

臼を生じ反復性となった場合には、自家腱(薄筋腱)を用いたMPFL再建術を第一選択とし、ほかの脱臼素因も検討のうえで最終的な手術内容を決定している。

■ 保存療法内容に対する諸家の報告

諸家の報告をみると、固定法はキャストもしくは装具、固定角度は0~30°の膝伸展位、固定期間は3~4週とし、大腿四頭筋訓練は早期から開始しているものが多い。

手術療法

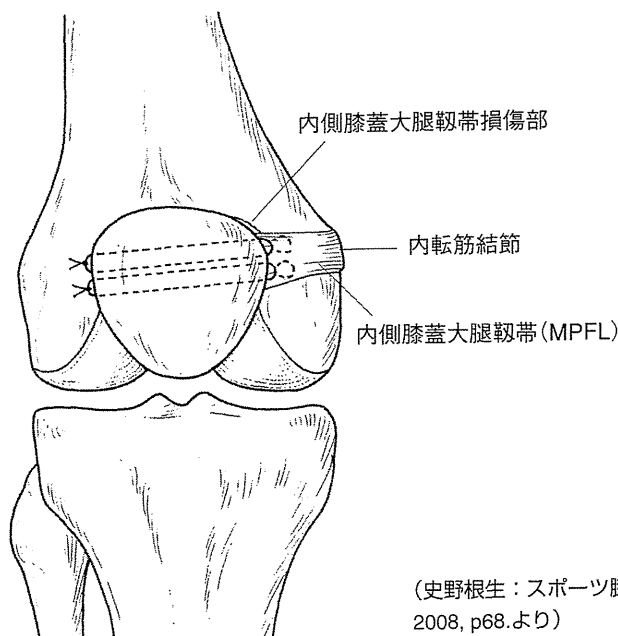
新鮮膝蓋骨脱臼例に対する手術療方は、再脱臼予防目的の手術と合併損傷に対する手術の2つに大別される。再脱臼予防目的の手術は多岐にわたり、これまでに外側支帯解離、内側支帯補強(縫縮)、MPFL修復・再建、内側広筋前内方移行、脛骨粗面移行、Roux-Goldwaite法などが報告されている。しかし、近年、膝蓋骨脱臼に対するprimary stabilizerとしてのMPFLの重要性が認識されるにつれて、新鮮例に対する手術においてもMPFLの修復や再建が増加する傾向にある。

■ MPFL修復

新鮮膝蓋骨脱臼におけるMPFLの損傷形態について、Nomura⁴⁾は実質部損傷であるsubstantial-tear typeと骨付着部剥離損傷であるavulsion-tear typeの2種類があることを報告している。しかし、付着部剥離損傷の部位については、MPFLでは大部分が大腿骨側であるが、内側支持機構の構成体の1つである内側膝蓋半月靭帯(medial patellomeniscal ligament; MPML)は多くが膝蓋骨側で剥離損傷を起こすという報告⁵⁾や、MRIによる解析で若年者ではMPFL損傷の61%が膝蓋骨側の剥離損傷であるという研究⁶⁾もみられるため、術前のMPFL損傷部位の正確な把握が必要である。

実際のMPFL修復では、大腿骨側もしくは脛骨側の付着部剥離損傷に対しては骨片が大きければ解剖学的に整復し、吸収ピンやスクリューにて固定する。骨片が小さい場合は摘出し、大腿骨側ではスーチャーアンカーもしくはスクリューにて固定、膝蓋骨側では膝蓋骨内側縁にpull-out法やスーチャーアンカーを用いて縫縮する(図3)。実質部損傷では、損傷部の一次縫合を行う。また、関節鏡視下に膝蓋骨側の剥離

図3 膝蓋骨側のMPFL損傷に対するpull-out法を用いた修復術



(史野根生：スポーツ膝の臨床, 金原出版, 2008, p68.より)

損傷をスーチャーアンカーにて固定する方法も報告されている⁷⁾。

■ 内側支帯縫縮，内側広筋前方移行

膝蓋骨脱臼に対する近位アライメント矯正で行われる術式である。内側支帯縫縮は既述したMPFL修復とともに内側の補強目的で行われることが多い。MPFL修復後内側支帯を一塊として持ち上げ膝蓋骨内側縁に縫縮することが多いが、内側支帯の一部を弁状としてMPFLに重ね合わせる方法も報告されている⁸⁾ (図4)。内側広筋前内方移行は、MPFL修復後膝蓋骨の制動性が十分でない場合に追加されることが多く、内側広筋の膝蓋骨附着部を切離後膝蓋骨の内側約1/3まで遠位外側へずらして膝蓋骨表面に縫着する(図5)。

■ 外側支帯解離

反復性膝蓋骨脱臼に対する外側支帯解離術単独の成績は、再脱臼もしくは不安定性の残存が30～50%と高く⁹⁾、新鮮例に対しても単独では

なく内側の修復術に合併して行うのがよい。ただし、適応は膝蓋骨の外側偏位が大きく、かつ徒手的に整復した場合に容易に整復できない場合、すなわち外側支帯の緊張が高い例に限定すべきである。外側支帯解離の範囲は、通常外側広筋腱の遠位1/3(膝蓋骨上極の約1横指近位程度)から外側ポータル近傍までとし、関節鏡視下に近位部は鏡視下用電気メスで、遠位部は外側ポータルから剪刀を用いて切離する(図5)。いずれも外側支帯浅層の外側広筋の筋線維が露出するまで解離を行う。

■ 合併損傷に対する手術

❖ 膝蓋骨関節面骨軟骨骨折(図6)

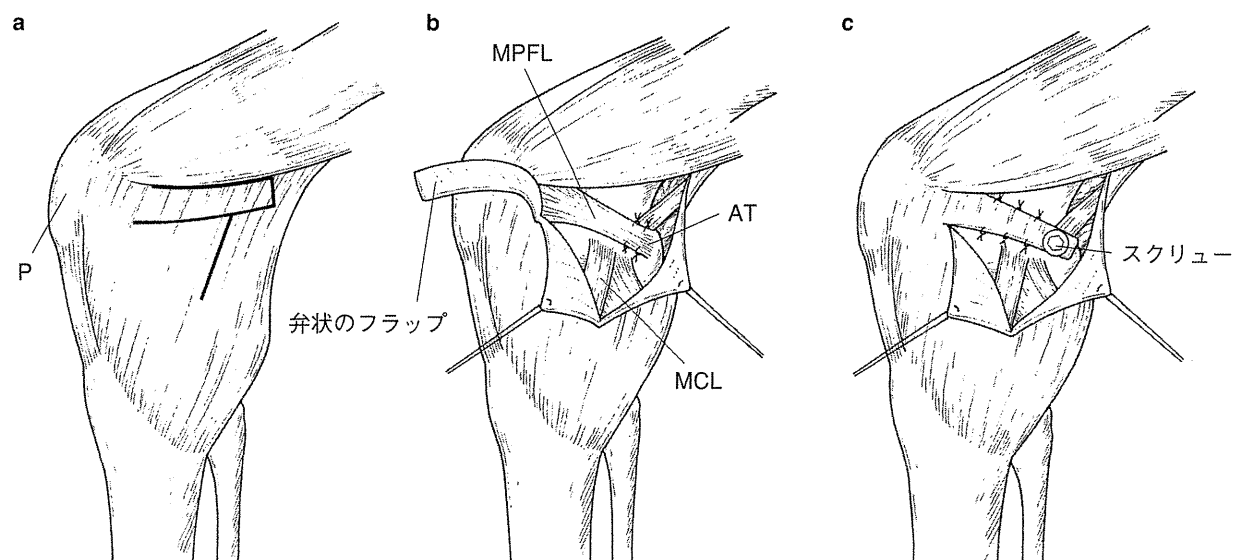
新鮮膝蓋骨脱臼例で、急性期に手術を必要とする頻度が最も多い合併症である。関節切開により骨折部を展開し、骨軟骨片を整復後吸収ピンで固定する。

