

機関番号：13101

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008 ~ 2010

課題番号：20390511

研究課題名 (和文) GABAA 受容体は本当に痛覚伝達を抑制させるか？

研究課題名 (英文) Is GABAA receptor involved in trigeminal nociceptive transmission?

研究代表者

瀬尾 憲司 ( SEO KENJI )

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：40242440

研究成果の概要 (和文)：

1. PRIP-1, PRIP-2 遺伝子がノックアウトされているダブルノックアウト (DKO) マウスの脊髄後角の免疫組織的分析では、GABAA 受容体  $\gamma 2$  サブユニットは消失していたが、 $\alpha 1$  と  $\beta 3$  サブユニットは増加していた。GABAA 受容体を活性化すイソフルランの MAC は DKO マウスの方が有意に低かった (Student *t*-test,  $p < 0.001$ )。これは逃避反射の抑制には GABA<sub>A</sub> 受容体  $\gamma 2$  サブユニットは影響しないことを示唆する。

2. 延髄スライス標本で三叉神経脊髄路核尾側亜核では、GABAA 受容体 agonist である muscimol の灌流は Wild と DKO の両方で興奮の伝搬と細胞内カルシウム濃度変化を抑制しなかった。

3. BDNF に浸漬して muscimol の還流下で tract を電気刺激すると興奮伝搬の領域は muscimol 灌流による影響を受けることが多かった。

以上より、延髄後角における GABAA 作動性の介在ニューロンは、何らかの刺激により放出されたグリア由来の BDNF がそれらのニューロンを介して興奮伝搬に影響を及ぼしている可能性があると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：

Introduction; This project aimed to investigate the possible involvement of GABAA receptor mediated nociceptive modulation in the spinal or trigeminal dorsal horn. We used PRIP-1, PRIP-2 double knockout mice (DKO) which deficits some GAGAA receptor function.

Method and results: Immunohistochemical study exhibited a complete deficit in  $\gamma 2$  subunit of GABAA receptor on cell surface of the superficial and deep magnocellular layers in spinal cord of DKO mice. The MAC of wild or DKO animal was  $1.36 \pm 0.04$  % (n=10) or  $1.07 \pm 0.01$  % (n=10), respectively (Student's *t*-test,  $p < 0.001$ ). These results suggest that the stimulation of  $\gamma 2$  subunit might did not induce anti-nociceptive effect.

Thirdly, spatial and temporal propagation of membrane potential and the changes in the intra-cellular calcium concentration in the slice of medulla exhibited the similar propagation between in the wild and DKO animals and furthermore a perfusion of the highly-selective GABAA receptor agonist muscimol did not induce any difference in these propagation features. The preconditioning by BDNF induced some difference in

afferent stimulation induced changes in membrane potential propagation under muscimol perfusion.

Conclusion; these results suggest that GABAA receptor does not have any significant role in modulation of nociceptive transmission in normal condition but some stimuli induce BDNF releasing might have some modulating effect on this transmission feature.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2009	2,500,000	750,000	3,250,000
2010	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯科麻酔学

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛患者の疼痛治療や歯科治療での精神鎮静法などにベンゾジアゼピンなどを投与するが、臨床的に疼痛を感じにくくなることがあっても、疼痛を感じなくなることはないことを体験する。ベンゾジアゼピンは代表的な GABAA 受容体作動薬であり、脊髄後角第 2 層に存在する抑制性介在ニューロンに作用して 2 次ニューロンへの興奮伝達を抑制すると考えられている。確かにラットの脊髄後角を利用した脊髄求心性線維への電気的刺激によって生ずる 2 次ニューロンの電気的興奮活動を測定した報告でも、その抑制効果は認められている。しかしこれらは活動電位の発生自体を消失させていない。臨床的病態像とは乖離が生じている。本研究では GABAA 受容体の刺激が本当に脊髄または延髄 1 次ニューロンから 2 次ニューロンへの興奮伝達を抑制するかについて検討した。そのために、脊髄または延髄における一部のニューロンによる反応に対する変化でなく、神経核全体の反応を調べるために膜電位変化の光学的測定による高速 2 次元解析法を用いた。

