

平成 21 年 6 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18613025
 研究課題名（和文） 脊髄シナプスレベルにおけるヒスタミンの鎮痛発現機序に関する研究
 研究課題名（英文） Analgesic effect of histamine at spinal synaptic level
 研究代表者
 赤池 紀生（AKAIKE NORIO）
 熊本保健科学大学・保健科学部・教授
 研究者番号：30040182

研究成果の概要：

ヒスタミン（HA）と選択的 H_2 受容体アゴニストは H_1 KO マウスの新線状態ニューロンに内向き電流を発生させた。HA と選択的 H_1 受容体アゴニストは H_2 KO マウスニューロンで内向き電流を発生した。 H_1 と H_2 のダブル KO マウスのニューロンでは HA、 H_1 や H_2 受容体アゴニストは共に無効であった。この内向き電流は K チャネルの抑制によってもたらされた。以上のことから、HA の H_1 と H_2 受容体は中枢における HA の興奮惹起作用に関与することを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000 円	500,000 円	2,200,000 円
2007 年度	1,100,000 円	330,000 円	1,430,000 円
2008 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
年度			
年度			
総計	3,600,000 円	1,070,000 円	4,670,000 円

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：痛み・シナプス・GABA 応答・グリシン応答・ヒスタミン・修飾作用

脊髄ニューロン・内因性鎮痛物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 化学伝達物質のヒスタミンは自発性の運動、目覚め、睡眠起床サイクル、食欲制御、痙攣発作、学習、記憶、攻撃や感情など多くの興奮性および抑制性の生体機能に関与しているが、正常並びにヒスタミン（HA）受容体ノックアウト動物のニューロンやシナプスレベルに基点を合わせた電気生理学的研究は少なく、また脊髄レベルの痛み信号の制御に関すると思われる電気生理学的研究は皆無であった。

(2) 本研究報告のテーマは「脊髄シナプスレベルにおけるヒスタミンの鎮痛発現機序」であるが、まずヒスタミン受容体のサブタイプ H_1 と H_2 受容体がいかなる情報伝達に関与しているのかを解明する事が最も重要なことから、野生型、 H_1 -KO、 H_2 -KO と $H_{1/2}$ -KO マウスの新線条体ニューロンレベルでのヒスタミン受容体の電気生理学的及び薬理学的特性についてまず調べた。

2. 研究の目的

ヒスタミン (HA) は生物学的に重要なアミンであり、睡眠/目覚めや注意力、不安、痛覚、体液バランスの恒常性、食欲、体温など、哺乳類の中樞神経系の様々な生理学的機能を調節している[6,22]。神経ヒスタミン作動性ニューロンは、目覚めの維持に強力な刺激効果を有する一方で、激しい発作や薬剤過敏性、徐神経による過敏性、虚血性組織障害、ストレス感受性など、有害であつたり好ましくない様々な状況に対する抑制性神経保護システムにも機能する[6,25]。

新線条体は、運動や神経刺激薬の過敏性の調節に重要な役割を持っており、グルタミン酸

ドーパミン相互作用が腹側線条体における運動活動量に影響を及ぼすことがよく立証されている[8]。そしてその報酬刺激の行動への影響は、腹側線条体のドーパミン依存性機能を介している[3,23]。しかしながら、新線条体は強いヒスタミン作動性の保護を受けていることもまた知られている[18]。放射線写真実験によりヒスタミン受容体の存在が示され、脳内微小透析法によりこの脳の領域でヒスタミンの放出が確認された[1,21]ことは、ヒスタミンが新線条体において生理学的役割を担っている可能性を示唆している。しかしながら、新線条体の細胞膜レベルにおけるヒスタミンの活動に関する電気生理学的報告は少ない。我々は先行論文で、そのサイズ(細胞体の直径が $<15\mu\text{m}$ もしくは $>20\mu\text{m}$)と、発火率によって特徴づけられたラットの腹側線条体、 H_1 と H_2 の両方受容体が発現していることを報告した[16]。哺乳類の中樞神経系におけるヒスタミンの機能的役割を解明するために重要な H_1 -、 H_2 -と $H_{1/2}$ -ヒスタミン受容体KOマウスにおいて、新線条体ニューロンはヒスタミン受容体を介した電気生理学的応答を実験するには大変適していると考えられる。したがってまず我々は、野生型と H_1 -、 H_2 -と $H_{1/2}$ -KOマウスから単離した巨大新線条体ニューロンを用いて、受容体に基づく新線条体のヒスタミン応答を詳細に検討し、そしてヒスタミンの選択的アゴニストとアンタゴニストの作用を確認した。次に、中樞神経系におけるヒスタミンの役割と運動活動量との関連性における役割の可能性について試みるために、我々は本実験で H_1 -、 H_2 -、 $H_{1/2}$ -KOマウス間におけるメタンフェタミン(METH)誘導性の行動過敏性についても観察し、比較検討した。

3. 研究の方法

(1) 動物

野生型 H_1 -KO、 H_2 -KO、 H_1 と H_2 の両KO型の雄マウス(22-28g, 15-20歳)を使用した。マウスはC57BL系で 24 ± 2 の部屋で飼育、光照射は6:00~18:00の間与えた。マウスはエサと水を自由に摂取できる環境下に飼

育した。

(2) 標本

動物の使用数は日本生理学会の規約に基づいて最小にとどめた。マウスはペントバルビタール(50mg/kg, 腹腔内投与)で麻酔後断頭した。その脳から $340\mu\text{m}$ の厚さの脳スライス標本を切り出した。脳スライス標本は室温(21-24)で95% O_2 と5% CO_2 の混合ガスで飽和したインキュベーション溶液中に1時間放置し回復させた後31で15~25分間0.016%プロネースで、そして引続き0.01%サーモリジンで15~25分処置した。その後スライス標本を酵素を含まない液中にさらに1時間放置した。ニューロンの単離は新線状体を含むスライス標本の一部をパンチアウトし、正常液を含む35mmの培養皿に移した。新線状体ニューロンは炎で先端を丸くした小型の微小ピペットで、新線状体を含む部分を機械的にパイペティングすることによって単離した。単離された新線状体ニューロンは20~30分もすると培養皿の底に付着することを双眼顕微鏡で確認した。