❖ 脱臼整復不能例

新鮮膝蓋骨脱臼の多くは、医療機関受診時には

図4 内側支帯の一部を弁状フラップとして用いるMPFL修復補強術

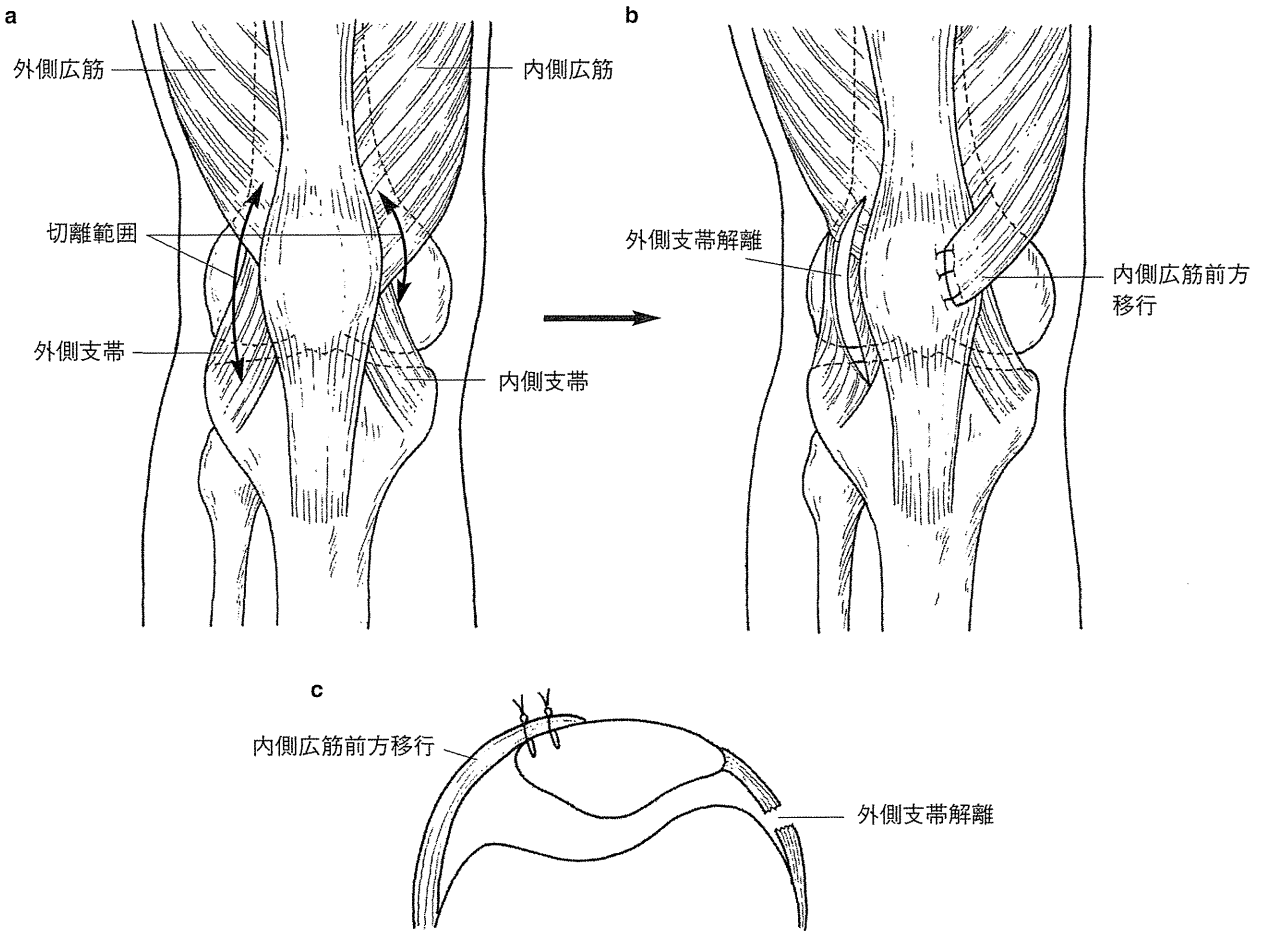
- a: 内側支帯のフラップのデザイン。
 - b: 弁状のフラップをMPFLに重ねて補強。
 - c: 弁状フラップとMPFLの複合体をスクリューにて固定。
- AT: 内転筋結節, P: 膝蓋骨, MCL: 内側側副靭帯



(文献⁸⁾より)

図5 内側広筋前方移行術と外側支帯解離術

- a: 内側広筋は膝蓋骨への付着部で切離する。外側支帯は膝蓋骨上極の1横指近位から外側ポータル近傍まで解離する。
- b: 切離した内側広筋を膝蓋骨の内側1/3まで遠位外側に移動して膝蓋骨に縫着する。
- c: 膝蓋骨軸位でみた内側広筋前方移動と外側支帯解離。



自然に整復されていることが多いが、まれに徒手整復が困難な例があり、この場合には麻酔下もしくは観血的な整復操作が必要になる。整復不能の原因としては、脱臼した膝蓋骨と大腿骨外側顆との間での膝蓋骨の内旋や内側支帯の牽引、骨棘によるインピンジが報告されている^{10),11)}。

新鮮膝蓋骨脱臼に対する保存療法と手術療法の成績比較についての最近の報告

新鮮膝蓋骨脱臼に対する保存療法と手術療法の比較についての報告は、わが国では手術療法に関する少数例の報告があるだけで、多数例の比較研究は渉猟しえた範囲では見あたらない。これに対して、国外では近年手術療法と保存療法を比較検討した無作為化臨床試験(RCT)がみられる^{12)~19)} (表1)。それらによれば、再脱臼の

図6 膝蓋骨関節面骨軟骨骨折を合併した新鮮膝蓋骨脱臼症例

20歳，女性。大学でラクロス中に右膝をひねり受傷。

a：当科受診時X線像。膝蓋骨脱臼を認める。

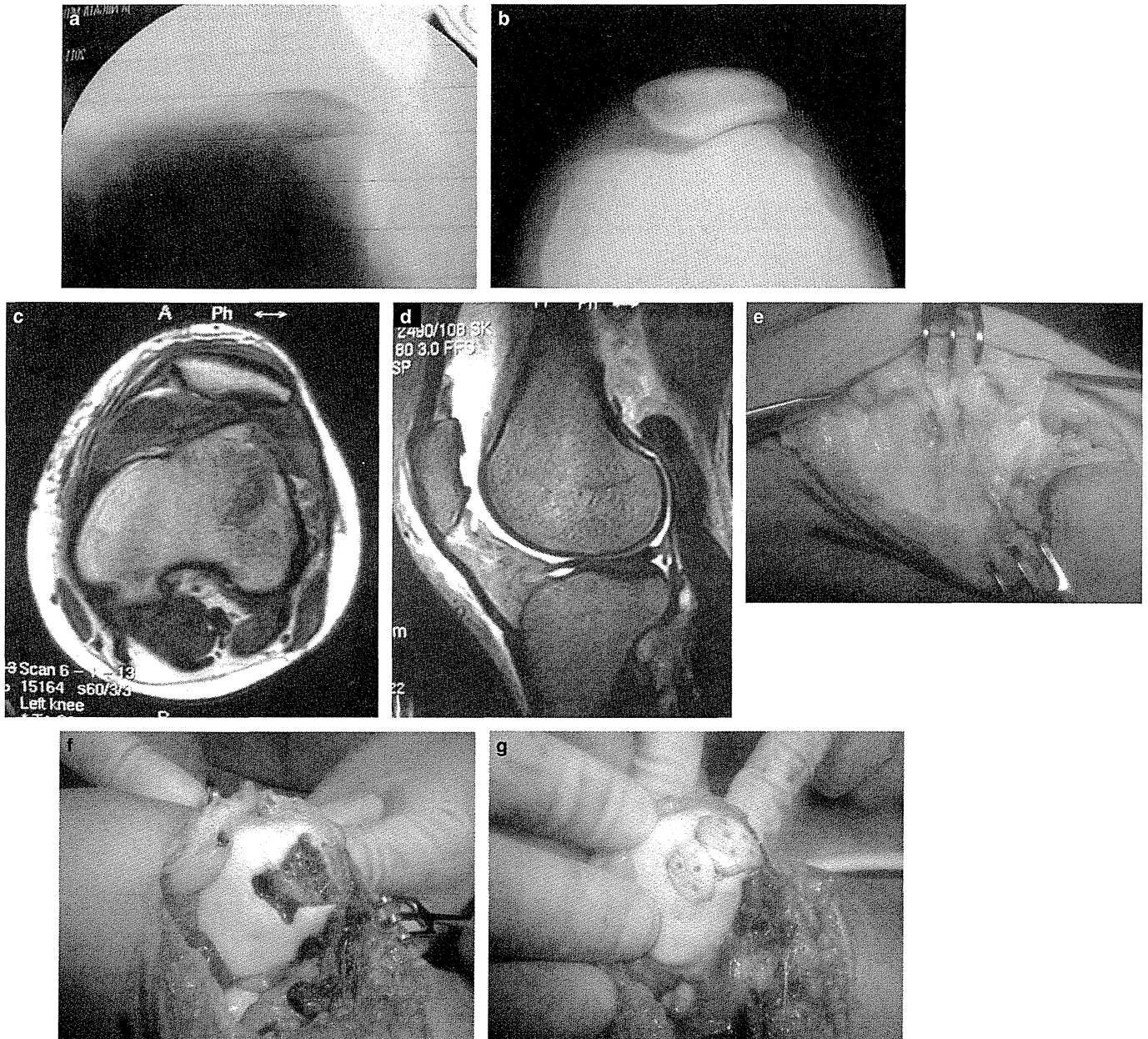
b：麻酔下整復後。

c：MRI横断像。膝蓋骨外側変位，MPFL断裂(実質部)，膝蓋骨関節面の軟骨欠損を認める。

d：MRI矢状断像。膝蓋骨関節面の軟骨欠損を認める。

e：手術時MPFL所見。損傷に伴う実質部の出血がみられる。

f, g：手術時膝蓋骨関節面所見。骨軟骨骨折を認め，整復後吸収ピンにて内固定を行った。



割合については手術療法では0～31%に対し，保存療法では7～50%と報告されており，両者の比較では手術療法のほうが再脱臼が有意に少ないとする報告^{13),15),16),19)}と両者に差がないとい

う報告^{12),14),17),18)}が同様にみられる。したがって，現時点では新鮮膝蓋骨脱臼に対する治療について明確な結論が得られているとはいえず，今後，さらなる検討が必要と思われる。

