

令和元年6月14日現在

機関番号：34431

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10565

研究課題名(和文) 知覚神経節におけるGABA/グルタミン酸によるグリア-神経細胞間クロストーク機構

研究課題名(英文) Crosstalk mechanism between glial cell- nerve cells with the GABA/ glutamic acid in the sensory ganglia

研究代表者

早崎 華 (Hayasaki, Hana)

関西福祉科学大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：90257866

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年ではグリア細胞が有意にニューロン・シグナル伝達に関与することが広く認められている。三叉神経節は末梢神経で、シナプスが無いため神経伝達制御が無いと考えられていたが神経節内にある神経細胞体、グリア細胞(サテライト細胞)間で抑制性の神経神経伝達物質であるGABAと興奮性の神経伝達物質であるグルタミン酸とのクロストークによる神経伝達制御が存在する事が明らかとなった。三叉神経は頭部が顔面の痛みを受容する神経細胞であり、末梢部位での痛みの制御の可能性は痛発生や軽減の糸口になると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリア細胞は痛覚情報伝達効率を高め、末梢では神経修復に関与すると考えられている。しかしグリア細胞は場合によっては過剰な反応や慢性的な過敏状態を引き起こし、疼痛の発症や鎮痛剤効力低下の原因にもなりうる。これらのことからニューロングリア間制御機構の解明は疼痛治療において重要である。しかし多くの不明な点が残されており、今後の研究の進展が必要である。我々の研究は末梢の知覚神経節におけるsatellite cellと神経細胞体間における抑制性神経伝達物質であるGABAと興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経伝達制御が痛覚治療に関連する可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：In late years it is found widely that glia cells are significantly involved in neuron signal transduction.

Trigeminal ganglion was a peripheral nerve, and because there was not a synapse, there was not thought to be neural transmission control, but it was found that neural transmission control by the crosstalk with the GABA which was inhibitory nerve neurotransmitter and the glutamic acid which was excitatory neurotransmitter was present between perikaryon, glia cells (satellite cells) in the ganglion.

Trigeminal nerve is the nerve cell that the head receives the pain of the face, and, as for the possibility of the control of the pain in the peripheral site, it is thought to be in a lead of the algetic incidence and reduction.

研究分野：神経生理学

キーワード：グルタミン酸 GABA 知覚神経節 satellite cell

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、グリア細胞が情報伝達にも関与することが明らかとなったが、その制御機構の実態にはまだ多くの不明な点が残されており、今後の研究の進展が強く望まれている。さらに末梢知覚神経節ではシナプスが存在しないことからニューロングリア間だけでなく神経伝達制御そのものがほとんど解明されていなかった。しかし我々の過去の研究で、三叉神経節と脊髄神経節に非常に強い GABA の取り込みが観察された(Autoradiographic distribution of radioactivity from ^{14}C -GABA in the mouse *Microsc. Res. Tech* 2000 vol.48 P116-126)。さらに三叉神経節において satellite cell と神経細胞体に GABA が発現しており、神経細胞体では GABA の合成酵素である GAD も確認された。加えて GABA_A、GABA_B 受容体を介した神経細胞体での電気生理学的な応答を報告してきた (Hayasaki et al. *Eur J Neurosci.* 2006 ;23(3):745-57, 科学研究費課題番号 : 16790898, Hayasaki et al. *Neuroscience.* 2012 科学研究費課題番号 : 24592319)。GABA_B 受容体においては補助タンパクである KCTD12/16 の発現を三叉神経細胞体で確認し、三叉神経細胞体においては KCTD12 が GABA_B 受容体を介した GABA 応答を制御している可能性を報告してきた。さらに GABA の細胞外イメージング法により satellite cell はアニオンチャネルからの GABA 放出、神経細胞体からは GABA transporter からの GABA 放出を確認した。以上、我々のこれまでの研究の結果から末梢知覚神経節における神経伝達制御には GABA が重要な役割を担っている可能性が示唆された。)現在 GABA/グルタミン酸の co-release はまれであり、生理学的に証明されている部位は非常にわずかで手綱核と聴覚系と海馬の CA3 領域だけである。Steven らは GABA/グルタミン酸の co-release の生理学的意義は興奮と抑制を局所的にコントロールすることが出来る事と述べている。しかし手綱核のような中枢神経系の核は他の部位からの神経入力も複数知られており、治療標的として GABA/グルタミン酸による局所的なコントロール調整については複数の部位からの調節についても検討しなければならない。しかしながら、末梢の知覚神経節においてはシナプスがなく他の神経入力が存在しないことから、神経節内でのローカルな神経伝達制御が容易な部位と考えられる。そこで我々は末梢知覚神経節において GABA ばかりでなくグルタミン酸を介した神経伝達制御の存在の可能性を考えた。

