.4（Molecular Devices、米国）および Minianalysis 6.0（Synaptosoft、米国）を用いて解析した。

使用した薬物について、テトロドトキシン（TTX）は和光純薬工業（大阪、日本）、DHEAS、BD1047、AP5、ビククリン、ストリキニンは Sigma-Aldrich（St. Lois、米国）から購入した。

6. 統計処理

実験結果は平均±標準偏差で表した。統計処理ソフト The GraphPad Prism (version 7、GraphPad Software、カリフォルニア、米国)を用いて行動学的実験結果は one or two-way ANOVA で、電気生理学的実験結果は Student の t 検定で統計処理を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

[結果]

1. 行動学的実験

各群 5 匹ずつ測定を行った。von Frey フィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値は、薬剤投与前には各群において差を認めなかった。脊髄くも膜下投与 15 分後に DHEAS 3 μg 群 ($14.0 \pm 7.8 \text{ g}$, $p < 0.01$) および 10 μg 群 ($6.9 \pm 5.2 \text{ g}$, $p < 0.001$) は vehicle 群 ($51.0 \pm 20.1 \text{ g}$) と比較して低下し、30 分後は DHEAS 10 μg 群 ($14.0 \pm 7.8 \text{ g}$, $p < 0.05$) のみ vehicle 群 ($44.2 \text{ g} \pm 22.0 \text{ g}$) と比較して低下した。投与後 120 分で投与前と同じ閾値に戻った (図 1)。DHEAS 30 μg 群では興奮して飛び跳ねる、後肢や尾を噛むといった異常行動が出現したため von Frey テストは行えなかった。

2. 電気生理学的実験

DHEAS の灌流濃度は、ラットの脳脊髄液量を 300 μL と仮定し、10 μg の DHEAS を脊髄くも膜下投与したときに予測される濃度として 100 μM とした。

i. DHEAS の活動電位に対する作用

電流固定法で 60 pA の電流を 1000 ms 与えると細胞の活動電位がスパイクとして観察された。このスパイクの数は DHEAS (100 μM 、5 分間) の灌流投与により増加 (control, 3.0 ± 2.6 ; DHEAS, 6.8 ± 5.0 , $p < 0.05$; 記録細胞数 10) した。(図 2)

ii. DHEAS の m-EPSC に対する作用

DHEAS (100 μM 、5 分間) の灌流投与により、m-EPSC の頻度 (control, 16.0 ± 12.5 ; DHEAS, $33.9 \pm 14.2 \text{ Hz}$, $p < 0.001$) は増加し、振幅 (control, 9.21 ± 3.34 ; DHEAS, $12.7 \pm 4.58 \text{ pA}$, $p < 0.01$) は増大した (記録細胞数 8)。(図 3)

NMDA 受容体拮抗薬である AP5 (50 μM) 存在下において DHEAS (100 μM 、5 分間) の灌流投与により、m-EPSC の頻度 (control, 11.3 ± 9.96 ; DHEAS, $21.2 \pm 16.5 \text{ Hz}$, $p < 0.05$) は増加したが、振幅 (control, 8.01 ± 2.67 ; DHEAS, $8.82 \pm 3.12 \text{ pA}$, $p = 0.10$) は変化しなかった (記録細胞数 9)。(図 4A)

シグマ 1 受容体拮抗薬である BD1047 (100 μM) 存在下において DHEAS (100 μM 、5 分間) の灌流投与により、m-EPSC の頻度 (control, 16.1 ± 13.6 ; DHEAS, $24.8 \pm 25.2 \text{ Hz}$, $p < 0.05$) は増加したが、振幅 (control, 10.0 ± 4.87 ; DHEAS, $10.7 \pm 5.66 \text{ pA}$, $p = 0.28$) は変化しなかった (記録細胞数 14)。(図 4B)

iii. DHEAS の m-IPSC に対する作用

DHEAS (100 μM 、5 分間) の灌流投与により、m-IPSC の頻度 (control, 5.06 ± 2.88 ; DHEAS, $3.30 \pm 1.47 \text{ Hz}$, $p < 0.05$) は減少したが、振幅 (control, 9.28 ± 1.97 ; DHEAS, $8.96 \pm 2.42 \text{ pA}$, $p = 0.22$) は変化しなかった (記録細胞数 7)。(図 5)