表1 新鮮膝蓋骨脱臼に対する保存療法と手術療法の臨床成績比較の報告例

研究者	研究デザイン	膝数		平均年齢(歳)		経過期間(年)	手術療法	保存療法	再脱臼率(%)	
		保存	手術	保存	手術				保存	手術
Buchner M (2005) ¹²⁾	nRCT	63	63	21	20	8.1	MPFL再建・外側解離	4週キャスト	27	25
Cash JD (1988) ¹³⁾	nRCT	74	29	22	22	8.0	内側支帯縫縮	1~7週キャスト	36	10
Nikku R (2005) ¹⁴⁾	RCT	57	70	20	20	7.0	内側支帯縫縮	3週キャスト	39	31
Sillanpaa PJ (2009) ¹⁵⁾	RCT	22	18	20	20	7.0	MPFL修復, 内側支帯縫縮	3週装具	39	0
Camanho GL (2009) ¹⁶⁾	RCT	16	17	27	25	3.0	内側支帯縫縮(鏡視下)	3週キャスト	50	0
Apostolovic M (2011) ¹⁷⁾	RCT	23	14	14	13	6.1	内側支帯縫縮(鏡視下), 外側解離	3週キャスト	7	8
Christiansen SE (2008) ¹⁸⁾	RCT	35	42	20	20	2.0	MPFL修復	2週装具	20	17
Bitar AC (2011) ¹⁹⁾	RCT	21	20	25	23	4.0	MPFL修復	3週装具	35	0

文献

- 1) Hawkins RJ, et al : Acute patellar dislocations : The natural history. Am J Sports Med, 14 : 117-120, 1986.
- 2) McManus F, et al : Acute dislocation of the patella in children : The natural history. Clin Orthop, 139 : 88-91, 1979.
- 3) 大森 豪ほか : 膝蓋骨脱臼に対する保存療法. 関節外科, 25 : 36-39, 2006.
- 4) Nomura E : Classification of the lesions of the medial patellofemoral ligament in patellar dislocation. Int Orthop, 23 : 260-263, 1999.
- 5) 高原康弘ほか : 初回膝蓋骨脱臼における内側支持機構の損傷形態について. 膝, 33 : 229-232, 2008.
- 6) Christopher K, et al : Zone of injury of the medial patellofemoral ligament after acute patellar dislocation in children and adolescents. Am J Sports Med, 39 : 1444-1449, 2011.
- 7) 洞口 敬ほか : 外傷性膝蓋骨脱臼に対する関節鏡視下内側膝蓋大腿靭帯修復術の短期成績. 膝, 30 : 87-91, 2005.
- 8) 野村栄貴ほか : 新鮮膝蓋骨脱臼に伴う合併損傷とその治療. 膝関節鏡下手術, 吉矢晋一編. 文光堂, 東京, 2010, p111-116.
- 9) Clifton R, et al : What is the role of lateral retinacular release? J Bone Joint Surg, 92-B : 1-6, 2010.
- 10) Michels F, et al : Locked patellar dislocation : a case report. Journal of Medical Case Reports, 2 : 371-373, 2008.
- 11) 緑川雄貴ほか : 観血的整復を要した新鮮膝蓋骨脱臼の1例. 東北整災誌, 54 : 57-60, 2010.
- 12) Buchner M, et al : Acute traumatic primary patellar dislocation. Long-term results comparing conservative and surgical treatment. Clin J Sport Med, 15 : 62-66, 2005.
- 13) Cash JD, et al : Treatment of acute patellar dislocation. Am J Sports Med, 16 : 244-249, 1988.
- 14) Nikku R, et al : Operative treatment of primary patellar dislocation does not improve medium-term outcome. A 7-year report and risk analysis of 127 randomized patients. Acta Orthop, 76 : 699-704, 2005.
- 15) Sillanpää PJ, et al : Treatment with and without initial stabilizing surgery for primary traumatic patellar dislocation. A prospective randomized study. J Bone Joint Surg, 91-A : 263-270, 2009.
- 16) Camanho GL, et al : Conservative versus surgical treatment for repair of the medial patellofemoral ligament in acute dislocation of the patella. Arthroscopy, 25 : 620-625, 2009.
- 17) Apostolovic M, et al : Acute patellar dislocation in adolescents : operative versus nonoperative treatment. Int Orthop, 35 : 1483-1487, 2011.
- 18) Christiansen SE, et al : isolated repair of the medial patellofemoral ligament in primary dislocation of the patella : A prospective randomized study. Arthroscopy, 24 : 881-887, 2008.
- 19) Bitar AC, et al : Traumatic patellar dislocation. Non operative treatment compared with MPFL reconstruction using patellar tendon. Am J Sports Med, 40 : 114-122, 2012.

脊髄膠様質細胞の興奮性シナプス伝達に対する活性酸素の作用 —インビボ・パッチクランプ法による解析—

海戸 弥恵¹⁾ 西尾 尚子²⁾ 谷口 亘¹⁾ 瀧口 登¹⁾
宮崎 展行¹⁾ 前中 悠加¹⁾ 中塚 映政²⁾ 吉田 宗人¹⁾

和歌山県立医科大学整形外科¹⁾
関西医療大学保健医療学部疼痛医学分野²⁾

In vivo patch-clamp analysis of reactive oxygen species actions on excitatory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons

Yae Kaito¹⁾, Naoko Nishio²⁾, Wataru Taniguchi¹⁾, Noboru Takiguchi¹⁾,
Nobuyuki Miyazaki¹⁾, Yuka Maenaka¹⁾, Terumasa Nakatsuka²⁾,
Munehito Yoshida¹⁾

¹⁾Department of Orthopedic Surgery, Wakayama Medical University

²⁾Pain Research Center, Kansai University of Health Sciences

Key Words : reactive oxygen species, spinal dorsal horn, excitatory transmission, pain,
in vivo patch-clamp

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are byproducts of normal cellular metabolism. Excessive level of ROS, which cannot be decomposed by various enzymes and non-enzymatic molecules is involved in many disease. Recent evidence suggests that ROS in spinal cord plays a critical role in persistent neuropathic and inflammatory pain. To investigate ROS involvement in central sensitization in detail, we examined the effects of ROS donors, tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) on excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons of adult rat spinal cord by in vivo whole-cell patch-clamp methods. In the voltage-clamp mode ($V_H = -70$ mV), the application of t-BOOH markedly increased the frequency and amplitude of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs). In the presence of a non-NMDA receptor antagonist, CNQX, t-BOOH did not generate any sEPSCs. These results sug-

gest that ROS affects presynaptic terminals on SG neurons and enhance glutamate release.

【はじめに】

活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) は酸素分子に由来する、反応性の高い、一連の活性分子種である。ROS にはラジカルとラジカルでないものが含まれ、フリーラジカルである $O_2^{\cdot-}$, OH^{\cdot} , 非ラジカルである H_2O_2 などは組織細胞レベルに影響を及ぼすとみられている。ROS は生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生するが、酵素による分解などの抗酸化機構によって生体内に蓄積されないよう制御されている。一方、病的状態において、ROS の産生増加や抗酸化機構の破綻によって細胞内の ROS が増加し、酸化ストレスをもたらす。ROS は癌、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病や代謝性疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患といった、様々な疾病の病因となることが示唆されている。また、慢性疼痛においても、ROS が脊髄レベルで疼痛情報の伝達に関与していることが数多く報告されている。ラット脊髄スライス標本を用いた実験では、ROS が脊髄のシナプス伝達における長期増強の発生と維持に関与していることが示されている¹。また、脊髄神経結紮による神経障害性疼痛モデルラットを用いた実験では ROS Scavenger (消去剤) である PBN を投与すると機械痛覚過敏が抑制されることや、エダラボンの投与によって脊髄後根神経節細胞の H_2O_2 誘発性過分極が減少し、鎮痛効果が得られることが報告されている^{2,3}。さらに、足底にカプサイシンを投与した炎症性疼痛モデルマウスでは、ROS Scavenger である PBN やテンポールの髄腔内投与が二次性の機械痛覚過敏を抑制することが明らかになっており⁴、これらの研究結果から ROS が脊髄における中枢性感作に深く関与していることが示唆されている。これらの疼痛モデルではグルタミン酸受容体の活性化を介して、脊髄におけるミトコンドリアでの ROS 産生が増加していると考えら

れている⁵。このように、慢性疼痛における ROS の脊髄レベルでの関与が指摘されているが、そのシナプス伝達における詳細なメカニズムは未だ明らかではない。今回、我々は成熟ラットの脊髄膠様質細胞にインビボ・パッチクランプ法を適用し、ROS ドナーである tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) が興奮性シナプス伝達に及ぼす作用について検討したので報告する。

【方法】

1. ラット脊髄 in vivo 標本の作製

ラット脊髄 in vivo 標本の作製は吉村らの方法⁶に従った。5~6 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により行なった。胸腰椎部で背側に皮切を行ない、傍脊柱筋群を切除した。脊椎を露出し、Th 12~L2 まで椎弓切除を行なった。この状態でラットを脊髄固定器に固定した。まず、イヤーバー及び中胸椎部と下位腰椎部で 3 点固定し、皮切部の辺縁を錘で 4 方向に引き上げることでプールを作製し、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, $CaCl_2$ 2.5 mM, $MgCl_2$ 1.2 mM, NaH_2PO_4 1.2 mM, glucose 11 mM, $NaHCO_3$ 25 mM) で灌流した。実体顕微鏡下で硬膜を縦切開・切除し、後根を露出し、腰膨大部レベルで後根を内外側に分け、電極を刺入するスペースを作製した。ここ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 点を固定した。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、くも膜と軟膜を切除し、記録の準備を行なった。

2. 神経細胞からのパッチクランプ記録法

先端電極抵抗 8~12 M Ω の微小電極に電極内液 (potassium gluconate 135 mM, KCl 5 mM, $CaCl_2$ 0.5 mM, $MgCl_2$ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-