2. 研究の目的

近年、疼痛にはニューロンだけでなく、グリア細胞が関与する事が明らかになった。グリア細胞は痛覚情報伝達効率を高め、末梢では神経修復に関与すると考えられている。しかしグリア細胞は場合によっては過剰な反応や慢性的な過敏状態を引き起こし、疼痛の発症や鎮痛剤効力低下の原因にもなりうる。これらのことからニューロングリア間制御機構の解明は疼痛治療において重要である。しかし多くの不明な点が残されており、今後の研究の進展が必要である。我々の研究は末梢の知覚神経節における satellite cell (末梢知覚神経節のグリア細胞) と神経細胞体間における抑制性神経伝達物質である GABA と興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸による神経伝達制御を解明することにより疼痛治療に関連する satellite cell 間の痛覚制御機構を解明することを目的とする。

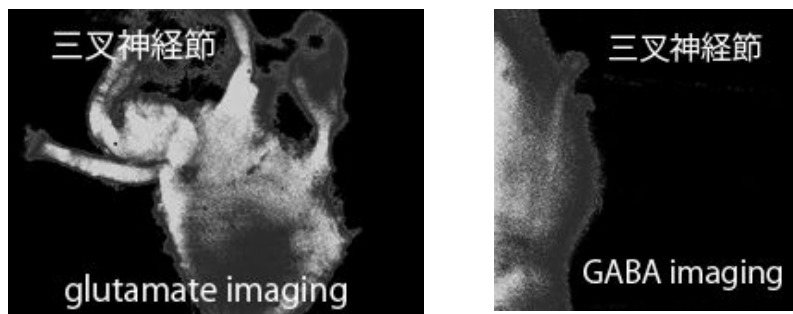
3. 研究の方法

GABA とグルタミン酸リリースの可視化法：末梢神経部と神経節を含む *in vitro* の組織培養スライス標本を作製し Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fluo-4 を Bolus loading 法にて神経細胞もしくは satellite cell に取り込ませ活動状態を検討する。神経細胞と satellite cell は形態的に容易に判別できるためそれぞれの活動状況を各条件下にて検討する。この方法は組織や細胞を生きたまま可視化できることからリアルタイムでの解析に適している (Morishima et al. (2010) *Neurosci. Res.* 67:347-353)

関連物質の発現：蛍光免疫組織化学法にて試料作成後、レーザー顕微鏡にて観察撮影。

4. 研究成果

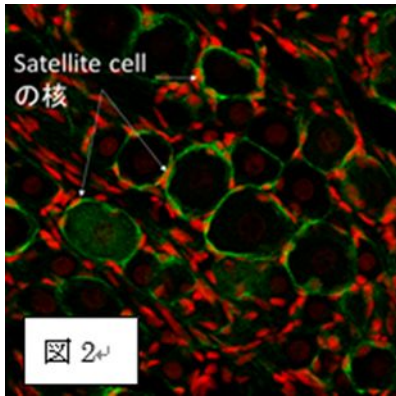
図 1



ラット三叉神経 (末梢神経部と神経節部分を含む) の *in vitro* の組織培養スライス標本を用いてグルタミン酸と GABA の細胞外リリースを検討した。これにより三叉神経節でグルタミン酸と GABA が細胞外にリリースされることが確認された。