(3) 電気的測定

電気生理学的測定は膜電流又は電位固定下にニスタチン穿孔パッチ記録法[2]で行った。電流の記録と電圧のコントロールにはパッチクランプアンプ(CEZ-2300, 日本光電社製)を用い、全ての電流記録内保持電位(V_H)-40mVを用いた。パッチピペットはガラス管(1.5mm直径、0.9mm内径、成茂社製)をブローラ(PB-7, 成茂社製)で作製した。細胞内液を充填した記録用電極の抵抗は5-7Mであった。単離ニューロンは倒立顕微鏡(ダイアポット, ニコン社製)で観察した。電流と電圧はオシロスコープ(テクトロニクス5111A, ソニー社製)とペンレコーダ(リニアコーダーWR3320, グラフテック社製)で記録した。電流は1KHzでフィルター(E-3201A, NFエレクトリック社製)をかけ、4KHzでジグデータ1200とpCLAMPソフトウェア(バージョン8.0, アクソン社製)を使用全ての実験は室温21-24で行った。

(4) メタンフェタミンによる行動実験

全ての行動実験は9:00~17:00の光照射の期間に動物取扱いの規則にそって行った。実験のプロトコールは東北大学医学部の動物ケア委員会にそって行った。メタンフェタミン感作実験では野生型、 H_1 -、 H_2 -と $H_{1/2}$ -KO型マウスに1日1回、7日間メタンフェタミン(1mg/kg, 腹腔内)を投与した。各々のマウスの運動行動はメタンフェタミン投与直後2時間、赤外線センサーシステム(スーパーメックス, 室町社製)で測定した。赤外線ビームを横切った回数を測定し、その結

果をヒスタミン KO 群とコントロール群マウスと比較した。

(5) データ解析

測定値は平均値 \pm SEM であらわし、 $P < 0.05$ より以下を有意差有とした平均電流値はそれぞれのコントロール値と比較し、各実験データの有意差はスチューデント t - テスト検定法に従った。

(6) 溶液

インキュベーション溶液のイオン組成は mM において 124NaCl, 5KCl, 1.2 KH₂PO₄, 24 NaHCO₃, 2.4 CaCl₂, 1.3 MgSO₄ と 10 グルコースで 95% O₂ と 5% CO₂ 混合ガスで飽和したものの。スタンダード外液は 150NaCl, 5KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 グルコースと 10 HEPES. これら両外液の pH はトリス塩基で中和して 7.4 である。ニスタチン穿孔記録用電極内の細胞内溶液は mM において 150 KCl と 10 HEPES で pH は 7.2 とした。ニスタチンは 10 mg/ml で酸性のメタノールに溶解し、使用直前に 100 ~ 200 μ g/ml の最終濃度にして用いた。

(7) 薬物

本実験に使用した薬物はテトロドキシン (TTX), HTMT, メピラミン, チオチジン, ダイアプリットとニスタチン (シグマ社製) と L-ヒスタミン (東京化成) である。水に溶解しない薬物は最初に DMSO に溶解し、その後使用時に外液に薄めて用いた。DMSO の使用最少濃度は 0.1% よりも少なく、この濃度の DMSO は細胞の電気的活動に影響を与えなかった。全ての薬物は Y チューブ法 [2] によって 20ms 以内にターゲットのニューロンに投与した。

4. 研究成果

(1) 野生型マウスの巨大新線状体ニューロンにみられるヒスタミン応答

野生型マウスの新線状体より単離したニューロンに対するヒスタミンの効果は電流固定法下にニスタチン穿孔パッチ記録法にて観察した。図 1A はヒスタミンに反応する典型的な巨大新線状体ニューロンの形態を示す。我々が先に報告したラットの巨大新線状体ニューロンにみられるのと同じく、酵素処理で単離した後のマウスの新線状体ニューロンにも 2 つのタイプ、すなわち細胞体サイズが 20 μ m より大きいものと 15 μ m より小さいものの 2 種類あった。後者の大きいニューロンのみがラットの場合 [19] と同じくヒスタミン感受性を示した。それ故、以下のデータはこれら大型新線状体から得た。

大型新線状体ニューロンは -70 ~ -75mV の静止膜電位を有した。図 1B は巨大新線状体のヒスタミンに対する応答例を示す。ヒスタ

ミンは脱分極を起こし、結果として活動電位を発生させた。ヒスタミン投与中の入力膜抵抗の変化は、Na チャネルの選択的阻害剤である 1 μ M TTX の存在下、5 秒ごとに 30 pA, 300ms の短い過分極性パルスを与えることによって測定した。図 1Bb に示すように、過分極ステップパルスに対する電位応答はヒスタミン投与によって漸時増加した。そしてヒスタミンによって発生した脱分極を陰性 DC 電流で元のレベルまで戻した時でも電位応答は増加していた。すなわち膜の入力抵抗がヒスタミン存在下に増加することを示す。