Mg 5 mM, HEPES-KOH 5 mM) を充填し、マイクロマンピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、ブラインド・ホールセル・パッチクランプ法によって記録を行なった。薬液の灌流は人工脳脊髄液と同じラインを用いて行なった。興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic currents: EPSC) は、 -70 mV の保持膜電位で記録した。得られた応答はパッチクランプ用増幅器 (Molecular Devices 社 Axopatch 200 B) により増幅され、A/D 変換 (Molecular Devices 社 Digidata 1440 A) 後、データ記録及び解析用ソフトウェア (Molecular Devices 社 Mini Analysis 6.0) を用いてコンピュータにより記録・解析した。実験結果は平均 \pm 標準誤差で表し、検定は paired t-test で行ない、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。括弧内の n の値は記録した細胞数を示す。

【結果】

膜電位固定下 (-70 mV) では、記録した全ての細胞において自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current: sEPSC) が観察された。ROS ドナーである t-BOOH (10 mM) を 5 分間灌流投与すると、記録した全ての膠様質細胞で、sEPSC の発生頻度ならびに振幅が有意に増加した (Fig. 1, 2)。t-BOOH 投与後の sEPSC の発生頻度ならびに振幅は、それぞれコントロールの $158.1 \pm 18.0\%$ 、 $155.8 \pm 12.2\%$ であった ($n=10$)。また、t-BOOH によって sEPSC の発生頻度ならびに振幅が増加した細胞に、25 分後に再び、t-BOOH を灌流投与したところ、初回投与と同程度に sEPSC の発生頻度ならびに振幅が増加した (Fig. 3)。2 回目の t-BOOH 投与後の sEPSC の発生頻度ならびに振幅は、それぞれコントロールの $153.1 \pm 14.0\%$ 、 $142.5 \pm 6.7\%$ であった ($n=5$)。一方、non-NMDA 受容体拮抗薬である、CNQX (20 μ M) を 5 分間単独投与したところ、sEPSC は完全に消失し、続いて、CNQX 存在下で t-BOOH を投与しても sEPSC は観察されなかった ($n=10$, Fig. 4)。

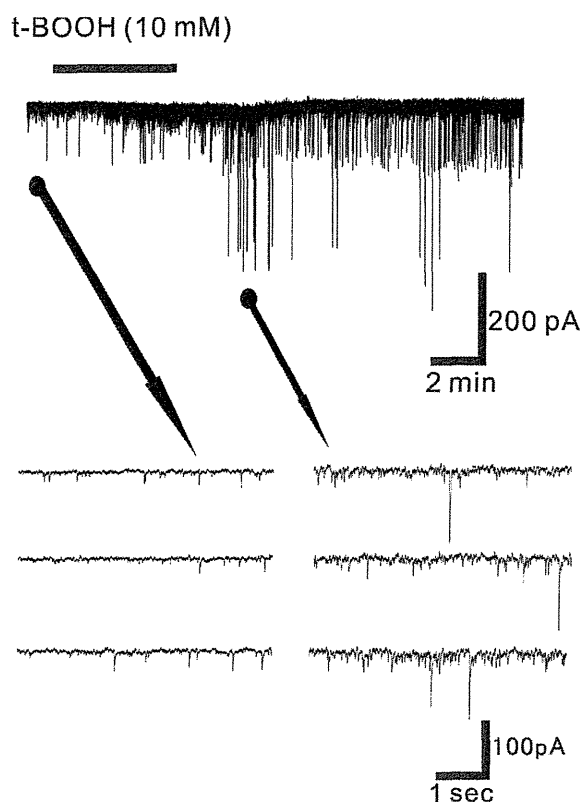


Fig. 1 Effect of tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) on excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons. A continuous chart recording of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) before and during the application of t-BOOH (10 mM: upper). Three consecutive traces of sEPSCs are shown in an expanded scale in time, before (lower left) and during the application of t-BOOH (lower right). In the voltage-clamp mode ($V_H = -70$ mV), the application of t-BOOH markedly increased the frequency and amplitude of sEPSCs.

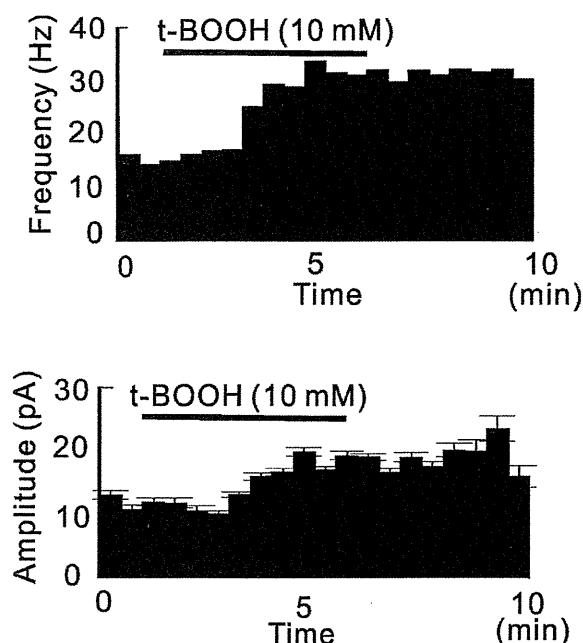


Fig. 2 Effect of t-BOOH on the frequency and amplitude of sEPSCs. The frequency (upper) and amplitude (lower) of sEPSCs obtained from the same neuron as in Fig. 1 were plotted against time.

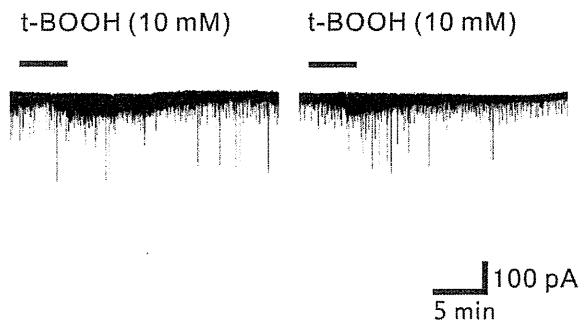


Fig. 3 Effect of a repeated application of t-BOOH on sEPSCs. Recording of sEPSCs in the absence and presence of t-BOOH (10 mM) in its first (left) and second application (right) from the same neuron. The application of t-BOOH markedly increased the frequency and amplitude of sEPSCs. When t-BOOH was again applied 25 min later, the frequency and amplitude of sEPSCs also increased. $V_H = -70$ mV

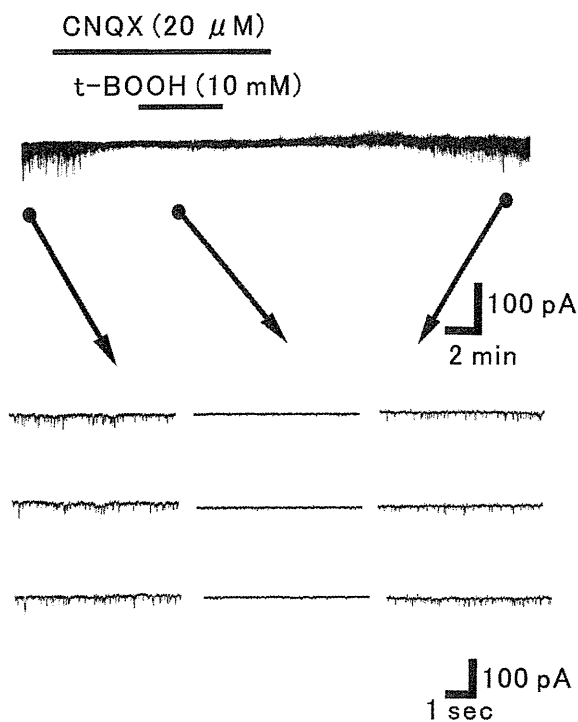


Fig. 4 Effect of t-BOOH on sEPSCs in the presence of CNQX (20 μ M). A continuous chart recording of sEPSCs before and during the application of t-BOOH (10 mM) in the presence of CNQX (upper). Three consecutive traces of sEPSCs are shown in an expanded scale in time, before (lower left), during the application of t-BOOH in the presence of CNQX (lower middle) and after wash out of CNQX (lower right). In the presence of CNQX, t-BOOH did not generate any sEPSCs. $V_H = -70$ mV

【考察】

末梢で発生した痛み情報は電気シグナルとして一次求心性線維によって脊髄膠様質に伝えられる。電気シグナルが脊髄膠様質に伝播すると一次求心性線維の中枢端に存在するシナプス小胞に含まれる興奮性神経伝達物質がシナプス間隙に開口分泌され、膠様質細胞の膜に存在する神経伝達物質受容体へ作用することで、再び電気シグナルが発生し、痛み情報が伝えられる。シナプス伝達は神経活動や様々な内因性物質によって修飾されており、痛み情報の伝達に重要な役割を果たしている。本研究では、慢性疼痛への関与が指摘されているROSが脊髄膠様質細胞の興奮性シナプス伝達に対し、どのような作用を及ぼすかについて、インビボ・パッチクランプ法を用いて検討した。インビボ・パッチクランプ法は麻酔下で、ラット脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行なう方法であり、スライス標本に比べて細胞の状態が良く、安定した記録が可能であり、微小シナプス応答の解析も容易である。また、薬理学的な解析に加え、生理的な感覚刺激によって誘起されたシナプス応答を単一細胞レベルで解析できるという利点がある。in vitroの実験から得られた結果だけでは、様々な生理活性物質が生体内においてどのような役割を果たしているか、単純に演繹して説明することはできないが、本方法は行動薬理学的研究とスライス標本を用いた実験との中間に位置し、生理機能に関わるシナプス応答の詳細な解析が可能である⁶。

今回、ROSドナーであるt-BOOHを灌流投与すると、記録した全ての膠様質細胞においてsEPSCの発生頻度ならびに振幅が有意に増加した。このt-BOOHによるsEPSCの増強作用は可逆的で再現性を有しており、脱感作は観察されなかった。過剰なROSは神経細胞を障害することが知られているが⁷、マウスにt-BOOHを髄腔内投与したところ、痛覚過敏は一時的なものであったとする報告もあり⁴、痛み情報の伝達におけるROSの作用は永久的な細胞の障害によるものではないと考えられる。次に、

