

令和 4 年 5 月 13 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09541

研究課題名(和文) 神経障害後に引き起こされる疼痛の増悪に対する非神経細胞活性化の関与とその機構

研究課題名(英文) Involvement of non-neuronal cell activation in the development of pain following nerve injury.

研究代表者

久保 亜抄子 (Kubo, Asako)

生理学研究所・生体機能調節研究領域・特別協力研究員

研究者番号：70733202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋顔面部の疼痛を受容する三叉神経節細胞の興奮性に対する非神経細胞の関与を検討した。三叉神経節内に存在する非神経細胞である衛星細胞を化学的に刺激することが神経節細胞の興奮性に影響を与えるかを調べるために、パッチクランプ法により調べた。神経節細胞の興奮性はATP受容体作動薬投与により増加した。本変化はATP受容体阻害薬・代謝型グルタミン酸受容体阻害薬・ギャップ結合阻害薬の存在下で抑制された。これらのことから、神経節細胞を興奮させる衛星細胞の化学的活性化にはATP受容体・ギャップ結合・代謝型グルタミン酸受容体が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：病態下での神経の異常興奮が疼痛を引き起こすことはよく知られている。近年、神経系組織に存在する非神経細胞が疼痛発症に寄与することが報告されるようになったが、特に末梢神経におけるその詳細は不明であった。本研究により、末梢神経系における非神経細胞の役割と神経細胞を興奮させる機序があきらかとなった。

社会的意義：(慢性)疼痛を有する国民は多く、疼痛によりQOLが低下することが問題となっている。本研究により、どのように疼痛発症に非神経細胞が関わっているかを明らかにできれば、新たな疼痛治療薬の開発や予防法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：The involvement of non-neuronal cells in the excitability of trigeminal ganglion cells, which are receptive to nociception in the craniofacial region, was evaluated. We examined whether chemical stimulation of non-neuronal satellite cells affects the excitability of trigeminal ganglion cells by the patch-clamp recording. We found that neuronal excitability was increased following an ATP receptor agonist application. This change was reversed in the presence of ATP receptor inhibitors, metabolic glutamate receptor inhibitors, or gap junction inhibitors. These findings indicate that ATP receptors, gap junctions, and metabotropic glutamate receptors are involved in the chemical activation of satellite cells that make trigeminal ganglion cells excite.

研究分野：神経生理学

キーワード：三叉神経節 サテライトグリア P2X7

1. 研究開始当初の背景

様々な病因により、炎症や神経障害が引き起こされると、中枢神経系に存在する神経膠細胞が活性化される。神経膠細胞はもともと神経細胞とは異なる役割を有する細胞群であるが、この神経膠細胞の活性化によって神経細胞の興奮性が增大することが報告されている。一方、末梢神経の細胞体が存在する後根神経節や三叉神経節内にも神経膠細胞の一種である衛星細胞が存在しており、病態下において活性化され、末梢神経の異常興奮を引き起こす可能性が示唆されている。例えば、頭蓋顔面領域を支配している感覚神経である三叉神経の損傷によって引き起こされる痛覚過敏は、衛星細胞の活性化とリンクしており、衛星細胞を不活性化することで痛覚過敏が減弱することが報告されている。しかしながら、衛星細胞と感覚神経との機能連関の詳細な機構は明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、特に頭蓋顔面領域を支配する三叉神経節において、衛星細胞が活性化されることで、感覚神経(神経節細胞)の興奮性がどのように変化するかについて細胞生理学的手法を用いて詳細に検討し、衛星細胞活性化と神経節細胞の興奮性および情報伝達の機構を解明する。さらに免疫組織化学的解析・分子細胞生理学的解析を行い、その分子機構を解明する。従来から、疼痛発症機構の1つとして生体内分子であるATPの関与が示されている。衛星細胞にはATP受容体として非選択的陽イオンチャネルであるP2X7受容体が発現していることが知られていることから、本研究では、ATPをトリガーとした衛星細胞の活性化とそれに引き続く神経節細胞の興奮性変調機構に注目し、本機能連関の詳細を明らかにすることで新たな頭蓋顔面領域の疼痛治療法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経スライス標本からのパッチクランプ記録

5-10週齢のSprague-Dawley系雄性ラットから三叉神経節を取り出し、スライス標本作製した。本三叉神経節スライス標本を赤外線微分干渉顕微鏡下にセットし、小径～中径の三叉神経節細胞からパッチクランプ記録を行った。