種々の濃度のヒスタミンを保持電位 - 40 mV の膜電位固定下のニューロンに与えた。ヒスタミンで発生する内向き電流は 10 nM より発現し、濃度依存性に増加した。しかし図 2 に示されるように、濃度依存性の曲線が 1 μ M 近傍で急峻に立ち上がったため、この用量反応曲線は少なくとも単一のシグモイドカーブではフィット出来なかった。すなわちこのことはヒスタミン応答が少なくとも 2 つの成分又は異なるサブタイプの応答の合わさったものであることを暗示した。そこで、ヒスタミン応答成分をはっきりさせるため、ヒスタミン受容体サブタイプの特異的アゴニストやアンタゴニストの効果について調べた。図 2 の挿入図にあるように、ヒスタミンの濃度反応関係は 2 つのヒル係数を持つ成分の合計であり、ヒスタミンに高い親和性をもつものの EC₅₀ は 164 nM, nH は 0.89 であった。そして低い親和性を持つ成分の EC₅₀ は 2.98 μ M, nH は 1.00 となった。そして高い親和性を有する電流成分の最大電流値 (I_{max}) は 1.23 で低い方のものは 3.80 であった。

野生型マウスニューロンのヒスタミン惹起電流への H₁ と H₂ 受容体拮抗薬 (アンタゴニスト) の効果

野生型の巨大新線状体ニューロンをまず選択的 H₁ 受容体拮抗薬のメピラミンで前処置し、1 分後に 10 μ M のヒスタミンの効果を見た。メピラミン (10 nM ~ 10 μ M) それ自身は何らの電流も発生しなかったが、10 μ M のヒスタミンによるピーク電流応答を 40% まで抑制した (図 3A)、このことは 10 μ M のヒスタミン応答がメピラミン感受性と非感受性の 2 つの電流成分からなることを示唆している (図 3Ba, b)。そして最大抑制の 50% (IC₅₀) を生じるメピラミンの濃度は 18 nM であった。これと対照的に 1 μ M の低濃度ヒスタミンで発生する電流はメピラミンで完全に消失した。すなわちこの電流成分はメピラミン感受性の電流成分のみからなることを示している。これらの結果は 10 μ M ヒスタミンで発生する電流が H₁ と H₂ 受容体拮抗薬に非感受性で本電流の発生にはより高濃度のヒスタミンを必要とする他のサブタイプからなっ

いることを暗示する。それ故に、メピラミン抵抗性電流成分への H_2 受容体拮抗薬効果を調べた。

選択的 H_2 受容体拮抗薬のチオチジンとラニチジンの効果がメピラミンの最大有効濃度 ($10 \mu\text{M}$) の存在下に $10 \mu\text{M}$ ヒスタミンで発生する電流について調べた。(図 3)。両拮抗薬それら自身は $10 \text{nM} \sim 100 \mu\text{M}$ の濃度で何らの応答も起すことなく $10 \mu\text{M}$ ヒスタミンで発生する電流を用量依存性にメピラミン抵抗性の電流を抑制した。図 4B はメピラミン抵抗電流成分へのチオチジンとラニチジンの濃度依存性の抑制関係をまとめたものでそれぞれの IC_{50} 値は 332nM と $1.02 \mu\text{M}$ であった。これらの結果は以下のことをはっきりと示している。すなわち H_1 と H_2 受容体が野生型マウスの巨大新線状体ニューロンに共存し、ヒスタミン濃度が高いときのみ両受容体を介する電流が同時に発現する。

野生型ニューロンへの H_1 と H_2 受容体アゴニストの効果

H_1 アゴニストの HTMT と H_2 アゴニストのダイムプリットは -40mV の保持電位下、濃度依存性に内向きナ電流を発生した(図 5)。HTMT によって発生する電流の濃度応答曲線は $10 \mu\text{M}$ から $30 \mu\text{M}$ の濃度範囲でシグモイドであり、その I_{max} , EC_{50} と nH はそれぞれ 1.79 ± 0.07 , $3.18 \mu\text{M}$ と 0.70 ± 0.07 であった。同様にダイムプリットによる濃度応答曲線も 300nM から $30 \mu\text{M}$ の濃度範囲でシグモイドであり、 I_{max} , EC_{50} と nH は 5.07 ± 1.16 , $6.73 \mu\text{M}$ と 1.00 ± 0.31 (図 5) であった。ヒスタミン濃度応答曲線の挿入図は平均データへヒル式を適用した時のカーブフィットである。

H_1 -, H_2 -, と $H_{1/2}$ -K0 マウスニューロンへのヒスタミンと選択的ヒスタミンアゴニストの効果

H_1 -K0 マウスの多くのニューロン(40 個中の 38 個)で、 $10 \mu\text{M}$ ヒスタミンと選択的 H_2 受容体アゴニストである $1 \mu\text{M}$ のタイムプリットは内向き電流を惹起したが、選択的 H_1 受容体アゴニストの $1 \mu\text{M}$ HTMT や選択的 H_3 受容体アゴニストの $1 \mu\text{M}$ (R-)アルファ-メチルヒスタミンは何らかの応答も発生しなかった(図 6A)。同時に H_2 -K0 マウスニューロンの多く(43 個中の 40 個)はヒスタミンや HTMT によって内向き電流を発生したが、ダイムプリットや(R-)アルファ-メチルヒスタミンは何らかの電流も発生しなかった(図 6B)。 $H_{1/2}$ -K0 マウスのニューロン全て(30 個中 30 個)は、どのリガンドでも何らの応答もみられなかった。そして $100 \mu\text{M}$ のヒスタミンも電流応答も惹起しなかった(図 6C)。

$H_{1/2}$ -K0 マウスニューロンにおいてヒスタ

ミン受容体以外の GABA 受容体応答を調べると正常に保持されていた。図 6C の右側パネルに示されたように $10 \mu\text{M}$ GABA は -40mV の保持電位で内向き電流を発生し、それは細胞内外の Cl^- 濃度から予想されるものであった。これらの結果から、 H_1 -, H_2 -と $H_{1/2}$ -K0 マウスにおいて、ターゲットとなる受容体は予期された通りに適切にロックアウト(KO)されており、KO のターゲットとならなかった例えば GABA_A 受容体は正常に残存した。