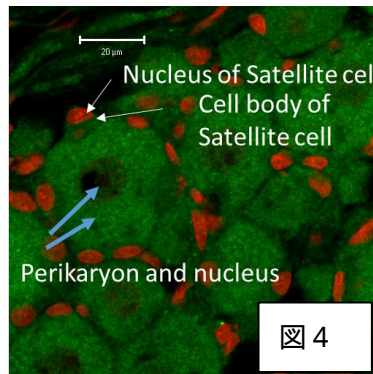
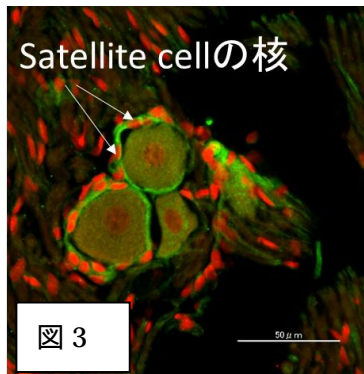
(図1)

中枢神経ではシナプス間の神経終末よりこれらがリリースされ、周囲のアストロサイトが取り込み分解するとされているが、三叉神経節では神経終末は無いが、神経細胞もしくは satellite cell がグルタミン酸と GABA を放出していることが確認された。



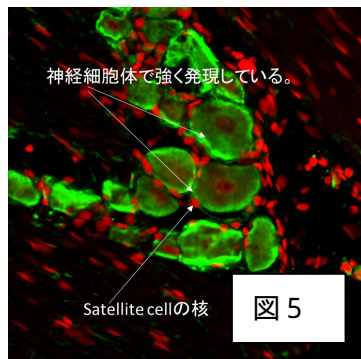
次に免疫染色法にてラット三叉神経節での glutamine synthase の発現を検討した。その結果、satellite cell での強い発現が確認され、神経細胞体ではほとんど確認できなかった(図2)(緑が glutamine synthase で赤が核)。

satellite cell がその役割を担っていると考えられる。



次に GLAST=EAAT1 の免疫染色を行った(図3) GLAST はグルタミン酸トランスポーターである。このトランスポーターが satellite cell で強く発現していた。この結果により、細胞外にあるグルタミン酸は GLAST より取り込まれ、図2で示した glutamine synthase により分解されていると考え

られる。また、グルタミン酸の合成酵素である Glutaminase は神経細胞体で強く確認された。(図4)この事は、グルタミン酸が神経細胞体で合成される事を示唆する。



次に AMPA 型グルタミン酸受容体の免疫染色を行った(図5)これは神経細胞体の細胞膜上で強く発現が認められた。グルタミン酸受容体が細胞膜上で発現していることは三叉神経節でのグルタミン酸の作用点が存在する事を示唆する結果である。

これらの結果から知覚神経節におけるグルタミン酸/GABA を介した satellite cell 神経細胞での神経伝達制御のメカニズムを明らかとなった。

また末梢知覚神経節はシナプス欠いており他の中枢神経系の核と異なり複数の神経入力もないローカルな部位である。このことは疼痛コントロールの標的ターゲットとしても非常にコントロールしやすく中枢神経系に比べても安全性が高い部位であると考えられる。また BBB が無いことから新しい鎮痛薬の創製に結びつく有用な基礎的知見を提供することが出来る。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

Kuwabara H, Nishikado A, Hayasaki H, Isogai Z, Yoneda M, Kawata R, Hirose Characteristic Formation of Hyaluronan-Cartilage Link Protein-Proteoglycan Complex in Salivary Gland Tumors. 平成 28 年 5 月 Appl Immunohistochem Mol Morphol.24 巻 373-381