GABA_A 受容体拮抗薬であるビククリン (10 μM) 存在下において DHEAS (100 μM 、5

分間)の灌流投与により、m-IPSCの頻度(control, 2.49 ± 2.01 ; DHEAS, 2.15 ± 1.84 Hz, $p = 0.20$)、振幅(control, 8.84 ± 5.49 ; DHEAS, 8.79 ± 4.53 pA, $p = 0.22$)ともに変化しなかった(記録細胞数14)。(図6A)

グリシン受容体拮抗薬であるストリキシン(2 μ M)存在下においてDHEAS(100 μ M、5分間)の灌流投与により、m-IPSCの頻度(control, 3.27 ± 2.54 ; DHEAS, 1.29 ± 0.93 Hz, $p < 0.01$)、振幅(control, 8.74 ± 3.66 ; DHEAS, 6.23 ± 3.08 pA, $p < 0.01$)ともに減少した(記録細胞数11)。(図6B)

シグマ1受容体拮抗薬であるBD1047(100 μ M)存在下においてDHEAS(100 μ M、5分間)の灌流投与により、m-IPSCの頻度(control, 6.14 ± 4.73 ; DHEAS, 4.71 ± 2.95 Hz, $p = 0.28$)、振幅(control, 13.4 ± 5.80 ; DHEAS, 9.82 ± 2.92 pA, $p = 0.08$)ともに変化しなかった(記録細胞数7)。(図6C)

[考察]

本研究からDHEASを脊髄くも膜下腔に投与することにより、*in vivo*ラットでvon Freyフィラメントの機械刺激に対する疼痛閾値を用量依存性に低下させ痛覚過敏反応を惹起させること、その効果は投与後15分で最大となることが分かった。これはYoonらがマウスで行った実験結果²⁰⁾と同様であった。さらに電流固定法による*in vitro*パッチクランプ記録により、DHEASは脊髄後角第II層ニューロンにおいて活動電位によるスパイクを増加させた。脊髄後角第II層には、A δ 線維やC線維からの侵害刺激を受け取る興奮性および抑制性ニューロンが分布しており、これらのニューロンが脊髄後角における痛覚伝達を制御している。DHEASがこれらのニューロンの脱分極を促進した結果が、痛覚過敏として観察されると考えられた。

今回の電圧固定法による*in vitro*パッチクランプ記録は、全てテトロドトキシンを使用し電位依存性ナトリウムチャンネルを阻害することで、活動電位と伝導を抑制して記録したため、記録細胞とそれに直接入力するシナプス前終末への作用を主に反映したものである。DHEASによるm-EPSCの頻度増加が認められたことから、DHEASには興奮性ニューロンのシナプス前終末に作用し、興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸放出を増加させる作用もあることが分かったが、この反応はNMDA受容体及びシグマ1受容体に非依存的であった。これまでの報告では、DHEASの作用は脊髄後角細胞のNMDA受容体²⁴⁾²⁷⁾及びシグマ1受容体依存的²⁰⁾であるとされていたが、今回の結果より、シナプス前への作用は他の機構を介した反応であると考えられた。シナプス前終末の脱分極に伴う電位依存性カルシウムイオンチャンネル開口がグルタミン酸放出のトリガーとなるため、この部分にDHEASが作用していると考えられるが、本研究の結果からは具体的な機構は分からず今後の研究課題である。さらにDHEASによるm-EPSCの振幅の増大は、NMDA受容体拮抗薬およびシグマ1受容体拮抗薬により認められなくなったことから、シナプス後膜のNMDA受容体やシグマ1受容体にDHEASが作用することを示している。これまでのシグ

マ 1 受容体の脊髄後角ニューロンに対する作用は NMDA 受容体を介したものであるという報告²⁸⁾²⁹⁾が多いが、今回の結果もシグマ 1 受容体拮抗薬と NMDA 受容体拮抗薬をそれぞれ使用した時の反応が同様になったことから、やはり関連性が示唆された。