H_1 -と H_2 -K0 マウスニューロンへのヒスタミンの効果

図 7 は H_1 -と H_2 -K0 マウスから急性単離されたニューロンへのヒスタミン応答の用量反応曲線を示す。 H_1 -K0 マウスニューロンではヒスタミンで発生する電流が 300nM より高い濃度で現れたが、一方 H_2 -K0 マウスニューロンでは 30nM より高濃度のヒスタミンに反応した(図 7)。KO マウスから単離されたニューロンで得られるヒスタミン濃度応答曲線へヒル式をフィッティングさせると、 H_1 -K0 マウスニューロンでは I_{max} , EC_{50} と nH が 3.28 ± 0.06 , $1.82 \mu\text{M}$ と 1.47 ± 0.09 であり、 H_2 -K0 マウスニューロンでは 1.12 ± 0.03 , 102nM と 0.97 ± 0.11 であった。

ヒスタミン受容体 KO マウスにみられるメタンフェタミン誘起の行動感作

メタンフェタミン処置を行うたびに、その直後より 2 時間にわたって運動行動を測定した。運動行動の活動が H_1 -, H_2 -, と $H_{1/2}$ -K0 や野生型マウスにおいて時間と共に増加した。このことはマウスのどの種の処置もメタンフェタミンで感作されうことを暗示している。しかし、野生型に対して H_1 -と H_2 -K0 マウスにおける数量的カウント比は同じであった。それ故に H_1 か H_2 受容体のいずれかの欠損ではメタンフェタミン誘導の行動感作がみられない(図 8)。これとは対照的に $H_{1/2}$ -K0 マウスではメタンフェタミンで起こる行動感作が明らかであった(図 8)。このことから両 H_1 と H_2 受容体はメタンフェタミン誘導の運動量亢進の抑制的制御に関連していることを示唆する。

(2) 野生型、 H_1 -K0、 H_2 -K0 と $H_{1/2}$ -K0 マウスの巨大新線状体ニューロンにおけるヒスタミンを介した応答

本実験では、野生型、 H_1 -K0、 H_2 -K0、 $H_{1/2}$ -K0 マウスの巨大新線状体から急性単離したニューロンを用いて、ヒスタミン受容体の電気生理学的及び薬理学的特性について検討した。ヒスタミン添加は、野生型、 H_1 -K0、 H_2 -K0 マウスより摘出した巨大新線状体ニューロンに内向き電流を発生させたが、 $H_{1/2}$ -K0 のニューロンでマウスにおいては内向き電流を発生させなかった。ヒスタミン受容体の選択

的アゴニストとアンタゴニストを使用した薬理学的実験で示したように、野生型マウスから急性単離した巨大新線体ニューロンには H_1 受容体も H_2 受容体も発現しており(図 3-5) H_1 -KO と H_2 -KO マウスにおいてはそれぞれ H_1 受容体と H_2 受容体は全く機能していないことを確かめた(図 6-7)。図 2 と図 7 で示したように、野生型マウスの低親和性電流成分における電流振幅と EC_{50} 、 nH は、 H_1 -KO マウスにおけるそれと類似の値を示した(野生型: I_{max} , 277 ± 29 pA; EC_{50} , 2.98 μ M; nH , 1.00 ; H_1 -KO: I_{max} , 222 ± 38 pA; EC_{50} , 1.82 μ M; nH , 1.47)。一方、野生型マウスの高親和性電流成分と H_2 -KO マウスにおける電流振幅と EC_{50} 、 nH は、共に類似の値を示した(野生型: I_{max} , 81 ± 2 pA; EC_{50} , 164 nM; nH , 0.89 ; H_2 -KO: I_{max} , 73 ± 18 pA; EC_{50} , 102 nM; nH , 0.97)。これらの結果は H_1 -KO マウスと H_2 -KO マウスの巨大新線体ニューロンにおいて、ヒスタミン受容体を持つ感受性は、KO の処置を行うことによって影響を受けなかったことを示している(図 2 と図 7 参照)。さらに、ヒスタミン添加は $H_{1/2}$ -KO マウスには電流を発生させなかった。このことは、本実験においては、 H_3 受容体は H_1 や H_2 受容体の代わりとして作用しないことを示している。このことは、巨大新線体ニューロンにおいては、 H_1 -KO、 H_2 -KO、 $H_{1/2}$ -KO マウスは同様な薬理学的作用を持ち合わせており、 H_1 もしくは H_2 と、 H_1 と H_2 の両受容体は H_1 と H_2 アンタゴニストによって抑制されると考えられる。

ヒスタミン KO マウスの表現型

ヒスタミンニューロンは、自発性の運動、目覚め、睡眠/起床サイクル、食欲制御、痙攣発作、学習や記憶、攻撃や感情など、多くの興奮性及び抑制性の機能に関与している[22]。ヒスタミンの多くの機能は、ヒスタミン受容体 KO マウスから解明される。例えば、 H_1 -KO マウスは高架式十字迷路テストにおいて、野生型マウスより有意に不安感の減少がみられる[24]。他の行動実験においても、特に早い明るい時間帯では、 H_1 -KO マウスは自発性の運動活動量が上昇し、暗い時間帯では動きが減少する[9]。レプチン誘導性の食欲抑制効果もまた、野生型と比較して H_1 -KO マウスでは減弱化した[15]。興味深いことに、 H_1 -KO と H_2 -KO マウスに見られる表現型は、若干 H_1 -KO より H_2 -KO マウスの方が変化は小さいが、ほとんどの行動実験で似通っている。本実験における電気生理学的特性は、ヒスタミン受容体遺伝子欠損マウスの行動的特徴と一致する。加えて、ヒスタミンもしくはガストリンによる胃酸分泌の誘発は H_2 -KO マウスでは完全に行われず、このことは胃粘膜の細胞のホメオスタシスに H_2 受容体が重要な役割を担っていることを示唆している[13]。