2. 研究の目的

(1) 神経損傷モデルの行動分析

従来、逃避行動分析はラットを使用して行われることが多かったが、遺伝子改変動物による研究結果と直接対比することが不可能で

あるため、マウスを使用した実験系が望まれる。さらに顔面（三叉神経）領域での実験系は少ないため、マウスを使用した顔面のニューロパチーモデルを構築する。

(2) GABAA 受容体の脳内分布

中枢神経系の興奮抑制には GABAA 受容体が重要であり、バルビタール系麻酔薬は GABAA 受容体チャンネルに作用して、膜の過分極を増強し、興奮の鎮静作用を示す。しかし脳内の部位別にそれらの作用は異なることも報告されている。そこで海馬、大脳皮質において麻酔薬の関与が示唆されている  $\beta$  2,3 サブユニットの分布の差を免疫組織学的に検討する。さらにサイアミラルの脳部位別に作用の違いも検討する。

(3) 遺伝子改変動物による検討

新規イノシトール 1,4,5-三リン酸結合蛋白質質である PRIP-1 と GABA 関連蛋白との結合は GABAA 受容体  $\gamma$  2 サブユニットを有する GABAA 受容体の形成を調節している。この  $\gamma$  2 サブユニットの機能を完全に消失させるために PRIP-1 と PRIP-2 の両遺伝子の改変したマウス(DKO マウス)を用いて、 $\gamma$  サブユニットに作用するイソフルランの麻酔効果を検討する。

(4) 低温条件での神経興奮伝搬

脳神経活動に対する温度の影響を解明する

ため、局所脳組織における神経機能の温度による変化を精査することは有用である。そこで、脳温の低下によるシナプス活動や膜興奮伝搬などの局所脳機能の変化について、低温で灌流した大脳皮質と海馬の切片標本における膜電位画像や細胞内遊離カルシウム濃度画像を解析し、温度低下による局所脳機能への影響を検討する。

(5) 長期増強発生の神経興奮伝搬  
長期増強 LTP とは、興奮性入力線維束への短時間高頻度刺激を加えることにより、刺激後のその経路のシナプス伝達効率が著しく亢進し、その状態を長く持続するという現象である。海馬は LTP がよく観察される部位であり、海馬や大脳皮質での局所脳機能変化としての LTP の発生を画像で検討する。

(6) GABAA 受容体アゴニストによる脳切片内神経興奮伝搬の抑制  
顔面領域からの侵害求心性信号は、三叉神経脊髄路核尾側亜核に投射し視床へ伝達される。そこで侵害神経の抑制効果を調べるために延髄における電気的活動を検討する。

(7) PRIP-1,2 欠損マウスにおける延髄切片神経興奮伝達の解析  
三叉神経領域の痛覚伝達に対する GABAA 受容体作動物質の作用を検討するため、DKO マウスの延髄での興奮伝搬の検討を行う。

(8) GABAA 受容体の神経興奮性伝搬の可能性に対する検討  
末梢神経損傷による一次ニューロンからの ATP 放出はミクログリアから BDNF を放出させ、GABA 作動性抑制性介在ニューロンを介して二次ニューロンの興奮を惹起する。そこで GABA 受容体が抑制性ではなく、興奮性に作用する可能性について検討する。

### 3. 研究の方法

#### (1) マウス逃避行動を用いた検討

8 週齢の雄性 C57BL6J マウスを使用した。麻酔後、顎下部正中切開し、オトガイ神経を露出して右側を絹糸で縫合結紮した。なお、手術 10 日前から無麻酔下でマウスを手で押さえながら von Frey Filament にて刺激を行うことが出来るように訓練を行った。術後 70 日間まで逃避行動を起こす閾値を測定した。

(2) 吸入麻酔薬に対する逃避行動検討  
酸素と 0.8% の揮発性吸入麻酔薬であるイソフルランを流した小チャンバー内に 8 週齢の雄性 C57BL6J マウスまたは 8 週齢の DKO マウスを入れておき、チャンバーから出したマウスの尻尾をクランプして逃避反応発現の有無を調べた。逃避反応はクランプ開始後 1 分