CNQX存在下でt-BOOHを灌流投与したところ、sEPSCは観察されなかったことから、t-BOOHは一次求心性線維中枢端に作用して、興奮性伝達物質であるグルタミン酸の放出を促すことで、sEPSCを増強することが明らかとなった。

グルタミン酸の遊離増強作用にはTRPチャネルの活性化が関与していると考えられる。TRPチャネルはカルシウム透過性の非選択性カチオンチャネルであり、TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP, TRPAの7つのサブファミリーに大別される。現在、痛み受容に関わることが示唆されているTRP受容体はTRPV1, V2, V3, V4, M8, A1で、いずれも特異的な温度感受性がある。TRPチャネルは一次求心性神経の末梢端に発現することが知られているが、我々は脊髄スライス標本の膠様質細胞にパッチクランプ法を適用し、TRPA1やTRPV1が一次求心性神経中枢端にも存在し、その活性化によって末梢からの痛み情報を脊髄レベルで増幅することを明らかにしている⁸。近年、TRPチャネルが外因性刺激物質に加え、ROSによっても活性化され、細胞内にカルシウムが流入し、細胞内シグナル伝達を修飾することが明らかになっている。in vitroの実験においてはROSがTRPV1を感作することが示されている⁹。また、マウスの感覚神経においてROSがTRPA1を活性化し、細胞内にカルシウムの流入を引き起こすこと、TRPA1ノックアウトマウスではROSによる疼痛行動がみられないことなどが報告されている¹⁰⁻¹²。

以上のことから、ROSは脊髄膠様質細胞に入力している一次感覚神経中枢端に存在するTRPチャネルを活性化し、細胞内にカルシウムの流入を引き起こすことで、グルタミン酸の遊離を増強することが示唆される。このようなROSによるsEPSCの増強作用は中枢性の痛覚過敏を引き起こし、慢性疼痛の発生や持続に深く関与していると考えられる。

【結語】

インビボ・パッチクランプ法を用いて、脊髄

膠様質細胞の興奮性シナプス伝達に対する ROS の作用について検討した。ROS は一次求心性線維中枢端に作用して、グルタミン酸の放出を促し、sEPSC を増強することが明らかになった。脊髄における ROS は痛み情報の増幅に関与し、中枢性の痛覚過敏の一因となる可能性が示唆された。

【文献】

1. Kwan YL, Kyungsoon C, Jin MC : Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol* 103 : 382 – 391, 2010
2. Kim HK, Park SK, Zhou JL, et al : Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111 : 116 – 124, 2004
3. Mao YF, Yan N, Xu H, et al : Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. *Brain Res* 1248 : 68 – 75, 2009
4. Erica SS, Inhyung L, Kyungsoon C, et al : Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138 : 514 – 524, 2008
5. Hee YK, Jin MC, Kyungsoon C : Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice : The effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett* 447 : 87 – 91, 2008
6. 吉村 恵、古江秀昌、加藤 剛、他 : In Vivo パッチクランプ記録法の薬理学への応用. *日薬理誌* 124 : 111 – 118, 2004
7. Abe K, Saito H : Characterization of t-butylhydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Pharmacol Toxicol* 83 : 40 – 46, 1998
8. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, et al : Activation of TRPA 1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 27 : 4443 – 4451, 2007
9. Klara S, Karolina T, Ladislav V, et al : Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV 1) current. *Mol Pharmacol* 70 : 383 – 394, 2006
10. Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, et al : Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci* 27 : 1131 – 1142, 2008
11. Bret FB, Michael S, Christian AVH, et al : TRPA 1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 118 : 1899 – 1910, 2008
12. David AA, Clive G, Sian M, et al : Transient receptor potential A 1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28 : 2485 – 2494, 2008

脊髄膠様質細胞における抑制性シナプス伝達に対する 活性酸素の作用

前中 悠加¹⁾ 西尾 尚子²⁾ 杉村 弥恵¹⁾ 谷口 亘¹⁾
瀧口 登¹⁾ 清行 康邦²⁾ 松川 澄²⁾ 宮崎 展行¹⁾
中塚 映政²⁾ 吉田 宗人¹⁾

和歌山県立医科大学整形外科¹⁾

関西医療大学保健医療学部疼痛医学分野²⁾

Patch-clamp analysis of reactive oxygen species actions on inhibitory synaptic transmission in spinal substantia gelatinosa neurons

Yuuka Maenaka¹⁾, Naoko Nishio²⁾, Yae Sugimura¹⁾, Wataru Taniguchi¹⁾,
Noboru Takiguchi¹⁾, Yasukuni Kiyoyuki²⁾, Sumi Matsukawa²⁾,
Nobuyuki Miyazaki¹⁾, Terumasa Nakatsuka²⁾, Munehito Yoshida¹⁾

¹⁾Department of Orthopedic Surgery, Wakayama Medical University

²⁾Pain Research Center, Kansai University of Health Sciences

Key Words : reactive oxygen species, spinal dorsal horn, inhibitory transmission, pain,
patch-clamp

Abstract

Reactive oxygen species (ROS) are molecular species which come from O₂ generated in intravital energy metabolism and the phylaxis process, and are highly-reactive. Two common examples of ROS are super-oxide (O₂⁻) and hydrogen peroxide (H₂O₂). ROS are absolutely necessary to maintain life, but it is thought that surplus ROS which cannot be fully degraded by intracellular enzymes cause various disorders such as cancer or arteriosclerosis. Recent studies have suggested that ROS are involved in chronic pain such as neuropathic pain or inflammatory pain in the spinal cord. For instance, it has been reported that ROS participate in long term potentiation in the spinal dorsal horn and are contributing factors of secondary hyperalgesia. However, the cellular mechanism of ROS are still unclear in the dorsal horn of the spinal cord. To address this issue, we investigated the effect of ROS on inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons of adult rat spinal cord slices by

using the whole-cell patch-clamp technique. A ROS donor, tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH), superfused for 5 min markedly increased the frequency of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC). The tetrodotoxin (TTX) and t-BOOH did not induce the increase in frequency and amplitude of miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSC). Moreover, in the presence of a glutamate receptor antagonist, CNQX and D-AP 5, t-BOOH did not increase the sIPSC. In the presence of a GABAA receptor antagonist, bicuculline and a glycine receptor antagonist, strychnine, t-BOOH did not generate any sIPSC. These results indicate that ROS enhance not only excitatory synaptic transmission but also inhibitory synaptic transmission in the spinal dorsal horn.

【はじめに】

活性酸素種 (reactive oxygen species: ROS) は酸素分子に由来する、反応性の高い、一連の活性分子種である。ROSにはラジカルとラジカルでないものが含まれ、フリーラジカルである $O_2^{\cdot-}$ 、 OH^{\cdot} 、非ラジカルである H_2O_2 などは組織細胞レベルに影響を及ぼすとみられている。ROSは生体内のエネルギー代謝や感染防御過程において発生するが、酵素による分解などの抗酸化機構によって生体内に蓄積されないよう制御されている。一方、病的状態において、ROSの産生増加や抗酸化機構の破綻によって細胞内のROSが増加し、酸化ストレスをもたらす。ROSは癌、動脈硬化、糖尿病などの生活習慣病や代謝性疾患、アルツハイマー病などの神経変性疾患といった、様々な疾病の病因となることが示唆されている。また、慢性疼痛においても、ROSが脊髄レベルで疼痛情報の伝達に関与していることが数多く報告されている。ラット脊髄スライス標本を用いた実験では、ROSが脊髄のシナプス伝達における長期増強の発生と維持に関与していることが示されている¹。また、脊髄神経結紮による神経障害性疼痛モデルラットを用いた実験ではROS scavenger (消去剤)である phenyl-N-tert-butyl-nitron (PBN) を投与すると機械痛覚過敏が抑制されることや、同じく scavenger の一種である Edaravon の投与に

よって脊髄後根神経節細胞の H_2O_2 誘発性過分極が減少し、鎮痛効果が得られることが報告されている^{2,3}。さらに、足底にカプサイシンを投与した炎症性疼痛モデルマウスでは、ROS scavenger である PBN や 4-hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl (TEMPOL) の髄腔内投与が二次性の機械痛覚過敏を抑制することが明らかになっており⁴、これらの研究結果からROSが脊髄における中枢性感作に深く関与していることが示唆されている。これらの疼痛モデルではグルタミン酸受容体の活性化を介して、脊髄におけるミトコンドリアでのROS産生が増加していると考えられている⁵。このように、慢性疼痛におけるROSの脊髄レベルでの関与が指摘されているが、そのシナプス伝達における詳細なメカニズムは未だ明らかではない。前回の本研究会において我々は、ROSである tert-butylhydroperoxide (t-BOOH) が膠様質細胞の興奮性シナプス伝達に対して、自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度・振幅を増加させることを報告した。