メタンフェタミンは中枢神経刺激であり、ドーパミンの放出を促進し再取り込みを抑制することによって典型的な行動を起こさせ、運動活動量を増加させる。メタンフェタミンの投与は、行動感作と呼ばれる、徐々に起こる長期的な運動の増大と典型的な行動を引き起こすことがよく知られている[10,11,17]。メタンフェタミン誘導性行動感作におけるヒスタミンニューロンの役割との関係において、ヒスタミン作動性の神経伝達の亢進は、メタンフェタミン誘導性の運動の増大と典型的な行動を抑制するという複数の薬理学的実験が存在する[10,11]。ヒスタミンがほぼ存在しない状況下のヒスタミンデカルボキシラーゼ遺伝子ノックアウトマウスにおいて、運動活動量に対するメタンフェタミンの影響が増大することもまた示されている[14]。本実験はメタンフェタミン誘導性の行動感作が H_1 -KO 及び H_2 -KO ではみられないのに対して、 $H_{1/2}$ -KO マウスで観察されたことを示した初めての報告である。この結果は新線体を含む中枢神経系において、 H_1 と H_2 受容体がメタンフェタミン誘導性の運動量の亢進の抑制に相乗の効果を持つことを示している。メタンフェタミン誘導性の行動感作におけるヒスタミンの鎮静的役割は、新線体の GABA 作動性ニューロン上に発現している H_1 と H_2 の両受容体を介していると考えると道理にかなう。

本報告及びこれまでの電気生理学的実験、薬理学的実験そして行動実験から、シナプス伝達[7,12]や、NMDA 受容体の促進や長期増強[20]、末梢神経ニューロンの発火の遮断、メタンフェタミン誘導性行動感作(本実験結果)を含む、中枢神経系の様々な細胞内メカニズムにおいて、ヒスタミンとその受容体が中心的役割を果たしている事を示唆している。

(3)

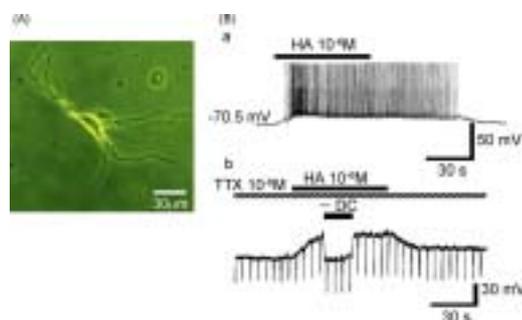


図 1. 野生型マウスから単離された巨大新線状体ニューロンにみられるヒスタミン応答。

(A) 野生型マウスから酵素処理によって単離した典型的巨大新線状体ニューロンの写真。(Ba) 電流固定下、1

μM のヒスタミンに応答する巨大新線状体ニューロンの膜電位。本ニューロンの静止電位は -70.5mV。ヒスタミンによる膜脱分極が一連の活動電位の発生を惹起することに注目。(Bb)電流固定下、1μM TTX 存在下に記録された 1μM ヒスタミンによる応答。ニューロンは Ba と同じ。ヒスタミンで惹起される脱分極は入力抵抗の増加をともなった。毎 5 秒ごとに 1μM TTX の存在下の入力抵抗をチェックするために過分極のステップパルス (30pA, 300ms) を継続的にニューロンへ与えた。- DC とは陰性 DC 電流の注入を示す。B の a と b とは異なる電位スケールであることに注意。

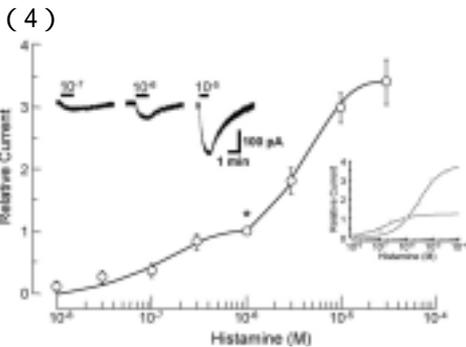


図 2. ヒスタミンの濃度応答曲線。ピークの電流値を 1μM のヒスタミンで発生するピーク電流値 (*) と比較した。各点は 6 ニューロンの平均値で水平バーは ± SEM を示す。曲線は目測でフィットした。挿入図の電流トレースは典型的記録である。右側挿入図のスムーズな曲線は 2 つの濃度範囲 (0.01 ~ 1.0 μM と 1.0 ~ 30 μM) での平均データへヒル式をあてはめてカーブフィットしたもの。上のヒル式のフィットから、高と低親和性の電流成分に対する EC₅₀ と nH はそれぞれ 164 nM と 0.89, 2.98 μM と 1.00 である。高い親和性の電流成分の I_{max} は 1.23、他方低い親和性の電流成分の I_{max} は 3.80 である。

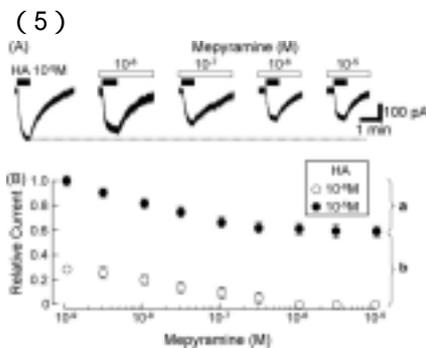


図 3. 野生型巨大新線状体ニューロンへの H₁ 受容体拮抗薬の効果。

電流トレースは選択的 H₁ 受容体拮抗薬のメピラミン有無下のヒスタミン誘起電流の典型的記録である。(A) メピラミンは 10 μM のヒスタミンによって誘起される電流を濃度依存性に抑制したが、メピラミン抵抗性の電流成分は残存した。(B) 1 と 10 μM のヒスタミンで発生した応答へのメピラミンの濃度抑制曲線。ヒスタミンで起こされた電流はメピラミン非存在下に 10 μM ヒスタミンで発生する電流値に標準化した。各点は 15 ニューロンからの平均値 ± SEM である。