渡辺正仁, 早崎 華, 由留木裕子, 痛みのメカニズムと鎮痛 平成 29 年 巻(号)8(1)頁 50-63, 保健医療学雑誌

渡辺正仁, 早崎 華, 由留木裕子, 玄安季, 橋本遵一 骨格筋収縮に關与する弾性タンパク質コネクチン/タイチン 平成 29 年 巻(号): 8(2)頁 117-122, 保健医療学雑誌

渡辺正仁, 早崎 華, 由留木裕子, 渡辺克哉 カンナビジオールの治療効果とその作用機序 巻(号):

9(1)頁 1-15, 保健医療学雑誌

M. Watanabe, M. Yamamoto, H. Hayasaki, E. Nakamata, K. Nagino, K. Okamoto, Y. Yuri, Y. Fujii, Y. Yurugi, K. Shigemori and K. Watanabe, Measurement of plasma amyloid- precursor protein APP770 concentration in healthy young volunteers: Preliminary study of APP770 as a potential biomarker for Alzheimer's disease diagnosis. 平成 30 年 4 月 J. Allied Health Sci.9

由留木裕子, 池辺るり子, 中俣恵美, 早崎, 目崎聖子, 玄 安季, 渡辺正仁、腰背部痛における胸腰筋膜の関与 平成 30 年 11 月 30 日、総合福祉科学研究第 10 号

〔学会発表〕(計 7 件)

山本真紀、早崎華、柳野浩司、岡本加奈子、酒本卓昌、田村真基、大西真人、渡辺正仁、脳血管内皮細胞特異的アミロイド 前駆体タンパク質 APP770 の血漿中濃度と認知機能の関連解析. 平成 28 3 月 2 日関西福祉科学大学 第 6 回総合福祉科学学会「新たな福祉の展開

H. Hayasaki, A. Fukuda, Y. Sohma, An immunocytochemical study for the local glutamatergic system in rat trigeminal ganglion. 2016 年 7 月 20 日第 39 回日本神経科学大会(横浜)

APP770 のアルツハイマー脳での発現、早崎華、山本 真紀、由留木 裕子、桑原 宏子、渡辺 正仁、2016 年 12 月 4 (日) 保健医療学学会第 7 回学術集会

早崎華 由留木裕子 桑原宏子 渡辺正仁、APP770 の正常およびアルツハイマー脳での発現 Expression of APP770 in normal and Alzheimer's disease brains 2017 年 7 月 21 日第 40 回日本神経科学大会(幕張メッセ)

由留木裕子, 渡辺正仁, 早崎華、カンナビジオールの医療効果とその作用機序 - リハビリテーションへの応用を目指して 2018 年 3 月 7 日、関西福祉科学大学 第 8 回総合福祉科学学会 シンポジウム

酒井希代江、森岡悦子、中谷謙、前田留美子、森尚彫、松尾貴央、不破真也、早崎華、上杉康夫、視線運動パターンが内容理解に及ぼす影響(第 1 報) 2018 年 3 月 7 日、関西福祉科学大学 第 8 回総合福祉科学学会

早崎華 由留木裕子 桑原宏子 渡辺正仁、APP770 の正常およびアルツハイマー脳での発現: Expression of APP770 in normal and Alzheimer's disease brains、2018 年 10 月 12 日(金) 第 37 回日本認知症学会学術集会 ロイトン札幌、札幌市教育文化会館

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 神原 清人

ローマ字氏名: Kanbara kyoto

所属研究機関名: 大阪医科大学

部局名: 医学部

職名: 非常勤講師

研究者番号(8 桁): 40298758

研究分担者

研究分担者氏名: 相馬 義郎

ローマ字氏名: Soma Yoshiro

所属研究機関名：慶應義塾大学
部局名：医学部
職名：准教授
研究者番号（8桁）：60268183

研究分担者

研究分担者氏名：福田敦夫

ローマ字氏名：Hukuda Atsuo

所属研究機関名：浜松医科大学
部局名：医学部

職名：教授

研究者番号（8桁）：50254272

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。