本研究では、t-BOOHが抑制性シナプス伝達に及ぼす作用について検討したので報告する。

【方法】

1. 脊髄横断スライス標本の作製

脊髄横断スライス標本の作製は、Yoshimura

らの方法に従って行った⁶。5~6週齢の Sprague-Dawley 系成熟雄性ラットにウレタン（腹腔内投与：1.2~1.5 g/kg）で深麻酔後、背側の胸腰椎部に皮切を行った。エピネフリン添加 0.5% キシロカイン液を棘突起の両側に局注後、傍脊柱筋群を切離し脊椎を露出した。中位胸椎から下位腰椎まで椎弓切除を行った。神経根を切離しながら脊髄を摘出し、酸素負荷した 2~4℃ の人工脳脊髄液に浸した。摘出した脊髄を実体顕微鏡下に硬膜、前根、後根、クモ膜及び軟膜を除去し、溝を設けた寒天ブロックに設置した。マイクロスライサー（堂阪イーエム社 DTK-1000）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。腰膨大部の脊髄スライスを記録用チャンバーに移し、グリッドにて上方から軽く固定した後、酸素負荷した人工脳脊髄液で還流した。人工脳脊髄液の組成は、NaCl 117 mM, KCl 3.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 11 mM, NaHCO₃ 25 mM であった。

2. 脊髄膠様質細胞からのパッチクランプ記録

膠様質は、脊髄スライスに下方から透過光を当て、実体顕微鏡下（20~40倍）において観察すると後角の灰白質部表層に位置する半透明なバンド状として視認できる。膠様質細胞からブラインド・ホールセル・パッチクランプ法により膜電位固定下で膜電流記録を行った。ガラス電極は、入力抵抗が 8~15 MΩ のものを用い、その内液組成は Cs₂SO₄ 110 mM, TEA 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, MgCl₂ 2 mM, EGTA 5 mM, ATP-Mg 5 mM, HEPES-KOH 5 mM であった。

薬液の灌流は人工脳脊髄液と同ラインを用いて行った。抑制性シナプス後電流（inhibitory postsynaptic current; IPSC）は、0 mV の保持膜電位で記録した。得られた応答はパッチクランプ用増幅器（Molecular Devices 社 Axopatch 200 B）により増幅され、A/D 変換（Molecular Devices 社 Digidata 1440 A）後、データ記録及び解析用ソフトウェア（Molecular Devices 社 pClamp 10, Synaptosoft 社 Mini Analysis 6.0）を

用いてコンピュータにより記録・解析した。実験結果は平均±標準誤差で表し、検定は paired t-test で行い、危険率 5%（P<0.05）をもって有意と判定した。括弧内の n の値は記録した細胞の数である。使用した薬物について、t-BOOH、TTX、PBN、D-AP 5 は Sigma-Aldrich、CNQX は和光純薬、HC-030031 はコスモ・バイオ株式会社から購入した。

【結果】

膜電位固定下（0 mV）では、記録した全ての細胞において自発性抑制性シナプス後電流（spontaneous inhibitory postsynaptic current: sIPSC）が観察された。ROS である t-BOOH（10 mM）を 5 分間灌流投与すると、記録した膠様質細胞で sIPSC の発生頻度が有意に増加した（Fig. 1, 2）。t-BOOH 投与後の sIPSC の発生頻度ならびに振幅は、それぞれコントロールの 246.9±52.8%、101.7±9.8% であった（n=11）。一方、グルタミン酸受容体拮抗薬である CNQX（20 μM）と D-AP 5（50 μM）存在下では、sIPSC の有意な増加はみられなかった（n=5）。GABA_A、グリシン受容体拮抗薬である bicuculline（20 μM）と strychnine（2 μM）存在下

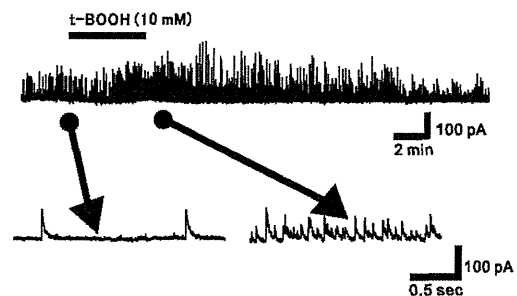


Fig. 1 Effect of tert-butyl hydroperoxide (t-BOOH) on inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons. A continuous chart recording of spontaneous inhibitory postsynaptic currents (sIPSC) before and during the application of t-BOOH (10 mM). In the voltage-clamp mode ($V_H=0$ mV), the application of t-BOOH markedly increased the frequency of sIPSC.

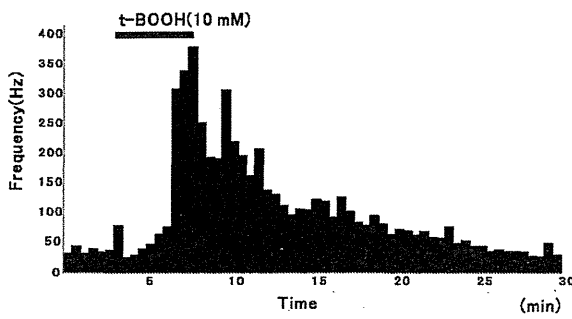


Fig. 2 Effect of t-BOOH on the frequency of sIPSC. The frequencies of sIPSC obtained from the same neuron in Fig. 1 were plotted against time.

では、sIPSC は完全に消失し、t-BOOH を投与しても sIPSC は観察されなかった (n=5, Fig. 3)。また、抗酸化剤である N-tert-Butyl- α -phenylnitron (PBN, 10 mM) 存在下 (n=5)、TRPA1 拮抗薬 HC-030031 存在下 (n=5) では、t-BOOH 投与による sIPSC の発生頻度ならびに振幅の程度に有意差は見られなかった。さらに、電位依存性ナトリウムチャンネル阻害薬である tetrodotoxin (TTX, 1 μ M) 存在下においても微小抑制性シナプス後電流 (miniature inhibitory postsynaptic current: mIPSC) の発生頻度ならびに振幅に有意差が見られなかった (n =5)。

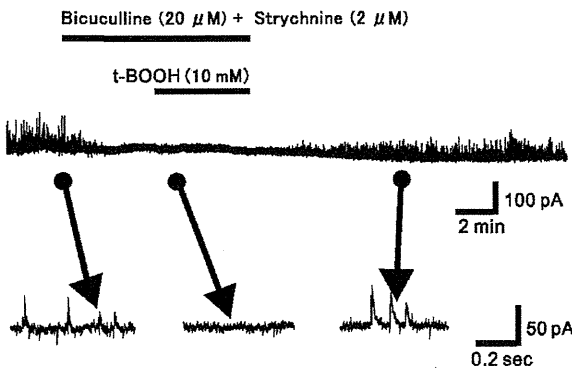


Fig. 3 Effect of t-BOOH on sIPSC in the presence of bicuculline (20 μ M) and strychnine (2 μ M). In the presence of bicuculline and strychnine, t-BOOH did not generate any sIPSC. $V_H=0$ mV.

【考察】

末梢で発生した痛み情報は電気シグナルとして一次求心性線維によって脊髄膠様質に伝えられる。電気シグナルが脊髄膠様質に伝播すると一次求心性線維の中枢端に存在するシナプス小胞に含まれる興奮性神経伝達物質がシナプス間隙に開口分泌され、膠様質細胞の膜に存在する神経伝達物質受容体へ作用することで、再び電気シグナルが発生し、痛み情報が伝えられる。シナプス伝達は神経活動や様々な内因性物質によって修飾されており、痛み情報の伝達に重要な役割を果たしている。本研究では、慢性疼痛への関与が指摘されている ROS が脊髄膠様質細胞の抑制性シナプス伝達に対し、どのような作用を及ぼすかについて、ブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を用いて検討した。

今回、ROS である t-BOOH を灌流投与すると、記録した膠様質細胞において sIPSC の発生頻度が有意に増加した。しかし、TTX 存在下において ROS は mIPSC を増強させなかった。このことから抑制性ニューロンの神経終末には直接 ROS が作用しないと考えられる。一方、昨年報告したように ROS は自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current: sEPSC) の頻度・振幅を強く増強させる。さらに TTX 存在下における微小興奮性シナプス後電流 (miniature excitatory postsynaptic current: mEPSC) も増強させるので、ROS は記録しているニューロンに投射する興奮性ニューロンの神経終末に直接作用していると考えられた。また今回の研究では非 NMDA 受容体拮抗薬の CNQX, NMDA 受容体拮抗薬の D-AP 5 存在下において ROS により sIPSC は増加しなかった。以上の結果から、ROS はまず興奮性ニューロンを興奮させ、この興奮が抑制性ニューロンに伝播し、GABA やグリシンを放出させることで sIPSC を増加させる二次的な反応と考えられた。このように ROS は直接的に興奮性、間接的に抑制性のいずれの作用も増強させるが、どちらにより一層強く働くかは個々のニューロンにおける興奮性と抑制性のバランスによって

決まるものと考えられる。しかし、ROSの全般的な脊髄内での作用としては、ROSを髄内注射した場合の動物行動学的実験⁴から興奮性に作用すると思われる。今後の検討課題として、個々のニューロンの興奮性と抑制性を同定して、その作用を比較する必要があると考えている。ROSが、神経傷害性疼痛や炎症性疼痛に関与していることは数多く報告されている。これは、何らかの機序でROSが過剰に生成され、脊髄内が病的な状況になっていると考えられる。過剰なROSは神経細胞を障害することが知られているが⁷、マウスにt-BOOHを髄腔内投与したところ、痛覚過敏は一時的なものであったとする報告もあり⁴、痛み情報の伝達におけるROSの作用は永久的な細胞の障害によるものではないと考えられる。本研究ではTRPA1の拮抗薬であるHC-030031投与下でt-BOOHを灌流投与したところ、sIPSCの有意な増加は認められなかったことから、ROSは脊髄内におけるTRPA1チャンネルによるグルタミン酸の放出を促し、sIPSCの増強作用を有すると考えられた。TRPチャンネルはカルシウム透過性の非選択性カチオンチャンネルであり、TRPC, TRPV, TRPM, TRPML, TRPN, TRPP, TRPAの7つのサブファミリーに大別される。現在、痛み受容に関わることが示唆されているTRP受容体はTRPV1, V2, V3, V4, M8, A1で、いずれも特異的な温度感受性がある。近年、TRPチャンネルが外因性刺激物質に加え、ROSによっても活性化され、細胞内にカルシウムが流入し、細胞内シグナル伝達を修飾することが明らかになっている。in vitroの実験においてROSがTRPV1を感作することが示されている⁸。また、マウスの感覚神経においてROSがTRPA1を活性化し、細胞内にカルシウムの流入を引き起こすこと、TRPA1ノックアウトマウスではROSによる疼痛行動がみられないことなどが報告されている⁹⁻¹¹。TRPチャンネルは一次求心性神経の末梢端に発現することが知られているが、我々は脊髄スライス標本の膠様質細胞にパッチクランプ法を適用し、TRPA1やTRPV1が一次求心性神経中枢端