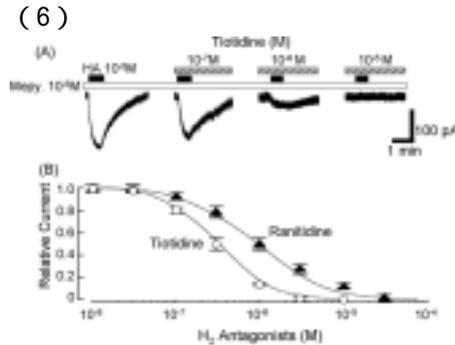


図 4. メピラミン抵抗性のヒスタミン誘起電流成分への H₂ 受容体拮抗薬の効果。電流トレースは選択的 H₂ 受容体拮抗薬であるチオチジン有無下の典型的ヒスタミン誘起電流。(A) 10 μM メピラミンの存在下、チオチジンは濃度依存的に 10 μM のヒスタミンで誘起される電流を抑制した。(B) 10 μM メピラミン存在下、10 μM のヒスタミンで発生した電流へのチオチジンとラニチジンによる濃度抑制曲線。各点は 13 ニューロンからの平均値 ± SEM。

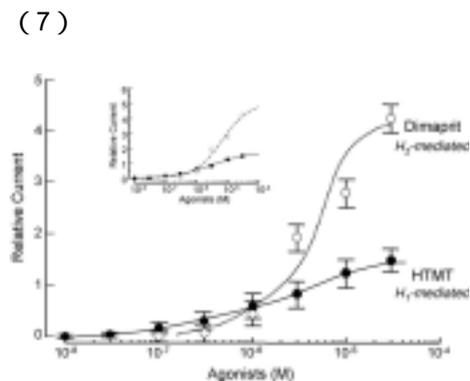


図 5. 野生型ニューロンへの H₁ と H₂ 受容体アゴニストの効果。H₁ 受容体アゴニストの HTMT と H₂ 受容体アゴニストのジマプリットの用量応答関係。各点はアゴニストの異なる濃度に対する応答のピーク電流値で、そのニューロンの 1 μM ヒスタミン応答のピーク電流値に標準化してある。各点は 6 ~ 8 ニューロンの平均値 ± SEM。保持電位は -40mV。2 つのシグモイ

ドカーブは目測で引いてある。挿入図は平均データにヒル式を適応して得たヒスタミンの用量反応曲線。ヒル式のフィットからのEC₅₀とnHはHTMT惹起電流では3.18 μMと0.70 ± 0.07, ジマプリット惹起電流では6.72 μMと1.00 ± 0.31。黒と白丸はそれぞれH₁-とH₂-起因性の電流。

(8)

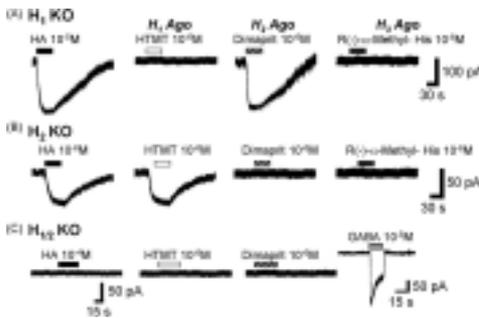


図6. H₁-, H₂-とH_{1/2}KOマウスニューロンへのヒスタミンとそのアゴニストの効果。

(A) H₁-KOマウスニューロンへのヒスタミンとそのアゴニストの効果。10 μMヒスタミンと1 μMジマプリットは共に内向き電流を惹起するが、他方1 μMのHTMTや1 μM(R⁻)アルファメチルヒスタミンは電流を発生しない。(B)H₂-KOマウスニューロンにおいて、1 μMヒスタミンと1 μM HTMTは内向き電流を起こすが、一方1 μMジマプリットや(R⁻)アルファメチルヒスタミンは電流を発生しない。(C)H_{1/2}-KOマウスニューロンでは、高濃度(100 μM)のヒスタミン、H₁、H₂やH₃受容体の選択的アゴニスト共に電流を発生しない。しかし本ニューロンにおいて10 μM GABAは内向き電流を発生できた。

(9)

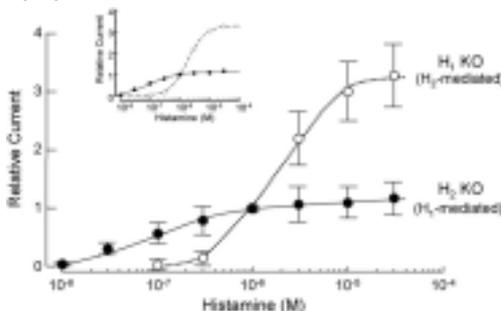


図7. H₁-とH₂-KOマウスニューロンへのヒスタミン効果

H₁-とH₂-KOマウスニューロンにおけるヒスタミンの用量反応曲線。ヒスタミンに対するH₁受容体関連の電流成分がH₂受容体関連のもの

のより大きかった。ヒスタミンで惹起された全ての電流はH₁-とH₂-KOマウスニューロンにおけるピーク電流値に標準化してある。各点は5~6ニューロンの平均値 ± SEM。保持電位は-40mV。黒と白丸データ点のカーブフィットは目測である。挿入図におけるヒスタミン用量反応曲線は平均値に対するヒル式の適用でフィットされている。ヒルフィットでのEC₅₀とnH値はH₁-KOマウスニューロンでは1.82 μMと1.47 ± 0.09そしてH₂-KOマウスニューロンでは102nMと0.97 ± 0.11である。黒丸と白丸はH₁-とH₂-KOマウスニューロンから得られて電流を示す。