脊髄の抑制性シナプス伝達においては GABA とグリシンが主要な抑制性伝達物質である。今回電流固定法による *in vitro* パッチクランプ記録により、m-IPSC の頻度と振幅ともに DHEAS により減少したが、GABA_A 受容体拮抗薬を同時使用すると観察できなくなった。このことから DHEAS には抑制性ニューロンにおいて、シナプス前終末からの GABA 放出抑制作用とシナプス後膜の GABA_A 受容体抑制作用があることが分かった。一方でグリシン受容体拮抗薬の同時使用では、DHEAS による頻度と振幅の減少が観察できたことから、グリシンに関しては、DHEAS は作用しないと考えられた。Yoon らの DHEAS の痛覚過敏作用が GABA_A 受容体作動薬により打ち消されるという報告²⁰⁾や、脳において DHEAS が GABA_A 受容体に対し強力な拮抗作用を有しているという報告³⁰⁾から、DHEAS には脊髄後角の抑制性シナプス伝達に関わる GABA_A 受容体への抑制作用があることが予測されていたが、電気生理学的手法を用いて調べた研究はいままでなく、特に GABA のシナプス前からの放出抑制は今回初めて観察された現象である。しかも興味深いことに、DHEAS によるシナプス前からの GABA 放出抑制効果は、シグマ 1 受容体拮抗薬投与時に観察できなくなったため、興奮性シナプス伝達のシナプス前への作用と異なり、シグマ 1 受容体依存的である可能性がある。

これらの興奮性シナプス伝達の増強、抑制性シナプス伝達の抑制の作用の総和としてニューロンの興奮が生じて痛覚過敏作用が生じるものと考えられる。さらにこれらの興奮性および抑制性シナプスに対する反応は、DHEAS を灌流投与して 5 分以内に起こる比較的早い反応であることから、遺伝子転写や蛋白合成を介するため時間がかかるゲノミック作用ではなく、細胞膜や細胞質の受容体などに作用するノンゲノミック作用であることが示唆された。

脊髄における神経ステロイドの作用はまだ不明なことが多く、痛覚過敏を引き起こすことが明らかになっているのは DHEA³¹⁾と DHEAS²⁰⁾のみである。坐骨神経結紮による神経障害性疼痛モデルラットの腰部脊髄において、cytochrome P450c17 の発現が低下し、脊髄組織の DHEA 量は減少することが明らかになっている³¹⁾。このことから脊髄後角では、各神経ステロイドの生合成を調節することで、痛覚伝達が制御されていることが示唆される。慢性疼痛モデルラットを用いて DHEAS の作用を解明することも今後の課題である。

[結論]

行動学的実験と電気生理学の実験により、神経ステロイド DHEAS には脊髄での痛覚過敏作用があり、それは脊髄後角ニューロンの興奮性シナプス伝達を増強し、抑制性シナプス伝達を抑制することで発揮されると考えられた。

[謝辞]

本研究を進めるにあたり、様々なご指導をいただいた東北医科薬科大学麻酔科学分野の河野達郎教授、新潟大学医歯学総合研究科麻酔科学分野の馬場洋教授、紙谷義孝准教授、佐々木美佳助教、腫瘍内科学分野の生駒美穂准教授に深謝いたします。また本研究は JSPS 科研費 JP26861224 の助成を受けたものです。

(参考文献)

- 1) Baulieu EE: Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system. *Recent Prog Horm Res* 52: 1-32, 1997.
- 2) Baulieu EE, Robel P: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) as neuroactive neurosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 4089-4091, 1998.
- 3) Abdrachmanova G, Chodounska H, Vyklicky L, Jr.: Effects of steroids on NMDA receptors and excitatory synaptic transmission in neonatal motoneurons in rat spinal cord slices. *Eur J Neurosci* 14: 495-502, 2001.
- 4) Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, Mori N, Sokabe M: PREGS induces LTP in the hippocampal dentate gyrus of adult rats via the tyrosine phosphorylation of NR2B coupled to ERK/CREB [corrected] signaling. *J Neurophysiol* 98: 1538-1548, 2007.
- 5) Cheng ZX, Lan DM, Wu PY, Zhu YH, Dong Y, Ma L, Zheng P: Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate inhibits persistent sodium currents in rat medial prefrontal cortex via activation of sigma-1 receptors. *Exp Neurol* 210: 128-136, 2008.
- 6) Lhullier FL, Nicolaidis R, Riera NG, Cipriani F, Junqueira D, Dahm KC, Brusque AM, Souza DO: Dehydroepiandrosterone increases synaptosomal glutamate release and improves the performance in inhibitory avoidance task. *Pharmacol Biochem Behav* 77: 601-606, 2004.
- 7) Meyer DA, Carta M, Partridge LD, Covey DF, Valenzuela CF: Neurosteroids enhance spontaneous glutamate release in hippocampal neurons. Possible role of metabotropic sigma1-like receptors. *J Biol Chem* 277: 28725-28732, 2002.
- 8) Sabeti J, Nelson TE, Purdy RH, Gruol DL: Steroid pregnenolone sulfate enhances NMDA-receptor-independent long-term potentiation at hippocampal CA1 synapses: role for L-type calcium channels and sigma-receptors. *Hippocampus* 17: 349-369, 2007.
- 9) Sliwinski A, Monnet FP, Schumacher M, Morin-Surun MP: Pregnenolone sulfate enhances long-term potentiation in CA1 in rat hippocampus slices through the modulation of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Neurosci Res* 78: 691-701, 2004.