にも存在し、その活性化によって末梢からの痛み情報を脊髄レベルで増幅することを明らかにした¹²。本研究において、TRPA1の拮抗薬であるHC-030031投与下で、t-BOOHを灌流投与したところ、sIPSCの有意な増加が認められなかったという結果は、TRPA1チャンネルが一次求心性神経中枢端にも存在しTRPA1チャンネルがROSにより調整を受けているとの過去の報告とも矛盾しない結果であると思われた。

【結語】

ROSは、脊髄膠様質細胞における興奮性シナプス伝達だけでなく、抑制性シナプスも増強することが明らかとなった。

【文献】

1. Lee KY, Chung K, Chung JM. : Involvement of reactive oxygen species in long-term potentiation in the spinal cord dorsal horn. *J Neurophysiol* 103 : 382 - 391, 2010
2. Kim HK, Park SK, Zhou JL, et al : Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 111 : 116 - 124, 2004
3. Mao YF, Yan N, Xu H, et al : Edaravone, a free radical scavenger, is effective on neuropathic pain in rats. *Brain Res* 1248 : 68 - 75, 2009
4. Schwartz ES, Lee I, Chung K, et al : Oxidative stress in the spinal cord is an important contributor in capsaicin-induced mechanical secondary hyperalgesia in mice. *Pain* 138 : 514 - 524, 2008
5. Kim HY, Chung JM, Chung K. : Increased production of mitochondrial superoxide in the spinal cord induces pain behaviors in mice: The effect of mitochondrial electron transport complex inhibitors. *Neurosci Lett* 447 : 87 - 91, 2008
6. 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 – 26, 1993
7. Abe K, Saito H : Characterization of t-butylhydroperoxide toxicity in cultured rat cortical neurons and astrocytes. *Pharmacol Toxicol* 83 : 40 – 46, 1998
 8. Susankova K, Tousova K, Vyklicky L, et al : Reducing and oxidizing agents sensitize heat-activated vanilloid receptor (TRPV 1) current. *Mol Pharmacol* 70 : 383 – 394, 2006
 9. Sawada Y, Hosokawa H, Matsumura K, et al : Activation of transient receptor potential ankyrin 1 by hydrogen peroxide. *Eur J Neurosci* 27 : 1131 – 1142, 2008
 10. Bessac BF, Sivula M, von Hehn CA, et al : TRPA 1 is a major oxidant sensor in murine airway sensory neurons. *J Clin Invest* 118 : 1899 – 1910, 2008
 11. Andersson DA, Gentry C, Moss S, et al : Transient receptor potential A 1 is a sensory receptor for multiple products of oxidative stress. *J Neurosci* 28 : 2485 – 2494, 2008
 12. Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, et al : Activation of TRPA 1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 27 : 4443 – 4451, 2007

Functional Genetic Variation at the *NRGN* Gene and Schizophrenia: Evidence From a Gene-Based Case–Control Study and Gene Expression Analysis

Kazutaka Ohi,^{1,2,3} Ryota Hashimoto,^{1,2,4*} Yuka Yasuda,^{1,2} Motoyuki Fukumoto,^{1,2} Hidenaga Yamamori,^{1,2,5} Satomi Umeda-Yano,⁵ Takeya Okada,^{1,2} Kouzin Kamino,^{1,3} Takashi Morihara,¹ Masao Iwase,¹ Hiroaki Kazui,¹ Shusuke Numata,⁶ Masashi Ikeda,^{2,7} Tohru Ohnuma,⁸ Nakao Iwata,^{2,7} Shu-ichi Ueno,⁹ Norio Ozaki,^{2,10} Tetsuro Ohmori,⁶ Heii Arai,⁸ and Masatoshi Takeda^{1,4}

¹Department of Psychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

²CREST (Core Research for Evolutionary Science and Technology), JST (Japan Science and Technology Agency), Kawaguchi, Saitama, Japan

³National Hospital Organization, Yamato Mental-Medical Center, Yamatokoriyama, Nara, Japan

⁴Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University and Hamamatsu University School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

⁵Department of Molecular Neuropsychiatry, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Osaka, Japan

⁶Department of Psychiatry, Tokushima University Graduate School of Medicine, Kuramoto, Tokushima, Japan

⁷Department of Psychiatry, Fujita Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi, Japan

⁸Department of Psychiatry, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo, Tokyo, Japan

⁹Department of Psychiatry, Ehime University Graduate School of Medicine, Toon, Ehime, Japan

¹⁰Department of Psychiatry, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Aichi, Japan

Manuscript Received: 19 October 2011; Manuscript Accepted: 22 February 2012

Genome-wide association and follow-up studies have reported an association between schizophrenia and rs12807809 of the *NRGN* gene on chromosome 11q24.2. We investigated the association of five linkage disequilibrium-tagging SNPs and haplotypes that cover the *NRGN* gene with schizophrenia in a Japanese sample of 2,019 schizophrenia patients and 2,574 controls to determine whether rs12807809 is the most strongly associated variant for schizophrenia in the vicinity of the *NRGN* gene. We found that the rs12807809–rs12278912 haplotype of the *NRGN* gene was associated with schizophrenia (global $P = 0.0042$). The

frequencies of the TG and TA haplotypes of rs12807809–rs12278912 in patients were higher (OR = 1.14, $P = 0.0019$) and lower (OR = 0.85, $P = 0.0053$), respectively, than in the controls. We did not detect any evidence of association of schizophrenia with any SNPs; however, two nominal associations of rs12278912 (OR = 1.10, $P = 0.057$) and rs2075713 (OR = 1.10, $P = 0.057$) were observed. Furthermore, we detected an association between the rs12807809–rs12278912 haplotype and *NRGN* expression in immortalized lymphoblasts derived from 45 HapMap JPT subjects ($z = 2.69$, $P = 0.007$) and confirmed

Additional supporting information may be found in the online version of this article.

Grant sponsor: Japanese Ministry of Health, Labor and Welfare; Grant number: H22-seishin-ippan-001; Grant sponsor: Japanese Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology (MEXT) KAKENHI; Grant numbers: 22390225, 23659565; Grant sponsor: Japan Foundation for Neuroscience and Mental Health.

*Correspondence to:

Dr. Ryota Hashimoto, M.D., Ph.D., Molecular Research Center for Children's Mental Development, United Graduate School of Child Development, Osaka University, Kanazawa University and Hamamatsu University School of Medicine, D3, 2-2, Yamadaoka, Suita, Osaka 5650871, Japan. E-mail: hashimor@psy.med.osaka-u.ac.jp

Article first published online in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com): 27 March 2012

DOI 10.1002/ajmg.b.32043

How to Cite this Article:

Ohi K, Hashimoto R, Yasuda Y, Fukumoto M, Yamamori H, Umeda-Yano S, Okada T, Kamino K, Morihara T, Iwase M, Kazui H, Numata S, Ikeda M, Ohnuma T, Iwata N, Ueno S-i, Ozaki N, Ohmori T, Arai H, Takeda M. 2012. Functional Genetic Variation at the *NRGN* Gene and Schizophrenia: Evidence From a Gene-Based Case–Control Study and Gene Expression Analysis.

Am J Med Genet Part B 159B:405–413.

the association in immortalized lymphoblasts derived from 42 patients with schizophrenia and 44 healthy controls ($z = 3.09$, $P = 0.002$). The expression of the high-risk TG haplotype was significantly lower than the protective TA haplotype. The expression was lower in patients with schizophrenia than in controls; however, this difference was not statistically significant. This study provides further evidence of the association of the *NRGN* gene with schizophrenia, and our results suggest that there is a link between the TG haplotype of rs12807809–rs12278912, decreased expression of *NRGN* and risk of developing schizophrenia. © 2012 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: schizophrenia; *neurogranin* (*NRGN*); single nucleotide polymorphism (SNP); genome-wide association study (GWAS); gene expression

INTRODUCTION

Schizophrenia is a common and complex psychiatric disease with strong genetic components. Schizophrenia has an estimated heritability of approximately 80% [Cardno and Gottesman, 2000; Tsuang, 2000], and many genes have been implicated in the pathogenesis of schizophrenia [Sun et al., 2008].