(2) P2X7作動薬投与による神経活動性変化の解析

神経節細胞からのパッチクランプ記録下にて、イオンチャネル型ATP受容体であるP2X7の作動薬である2'(3')-O-(4-Benzoylbenzoyl)adenosine 5'-triphosphate (BzATP)を灌流投与し、投与前・投与15分後・30分後の神経興奮性パラメータを比較した。また、vehicle投与群においても同様に記録を行った。さらに、P2X7受容体阻害剤、ギャップ結合阻害剤、代謝型グルタミン酸受容体阻害剤灌流投与下にてBzATPを投与し神経興奮性のパラメータ変化を比較した。

(3) 三叉神経節の免疫組織化学的解析

5-10週齢のSprague-Dawley系雄性ラットを安楽死させた後、4%パラホルムアルデヒドを使用して灌流固定した。固定後に三叉神経節を取り出して凍結切片を作成した。抗P2X7受容体抗体を用いて蛍光免疫染色を行い、P2X7受容体の発現部位を確認した。

(4) 初代培養衛星細胞の解析

2-14日齢のSprague-Dawley系ラットを安楽死させた後、三叉神経節を取り出した。酵素処理等を行い、衛星細胞の一次培養標本作製した。本標本に対し、BzATPを投与して細胞外液中のグルタミン酸量の解析を行った。

4. 研究成果

(1) ホールマウント標本とスライス標本からのパッチクランプ記録(図1)

取り出した三叉神経節をそのまま(ホールマウント標本)使用してパッチクランプ記録を行った場合とスライス標本作製して記録を行った場合について、神経節細胞の興奮性パラメータを比較した結果、静止膜電位・基電流ともに有意な差はみられなかった(ホールマウント標本: n=13, スライス標本: n=22)。このことから、これ以降の記録には両方の標本を使用した。

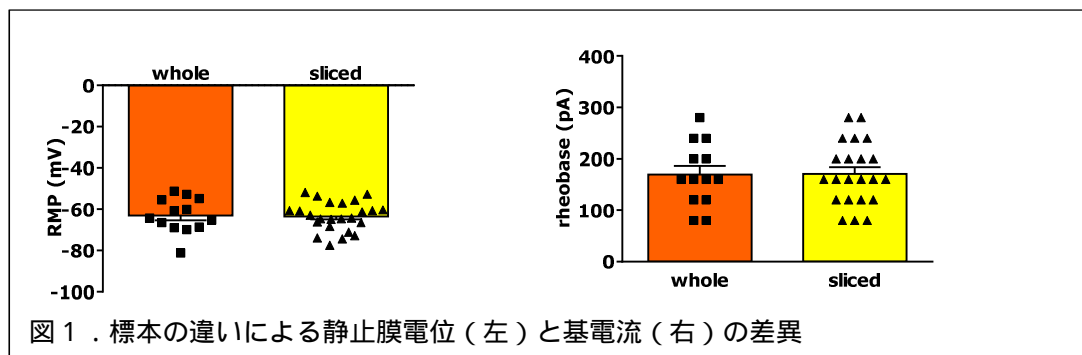


図1. 標本の違いによる静止膜電位(左)と基電流(右)の差異

(2) P2X7 作動薬投与による神経活動性変化 (図2)

(1) で示した神経節細胞からのパッチクランプ記録下にて、BzATP を灌流投与し、活動電位および基電流の変化を記録した。vehicle 投与群と BzATP 投与群において、灌流投与前に対する静止膜電位の相対値を 15 分および 30 分後に比較した結果、vehicle 投与群では有意な変化はみられなかったが BzATP 投与群では 30 分後に有意に小さく (浅く) なった。また、基電流は BzATP 投与群において、15 分後・30 分後に有意に小さくなった。