- 10) Smith CC, McMahon LL: Estrogen-induced increase in the magnitude of long-term potentiation occurs only when the ratio of NMDA transmission to AMPA transmission is increased. *J Neurosci* 25: 7780-7791, 2005.
- 11) Zheng P: Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: action, mechanism and possible significance. *Prog Neurobiol* 89: 134-152, 2009.
- 12) Irwin RP, Maragakis NJ, Rogawski MA, Purdy RH, Farb DH, Paul SM: Pregnenolone sulfate augments NMDA receptor mediated increases in intracellular Ca²⁺ in cultured rat hippocampal neurons. *Neurosci Lett* 141: 30-34, 1992.
- 13) Tsutsui K, Sakamoto H, Ukena K: Biosynthesis and action of neurosteroids in the cerebellar Purkinje neuron. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85: 311-321, 2003.
- 14) Kibaly C, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG: Molecular and neurochemical evidence for the biosynthesis of dehydroepiandrosterone in the adult rat spinal cord. *J Neurochem* 93: 1220-1230, 2005.
- 15) Mensah-Nyagan AG, Kibaly C, Schaeffer V, Venard C, Meyer L, Patte-Mensah C: Endogenous steroid production in the spinal cord and potential involvement in neuropathic pain modulation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109: 286-293, 2008.
- 16) Kim SB, Hill M, Kwak YT, Hampl R, Jo DH, Morfin R: Neurosteroids: Cerebrospinal fluid levels for Alzheimer's disease and vascular dementia diagnostics. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 5199-5206, 2003.
- 17) Weill-Engerer S, David JP, Sazdovitch V, Liere P, Eychenne B, Pianos A, Schumacher M, Delacourte A, Baulieu EE, Akwa Y: Neurosteroid quantification in human brain regions: comparison between Alzheimer's and nondemented patients. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5138-5143, 2002.
- 18) Goldman N, Gleib DA: Sex differences in the relationship between DHEAS and health. *Exp Gerontol* 42: 979-987, 2007.
- 19) Haren MT, Malmstrom TK, Banks WA, Patrick P, Miller DK, Morley JE: Lower serum DHEAS levels are associated with a higher degree of physical disability and depressive symptoms in middle-aged to older African American women. *Maturitas* 57: 347-360, 2007.
- 20) Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH: Intrathecal injection of the neurosteroid, DHEAS, produces mechanical allodynia in mice: involvement of spinal sigma-1 and GABA receptors. *Br J Pharmacol* 157: 666-673, 2009.
- 21) Yoon SY, Roh DH, Seo HS, Kang SY, Moon JY, Song S, Beitz AJ, Lee JH: An increase in spinal dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) enhances NMDA-induced pain via phosphorylation of the NR1 subunit in mice: involvement of the sigma-1 receptor. *Neuropharmacology* 59: 460-467, 2010.