Genome-wide association studies (GWAS) of single nucleotide polymorphisms (SNPs) investigate thousands of DNA samples from patients and controls, and these studies are a powerful tool for identifying common risk factors in complex diseases. Stefansson et al. [2009] combined the samples (from 12,945 patients with schizophrenia and 34,591 controls) from three large GWAS (the SGENE-plus, the International Schizophrenia Consortium and the Molecular Genetics of Schizophrenia GWAS) and conducted follow-up studies in 4,999 patients and 15,555 controls from four sets of samples from Europe, including from the Netherlands, Denmark, Germany, Hungary, Norway, Russia, Sweden, Finland, and Spain. The authors detected several significant association signals. Seven markers gave P values smaller than the genome-wide significance threshold of approximately 1.6×10^{-7} in the combined samples: five markers, rs6913660, rs13219354, rs6932590, rs13211507, and rs3131296, which spanned the major histocompatibility complex (MHC) region on chromosome 6p21.3–22.1; a marker, rs12807809, located 3,457 bases upstream of the *neurogranin* (*NRGN*) gene on chromosome 11q24.2; and a marker, rs9960767, in intron 4 of the transcription factor 4 (*TCF4*) gene on chromosome 18q21.2. Of the seven SNPs, four SNPs, rs6913660, rs13219354, rs13211507, and rs9960767, were not polymorphic in the HapMap Japanese in Tokyo (JPT) samples. The minor allele frequencies (MAFs) for two SNPs, rs6932590 and rs3131296, were less than 5%. Because only one marker, rs12807809, in the *NRGN* gene was a common SNP in the HapMap JPT samples (MAF greater than 5%), we focused on this SNP and the *NRGN* gene in the present study.

The *NRGN* gene is the human homolog of the neuron-specific rat RC3/*neurogranin* gene. *NRGN* encodes a postsynaptic protein kinase substrate that binds calmodulin (CaM) in the absence of calcium and has been implicated in dendritic spine formation and synaptic plasticity [Baudier et al., 1991]. *NRGN* plays an important

role in the Ca^{2+} –CaM signaling pathway [Hayashi, 2009]. Ca^{2+} influx-induced oxidation of *NRGN* leads to the postsynaptic activation of CaM-dependent protein kinase II (CaMKII) by CaM, which is associated with strengthened *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor signaling [Li et al., 1999]. Reduced *NRGN* activity may mediate the effects of NMDA hypofunction implicated in the pathophysiology of schizophrenia.

The *NRGN* gene spans 7.3 kb of genomic DNA and contains four exons [Martinez de Arrieta et al., 1997]. Part of exon 1 and exon 2 encode a 78-amino-acid protein, and exons 3 and 4 contain untranslated sequences. A thyroid hormone response element (TRE) has been identified in intron 1 [Martinez de Arrieta et al., 1999]. An association between the *NRGN* gene and schizophrenia has previously been reported in a small population of male Portuguese and Brazilians [Ruano et al., 2008], although the associated SNP in the study, rs7113041, was not tightly correlated with the genome-wide supported SNP, rs12807809 (HapMap CEU $r^2 = 0.07$, JPT $r^2 = 0.01$). In addition, two separate studies reported no association between the genetic variants of *NRGN* and schizophrenia in Bulgarian [Betcheva et al., 2009] and Chinese populations [Li et al., 2010]. The genome-wide supported SNP and other SNPs in the *NRGN* gene were not genotyped in the GWAS of schizophrenia in Japanese populations because of a difference in the genotyping chips used among the separate GWAS, which the Illumina HumanHap 300 or 550 BeadChips, Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 5.0 and Affymetrix GeneChip Mapping 100 K microarrays [Stefansson et al., 2009; Ikeda et al., 2011; Yamada et al., 2011] were used. Here, we first investigated the association between the *NRGN* gene and schizophrenia in a Japanese population using a gene-based approach to determine whether rs12807809 is the most strongly associated variant for schizophrenia near the *NRGN* gene. Second, we examined whether the associated haplotype of *NRGN* influenced *NRGN* expression in immortalized lymphoblasts derived from the HapMap JPT samples and our Japanese case–control samples.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

Subjects for the genetic association analysis included 2,019 unrelated patients with schizophrenia (54.5% males, with a mean age \pm SD of 44.7 ± 15.1 years) and 2,579 unrelated healthy controls (49.4% males, 45.4 ± 19.4 years). The mean age did not differ significantly between cases and controls ($P = 0.24$); however, the male to female ratio of the patients was significantly higher than in the controls ($P < 0.05$). Age and sex-matched subjects for *NRGN* expression analysis consisted of 42 patients with schizophrenia (58.1%, 38.4 ± 11.2 years) and 44 healthy subjects (56.8% males, 38.0 ± 11.4 years). These subjects were included in the genetic association analysis. All subjects used in both analyses were biologically unrelated, of Japanese ethnicity and were recruited from four geographical regions in Japan: Osaka, Aichi, Tokushima, and Tokyo [Yamaguchi-Kabata et al., 2008; Ohi et al., 2009]. Cases were recruited from outpatient and inpatient facilities at university hospitals and psychiatric hospitals. Each subject with schizophrenia had been diagnosed by at least two trained psychiatrists based on an unstructured clinical interview; diagnoses were made based on the

criteria of the fourth edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-IV). Controls were recruited through local advertisements. Psychiatrically healthy controls were evaluated using unstructured interviews to exclude individuals who had current or past contact with psychiatric services. Written informed consent was obtained for all subjects after the procedures had been fully explained. This study was carried out in accordance with the World Medical Association's Declaration of Helsinki and approved by the Research Ethical Committee of Osaka University, Fujita Health University, Nagoya University, Tokushima University and Juntendo University.

SNP Selection and SNP Genotyping

This study was designed to examine the association between the *NRGN* gene and schizophrenia by selectively tagging SNPs in the *NRGN* gene and flanking regions (± 5 kb). We selected five tagging SNPs using the TAGGER algorithm (Paul de Bakker, <http://www.broad.mit.edu/mpg/tagger>) with the criteria of r^2 greater than 0.80 in "pair-wise tagging only" mode and an MAF greater than 5%, which was implemented in Haploview 4.2 using HapMap data release 27 Phase II + III, Feb 2009, on NCBI B36 assembly, dbSNP b126 [Japanese in Tokyo (JPT), Chr 11: 124,109,952.124,127,307]. The five tagging SNPs were rs1939214, rs12807809, rs12278912, rs2075713, and rs11219769. Markers are shown in Table I; orientation and alleles are reported on the genomic plus strand (rs12807809 is reported as T/C, as has been reported in previous GWAS [Stefansson et al., 2009]). Venous blood was collected from the subjects and genomic DNA was extracted from whole blood according to standard procedures. The SNPs were genotyped using the TaqMan 5'-exonuclease allelic discrimination assay (Applied Biosystems, Foster City, CA) as previously described [Hashimoto et al., 2006, 2007]. Detailed information on the PCR conditions is available upon request. Genotyping call rates were 98.9% (rs1939214), 98.5% (rs12807809), 99.3% (rs12278912), 99.3% (rs2075713), and 99.5% (rs11219769). No deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) in the examined SNPs was detected in the patients with schizophrenia or healthy controls ($P > 0.05$). The positions of the five SNPs analyzed in the present study are shown in Figure 1.

Quantitative Measurement of *NRGN* Gene Expression

Isolation and immortalization procedures of lymphocytes from blood using the Epstein-Barr virus (EBV) were performed by SRL of Tokyo, Japan. Immortalized, patient-derived lymphocytes were grown in culture media supplemented with 20% fetal bovine serum. Total RNA was extracted from cell pellets using the RNeasy Mini Kit (Qiagen K.K., Tokyo, Japan). The total yield of RNA was determined by absorbance at 260 nm, and the quality of the RNA was determined using agarose gel electrophoresis.

According to the manufacturer's protocol, total RNA was treated with DNase to remove contaminating genomic DNA using DNase Treatment and Removal Reagents (Ambion, Austin, TX). Total RNA (10 μ g) treated with DNase was used in a 50- μ l reverse transcriptase reaction to synthesize cDNA with the SuperScript

TABLE I. Genotype and Allele Distributions for SNPs in the *NRGN* Gene Between Patients With Schizophrenia and Controls in a Japanese Population

Marker	SNP IDs (M)	Position ^a	M/m ^b	Gene	SCZ (n = 2019)			CON (n = 2579)			MAF		Allelic		OR (95% CI)
					M/M	M/m	m/m	M/M	M/m	m/m	SCZ	CON	P-value (χ^2)	P-value (χ^2)	
	rs1939214 (A)	124110500	A/G	5'	0.67	0.30	0.04	0.66	0.30	0.04	0.19	0.19	0.29 (1.1)	1.06 (0.95–1.18)	
	rs12807809 (T) ^c	124111495	T/C	5'	0.58	0.35	0.07	0.56	0.37	0.07	0.25	0.26	0.25 (1.3)	1.06 (0.96–1.16)	
	rs12278912 (G) ^d	124117369	G/A	Intron1	0.61	0.34	0.05	0.59	0.35	0.06	0.22	0.23	0.057 (3.6)	1.10 (1.00–1.22)	
	rs2075713 (A)	124123149	A/C	3'	0.65	0.31	0.04	0.62	0.33	0.05	0.20	0.21	0.057 (3.6)	1.10 (1.00–1.22)	
	rs11219769 (G)	124125357	G/T	3'	0.57	0.37	0.06	0.55	0.38	0.07	0.25	0.26	0.09 (2.8)	1.09 (0.99–1.19)	

SCZ, patients with schizophrenia; CON, healthy controls; M, major allele; m, minor allele; MAF, minor allele frequency; OR, odds ratio.

^adb SNP build 129.

^bThe first alleles shown are major alleles. All the alleles are represented according to the plus strand DNA sequence.

^cThe genome-wide supported SNP for schizophrenia [Stefansson et al., 2009].

^dBecause a high linkage disequilibrium between rs12278912 and rs7113041 [Ruano et al., 2008] was found in the HapMap JPT samples [$r^2 = 0.93$], rs12278912 was selected as the tagging SNP by the TAGGER program.