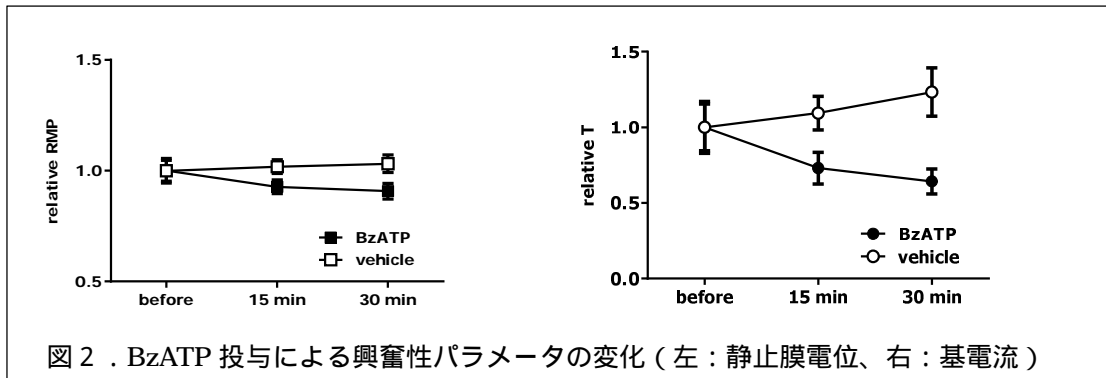


図2 . BzATP 投与による興奮性パラメータの変化 (左: 静止膜電位、右: 基電流)

(3) BzATP による神経の興奮性に対する阻害剤の効果

P2X7 受容体阻害剤である A740003 存在下にて BzATP を灌流し、神経節細胞の興奮性パラメータの変化を比較した。A740003 存在下では、静止膜電位・基電流ともに 15 分および 30 分後に有意な変化はみられなかった。さらに、BzATP による神経節細胞の興奮性の上昇は、代謝型グルタミン酸受容体 5 の選択的阻害剤である MTEP もしくはギャップ結合阻害薬を存在させることで抑制された。

(4) 三叉神経節の免疫組織化学的解析

ラット凍結切片の蛍光染色により、P2X7 受容体の発現部位を調べたところ、P2X7 受容体は神経節細胞には発現しておらず、神経節細胞を取り囲むように存在している衛星細胞に発現していることがあきらかとなった。

(5) 初代培養衛星細胞の解析

細胞日齢や培地の検討を行った結果、三叉神経節細胞がほぼ混在せず、衛星細胞密度の高い初代培養標本を得る条件を確立できた。本標本内の細胞は衛星細胞のマーカーであるグルタミン合成酵素抗体を用いた免疫組織染色で陽性であった。また、神経細胞のマーカーである NeuN 抗体を用いた免疫組織染色では陰性であった。本培養細胞に対し、BzATP を作用させ、培養液中のグルタミン酸濃度を測定した。BzATP 投与前と投与 30 分で比較するとグルタミン酸は増加していたが、vehicle 投与群とは有意差がなかった。

(6) まとめ

本研究の結果から、神経膠細胞の一種であり末梢神経の細胞体に存在する衛星細胞に特異的に発現している ATP 受容体 P2X7 が活性化することで、神経節細胞の興奮性が変化することがわかった。またこの興奮性変化は、ギャップ結合阻害や神経節細胞に発現している代謝型グルタミン酸受容体 5 を阻害することで抑制されることがあきらかとなった。これらのことから、衛星細胞と神経節細胞の機能連関には衛星細胞からギャップ結合を介して放出されるグルタミン酸が寄与している可能性が示唆された。これまでに、末梢神経の異常興奮により神経節細胞から ATP が放出され、衛星細胞が興奮することが報告されている (Zhang ら: PNAS, 2007)。これに加えて本研究結果により、衛星細胞から神経節細胞を興奮させる経路が示された。本研究結果により、新たな頭蓋顔面領域の疼痛治療法の確立が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Shinoda Masamichi, Kubo Asako, Hayashi Yoshinori, Iwata Koichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Peripheral and Central Mechanisms of Persistent Orofacial Pain	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2019.01227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shinoda Masamichi, Hayashi Yoshinori, Kubo Asako, Iwata Koichi	4. 巻 62
2. 論文標題 Pathophysiological mechanisms of persistent orofacial pain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 131~135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0373	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 A Kubo, K Iwata
2. 発表標題 Ex vivo electrophysiological evaluation of the involvement of glia-neuron interactions within the trigeminal ganglion in orofacial pain mechanisms
3. 学会等名 International Association for the Study of Pain (IASP) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 A Kubo, S Sugawara, K Iwata
2. 発表標題 Electrophysiological approach with ex vivo trigeminal ganglia to clarify neuron-glia interactions
3. 学会等名 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	篠田 雅路 (Shinoda Masamichi) (20362238)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------