- 22) Gilbert PE, Martin WR: The effects of morphine and nalorphine-like drugs in the nondependent, morphine-dependent and cyclazocine-dependent chronic spinal dog. *J Pharmacol Exp Ther* 198: 66-82, 1976.
- 23) Alonso G, Phan V, Guillemain I, Saunier M, Legrand A, Anoaï M, Maurice T: Immunocytochemical localization of the sigma(1) receptor in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 97: 155-170, 2000.
- 24) Chen L, Miyamoto Y, Furuya K, Dai XN, Mori N, Sokabe M: Chronic DHEAS administration facilitates hippocampal long-term potentiation via an amplification of Src-dependent NMDA receptor signaling. *Neuropharmacology* 51: 659-670, 2006.
- 25) Bahar M, Rosen M, Vickers MD: Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth* 56: 405-410, 1984.
- 26) Yoshimura M, Nishi S: Blind patch-clamp recordings from substantia gelatinosa neurons in adult rat spinal cord slices: pharmacological properties of synaptic currents. *Neuroscience* 53: 519-526, 1993.
- 27) Bergeron R, de Montigny C, Debonnel G: Potentiation of neuronal NMDA response induced by dehydroepiandrosterone and its suppression by progesterone: effects mediated via sigma receptors. *J Neurosci* 16: 1193-1202, 1996.
- 28) Choi SR, Moon JY, Roh DH, Yoon SY, Kwon SG, Choi HS, Kang SY, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH: Spinal D-Serine Increases PKC-Dependent GluN1 Phosphorylation Contributing to the Sigma-1 Receptor-Induced Development of Mechanical Allodynia in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *J Pain* 18: 415-427, 2017.
- 29) Kim HW, Roh DH, Yoon SY, Seo HS, Kwon YB, Han HJ, Kim KW, Beitz AJ, Lee JH: Activation of the spinal sigma-1 receptor enhances NMDA-induced pain via PKC- and PKA-dependent phosphorylation of the NR1 subunit in mice. *Br J Pharmacol* 154: 1125-34, 2008.
- 30) Imamura M, Prasad C: Modulation of GABA-gated chloride ion influx in the brain by dehydroepiandrosterone and its metabolites. *Biochem Biophys Res Commun* 243: 771-5, 1998.
- 31) Kibaly C, Meyer L, Patte-Mensah C, Mensah-Nyagan AG: Biochemical and functional evidence for the control of pain mechanisms by dehydroepiandrosterone endogenously synthesized in the spinal cord. *Faseb j* 22: 93-104, 2008.

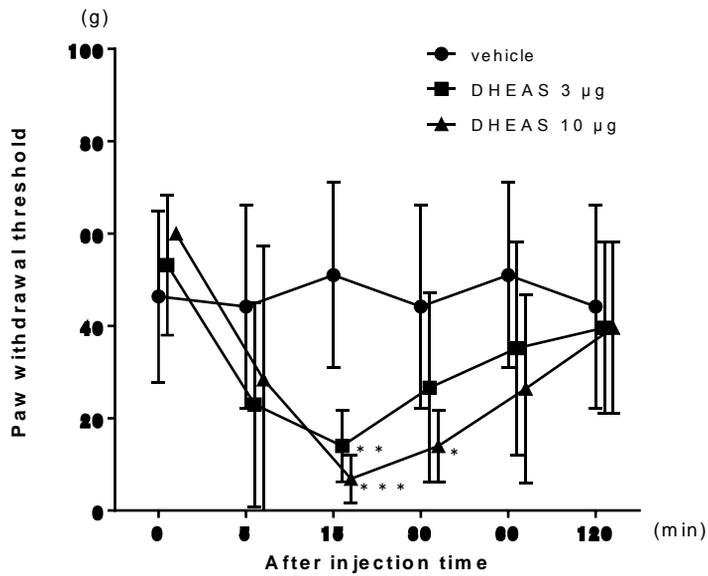


図1 DHEASくも膜下投与による機械刺激に対する疼痛閾値の変化
 各群 (vehicle、DHEAS 3 µg、DHEAS 10 µg) 5匹ずつ、von Frey
 フィラメントで機械刺激をおこなった。DHEAS 30 µg群では興奮して
 飛び跳ねる、後肢や尾を噛むといった異常行動が出現したためvon Frey
 テストは行えなかった。データは平均±標準偏差で表した。* $p < 0.05$,
 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