(10)

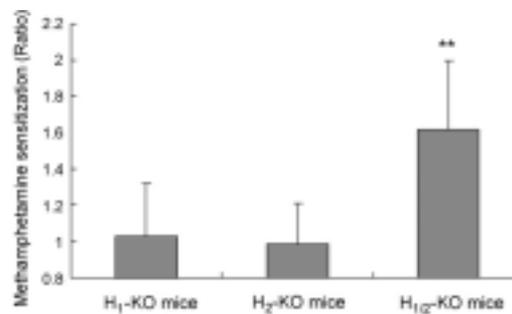


図8. H₁-, H₂とH_{1/2}-KOマウスの行動感作へのメタンフェタミンのくり返し投与の効果。行動感作がメタンフェタミンのくり返し投与によって発生し、野生型マウスのそれと比較した。H_{1/2}-KOマウスの行動感作は野生型マウスの1.6倍に増加した。統計処理はANOVA法による。H_{1/2}-とH₁-KOマウスそしてH_{1/2}-とH₂-KOマウス間の差はp < 0.01で有意差がみられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計12件)

M. Kawachi, N. Hori, M. Takei, T. Kurimoto, N. Akaike, Y. Ito. Gastric relaxation induced by electrical and chemical stimulation of the area postrema in the rat. *Gen Physiol Biophys.* 27(4): 243-252, 2009. 査読有

S. Ogawa, K. Yanai, T. Watanabe, ZM. Wang, H. Akaike, Y. Ito, N. Akaike. Histamine responses of large neostriatal interneurons in histamine H1 and H2 receptor knock-out mice. *Brain Res.* 16: 78 (4-5): 189-194, 2009. 査読有

M. Maeda, E. Tanaka, K. Shoudai, K. Nonaka, N. Murayama, Y. Ito, N. Akaike

Differential effects of divalent cations on spontaneous and evoked glycine release from spinal interneurons. J Neurophysiol 101(2): 1103-1113, 2009. 査読有

MC. Shin, CJ. Kim, BI. Min, S. Ogawa, E. Tanaka, N. Akaike

A selective T-type Ca²⁺ channel blocker R(-) efonidipine. Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol. 377(4-6): 411-421, 2008. 査読有

K. Sasaki, Y. Takayama, T. Tahara, K. Anraku, Y. Ito, N. Akaike

Quantitative analysis of toxin extracts from various tissues of wild and cultured puffer fish by an electrophysiological method. Toxicon. 51(4): 606-614, 2008. 査読有

E. Kondratskaya, K. Nonaka, N. Akaike

Influence of Purinergic modulators on eEPSCs in rat CA3 hippocampal neurons: Contribution of ionotropic ATP receptors. Neurophysiology. 40: 21-29, 2008. 査読有

K. Shoudai, K. Nonaka, M. Maeda, W ZM. ang, HJ. Jeong, H. Higashi, Murayama, N. Akaike

Effects of various K⁺ channel blockers on spontaneous glycine release at rat spinal neurons. Brain Res. 1157: 11-22, 2007. 査読有

S. Koyama, N. Akaike

Activation of mu-opioid receptor selectively potentiates NMDA-induced outward currents in rat locus coeruleus neurons. Neurosci Res. 60(1): 22-28, 2007. 査読有

M. Sorimachi, M. Wakamori, N. Akaike
Excitatory effect of ATP on rat area postrema neurons. Purinergic Signalling. 2: 545-557, 2006. 査読有

Y. Owada, SA. Abdelwahab, N. Kitanaka, H. Sakagami, H. Takano, Y. Sugitani, M. Sugawara, H. Kawashima, Y. Kiso, JI. Mobarakeh, K. Yanai, K. Kaneko, H. Sasaki, H. Kato, S. Saino-Saito, N. Matsumoto, N. Akaike, T. Noda, H. Kondo

Altered emotional behavioral responses in mice lacking brain-type fatty acid-binding protein gene. Eur J Neurosci. 24(1): 175-187, 2006. 査読有

IS. Jang, M. Nakamura, Y. Ito, N. Akaike
Presynaptic GABA_A receptors facilitate spontaneous glutamate release from presynaptic terminals on mechanically dissociated rat CA3 pyramidal neurons. Neuroscience 138(1): 25-35, 2006. 査読有

IS. Jang, MS. Brodwick, ZM. Wang, HJ. Jeong, BJ. Choi, N. Akaike

The Na(+)/H(+) exchanger is a major pH regulator in GABAergic presynaptic nerve terminals synapsing onto rat CA3 pyramidal neurons. J Neurochem. 99(4): 1224-1236, 2006 査読有

〔学会発表〕(計 24 件)

N. Akaike, Y. Ito, MC. Shin, M. Maeda, K. Nonaka, T. Harakawa

A. Ginnaga, Effects of novel neurotoxin, A2-NTX, on the excitatory and inhibitory CNS transmission. The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2009/1/17-18 Pusan/Korea

M. Maeda, K. Shoudai, K. Nonaka, N. Akaike, Y. Ito

Modulation of Glycine release at a single synapse by Ca²⁺, Sr²⁺ and Ba²⁺. The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2009/1/17-18 Pusan/Korea

K. Nonaka, M. Maeda, K. Shoudai, T. Yamaga, N. Akaike

Both P- and R-Type Ca²⁺ channels regulate mainly glycine release in rat spinal cord. The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2009/1/17-18 Pusan/Korea

H. Akaike, S. Jang, N. Hori, S. Ogawa, N. Akaike, Y. Ito

Effects of Z-338 on the action of excitatory and inhibitory neurotransmitters on neurons in area postrema. The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2009/1/17-18 Pusan/Korea

S. Ogawa, MC. Shin, E. Tanaka, N. Kotani, N. Akaike

Effects of volatile anesthetics on GABAergic pre- and post-synaptic membranes. The 8th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles. 2009/1/17-18 Pusan/Korea

N. Akaike, S. Ogawa, Y. Takayama, Analysis of toxin extracts from various tissues of wild and cultured puffer fish. The Japanese Journal of Physiology, 2008.