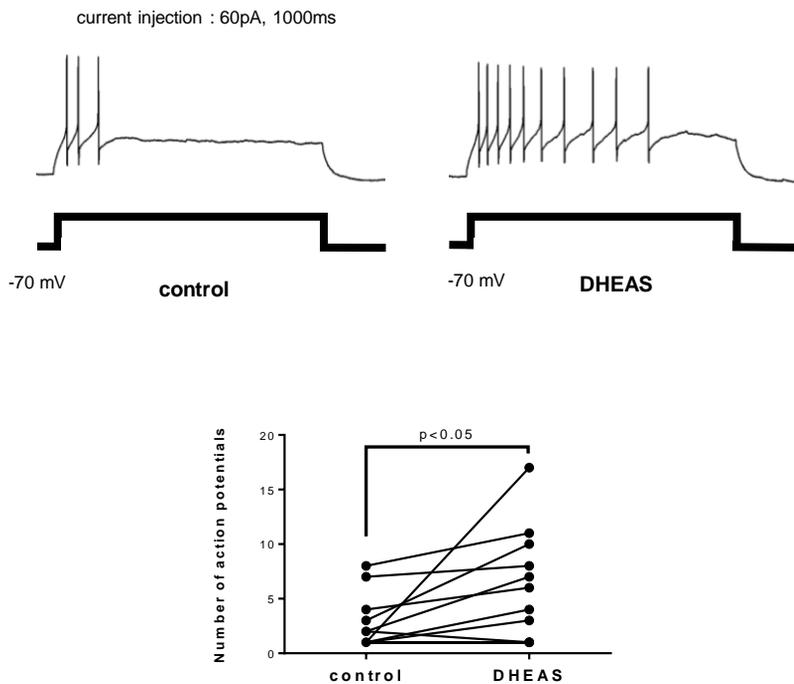


図2 DHEASの活動電位に対する作用

10細胞において電流固定法でパッチクランプ記録を行い60 pAの電流を1000 ms与えると細胞の活動電位がスパイクとして観察された。下段にDHEAS投与前と投与5分後のスパイクの数の変化とp値を示す。

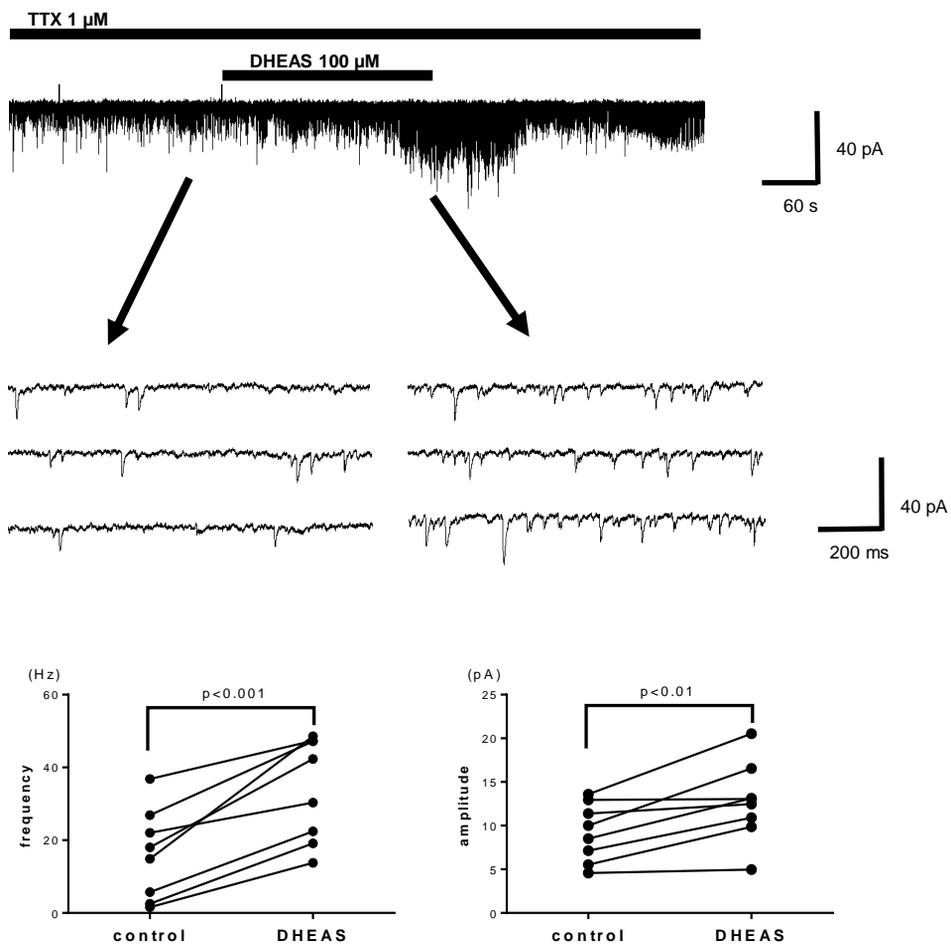


図3 DHEASのm-EPSCに対する作用

DHEAS (100 μM) を灌流投与しm-EPSCの変化を記録した。中段にDHEAS投与前と投与5分後の波形の拡大を示す。下段に8細胞での記録の頻度と振幅の変化とp値を示す。

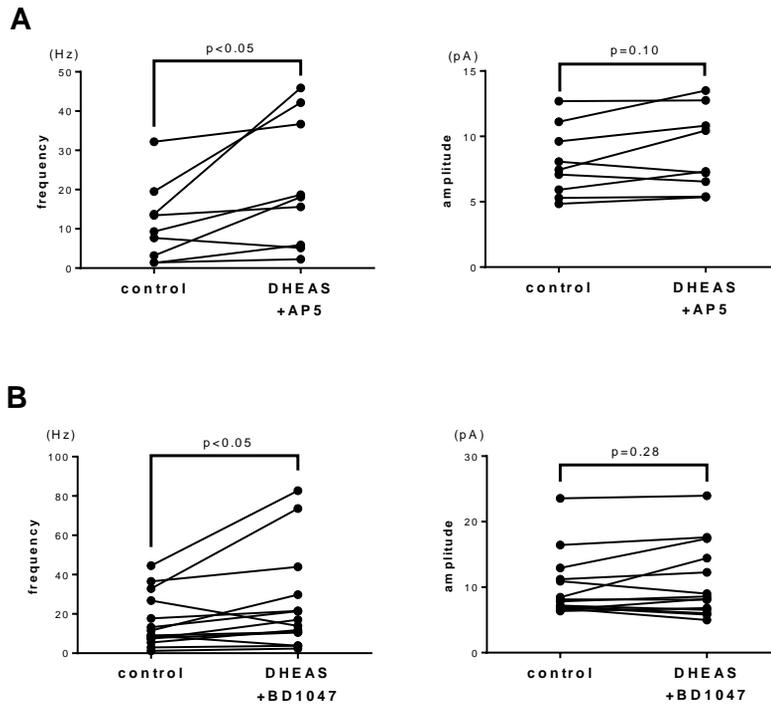


図4 DHEASのNMDA受容体とシグマ1受容体への作用

(A) 9細胞におけるAP5 (50 μM) 同時灌流投与時のDHEASによるm-EPSCの頻度と振幅の変化とp値を示す。

(B) 14細胞におけるBD1047 (100 μM) 同時灌流投与時のDHEASによるm-EPSCの頻度と振幅の変化とp値を示す。

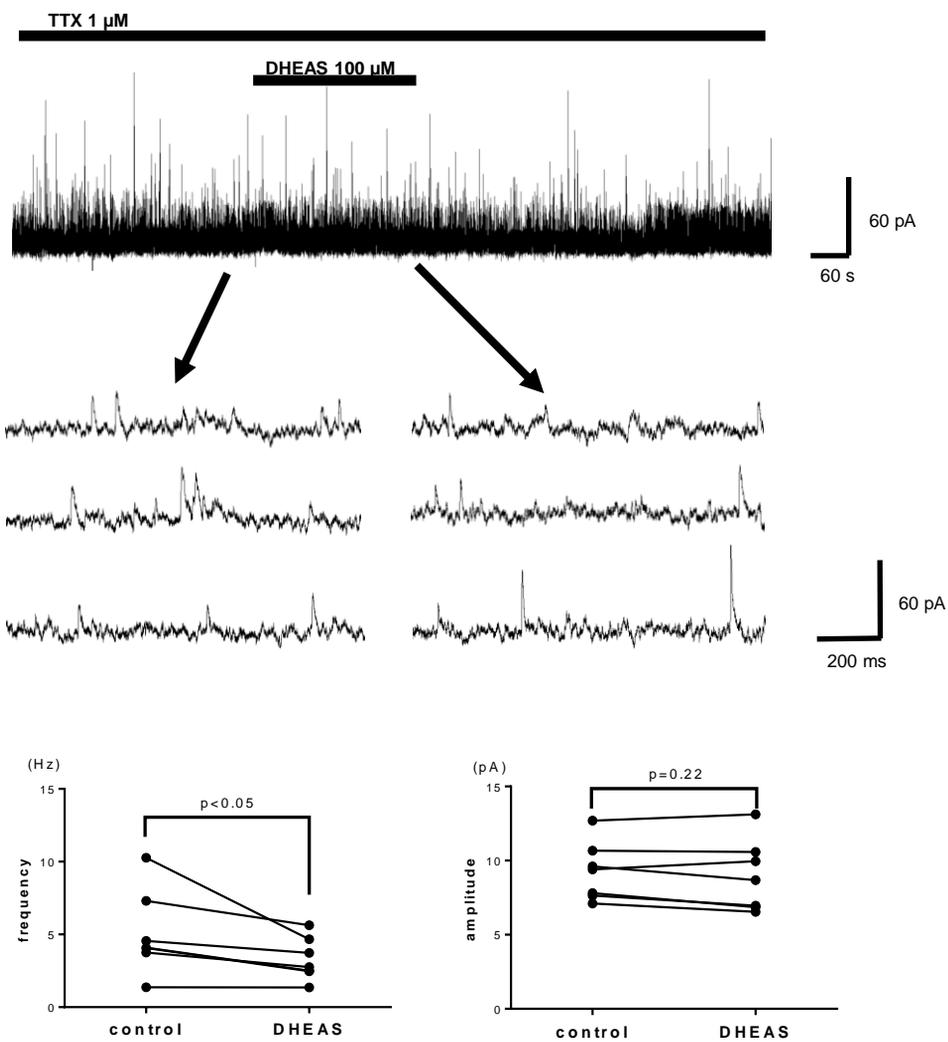


図5 DHEASのm-IPSCに対する作用

DHEAS (100 μM) を灌流投与しm-IPSCの変化を記録した。DHEAS投与前と投与5分後の波形の拡大を中段に示す。下段に7細胞での記録の頻度と振幅の変化とp値を示す。