古賀浩平, 水口洋子, 古江秀昌, 赤池紀生, 吉村 恵. In vivo パッチクランプ記録法を用いたラット一次体性感覚野における痛覚応答の解析. 第 59 回西日本生理学会, 2008/10/3-4 熊本

野中喜久, 前田 恵, 山鹿敏臣, 田中永

一郎, 村山伸樹. 単一グリシン作動性神経終末部にみられる高閾値 Ca チャネルの分布. 第 59 回西日本生理学会, 2008/10/3-4 熊本
前田 恵, 田中永一郎, 正代清光, 村山伸樹, 赤池 紀生. 単一シナプス前終末からのグリシン遊離に及ぼす 2 価陽イオンの効果. 第 9 回応用薬理シンポジウム, 2007/9/10 東京

野中喜久, 村山伸樹, 赤池紀生. 中枢神経終末部における伝達物質放出のメカニズム解明. 第 9 回応用薬理シンポジウム, 2007/9/10 東京

申 敏哲, 小川幸恵, 田中永一郎, 赤池紀生. T 型 Ca^{2+} チャネル阻害剤 'R(-)エホニジピン'. 第 58 回西日本生理学会, 2007/10/19-20 福岡

E. Kondratskaya, K. Shoudai, N. Akaike Novel insight on the purinergic signalling in rat hippocampus with single bouton stimulation technique. IBRO World Congress of Neuroscience. 2007/7/12-17 Melbourne, Australia

K. Nonaka, N. Murayama, N. Akaike Neurotransmission at mammalian single synapse. IBRO World Congress of Neuroscience. 2007/7/12-17 Melbourne, Australia.

N. Akaike Functional studies at a single excitatory or inhibitory brain synapse. IBRO World Congress of Neuroscience. 2007/7/12-17 Melbourne, Australia.

MC. Shin, S. Ogawa, K. Nonaka, Y. Ito, N. Akaike

A selective T-type Ca^{2+} channels blocker. The 7th Japan-Korea joint symposium of brain sciences, and cardiac and smooth muscles. 2007/12/8-10 仙台

S. Ogawa, MC. Shin, K. Nonaka, Y. Ito, N. Akaike

Effect of volatile and intravenous anesthetics on the transmitter release in a single CNS synapse. The 7th Japan-Korea joint symposium of brain sciences, and cardiac and smooth muscles. 2007/12/8-10 仙台

MC. Shin, K. Nonaka, N. Akaike A selective T-type Ca^{2+} channels blocker. 5th international symposium on receptor mechanism, signal transduction and drug effects. 2007/5/10-11 静岡

M. Sorimachi, N. Akaike, M. Wakamori Functional interactions between P2X receptors and GABA- or Glycine-receptor in rat area postrema neurons. The Japanese Journal of Physiology, 2006/3/28-30 群馬
野中喜久, 正代清光, 前田 恵, 東 英

穂, 村山伸樹, 赤池紀生. 単一シナプスからのグリシン遊離に及ぼす 2 価陽イオンの効果. 第 57 回西日本生理学会, 2006/10 /27-28 日.宮崎

E. Kondratskay, N. Akaike, Analysis of excitatory postsynaptic current components in the rat hippocampal neurons. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Program & Abstracts, 205, 2006/10/18 Seoul/Korea

21 K. Nonaka, M. Maeda, K. Shoudai, H. Higashi, N. Murayama, N. Akaike, Effects of divalent cations on glycinergic IPSCs elicited at A single synapse. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Program & Abstracts, 282, 2006/10/18 Seoul/Korea

22 K. Shoudai, K. Nonaka, M. Maeda, H. Higashi, N. Murayama, N. Akaike, Effects of Ca^{2+} channel blockers on evoked glycinergic IPSCs in the rat spinal neurons. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Program & Abstracts, 274, 2006/10/18 Seoul/Korea

23 MC. Shin, B. Min, C.J. Kim, K. Shoudai, S. Ogawa, N. Akaike, A selective T-Type Ca^{2+} channel blocker, R(-) efonidipine effect of a novel T-Type Ca channel blocker of the rat hippocampal neurons. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Program & Abstracts, 264, 2006/10/18 Seoul/Korea

24 S. Ogawa, H. Higashi, Y. Ito, N. Akaike, Effect of selenium on contraction mechanism of the bovine tracheal smooth muscle cells. The 6th Congress of the Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Program & Abstracts, 245, 2006/10/18 Seoul/Korea

[その他]

<http://www.kumamoto-hsu.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤池 紀生 (AKAIKE NORIO)
熊本保健科学大学・保健科学部・教授
研究者番号: 30040182

(2) 研究分担者

正代 清光 (SHODAI KIYOMITU)
熊本保健科学大学・保健科学部・講師
研究者番号: 90290650
野中 喜久 (NONAKA KIKU)
熊本保健科学大学・保健科学部・講師
研究者番号: 70259745

前田 恵 (MAEDA MEGUMI)
熊本保健科学大学・保健科学部・助教
研究者番号：10369126
小川 幸恵 (OGAWA SATIE)
熊本保健科学大学・保健科学部・助教
研究者番号：40380563