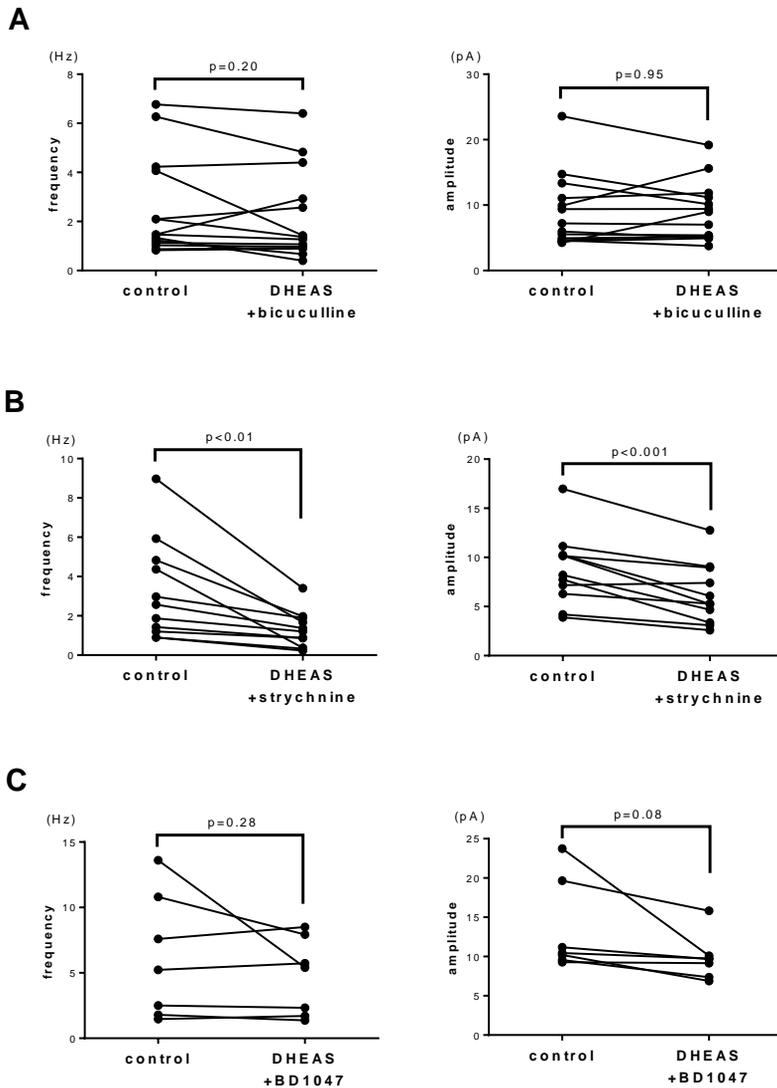


図6 DHEASのGABA_A受容体、グリシン受容体とシグマ1受容体への作用

- (A) 14細胞におけるビククリン (10 μ M) 同時灌流投与時のDHEASによるm-IPSCの頻度と振幅の変化とp値を示す。
- (B) 11細胞におけるストリキニン (2 μ M) 同時灌流投与時のDHEASによるm-IPSCの頻度と振幅の変化とp値を示す。
- (C) 7細胞におけるBD1047 (100 μ M) 同時灌流投与時のDHEASによるm-IPSCの頻度と振幅の変化とp値を示す。