以内に発現したものを陽性と判定した。麻酔ガス濃度は 0.8% から順次 0.1% ずつ上昇し、反応消失まで観察した。

#### (3) 膜電位興奮伝搬または細胞内遊離カルシウムの光学的測定法

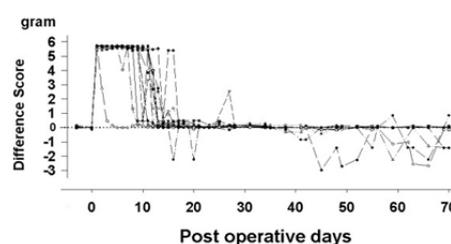
6~8 週齢の雄性 C57BL6J マウスから脳を摘出し海馬、大脳皮質の矢状切片を作製した。膜電位画像測定は Di-4-ANNEPS で染色した脳切片を、また、細胞内遊離カルシウム画像測定は rhod-2 で染色した脳切片を用いた。微小タングステン電極で、大脳皮質は V 層に、海馬は CA1 放射層に  $50 \mu\text{A}$ 、 $100 \mu\text{s}$  のパルス刺激を与え、誘起される蛍光強度変化を MiCAM02 (Brainvision Co.) で計測した。LTP は、 $50 \mu\text{A}$ 、 $100 \mu\text{s}$  のパルスを 100Hz で 10 回与える高頻度パルストレーン刺激を 4 回繰り返して LTP 誘発を行った。刺激前後での LTP 発生を検討した。三叉神経脊髄路核標本は、延髄水平断スライスチャンバー内で還流した。刺激は脊髄路へ  $100 \mu\text{A}$ 、 $100 \mu\text{s}$  のパルス刺激を与え、32 回加算平均した。

#### (4) GABAA 受容体サブユニットの免疫組織学的検討方法

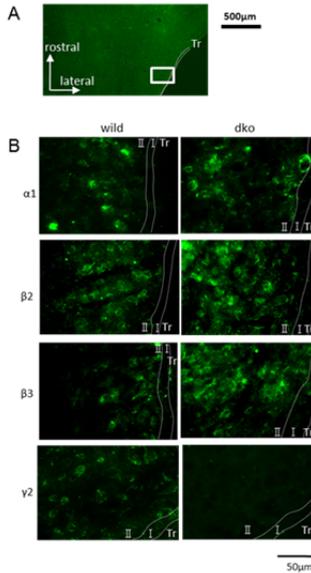
マウスの還流・固定後、頸部脊髄を摘出し 25% シュークロス内に保存した。ドライアイス・イソペンタン法にて凍結ブロック作成し、クリオスタットにて厚さ  $10 \mu\text{m}$  で水平断の標本作製した。一次染色には Anti-GABAA Receptor  $\gamma 2$  抗体 (Biomol international, PA) を、Anti-GABAA Receptor  $\beta 2$  抗体 (R-18) または  $\beta 3$  抗体 (V-17) (Santa Cruz Biotechnology, CA) を使用した。二次染色として Donkey anti-rabbit IgG-FITC (Santa Cruz Biotechnology, CA) を 400 倍希釈で使用した。これらは蛍光顕微鏡 BZ-9000 (Keyence, Osaka) にて B 励起による G 蛍光観察を行った。

### 4. 研究成果

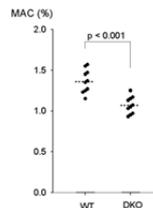
(1) マウスによる逃避行動観察の可能性  
マウスによる手術前の訓練は有効であった。オトガイ神経結紮は、術後約 2 週間の逃避閾値の上昇をもたらした。結紮の中核側では神経線維内に神経ペプチド貯留が認められた。非損傷側との差 = difference score



(2) GABA<sub>A</sub> 受容体の脳内分布別の違い  
 GABA<sub>A</sub> 受容体  $\gamma$ 2 サブユニットは Wild type では脊髄後角浅層または深層に多く認められ、また細胞膜上に認められた。

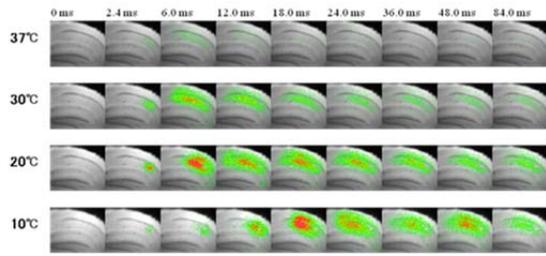


イソフルラン MAC の Wild マウスと DKO マウスでは  $1.36 \pm 0.04$  (n=10) と  $1.07 \pm 0.01$  % (n=10) で、DKO マウスが有意に低かった (Student *t*-test,  $p < 0.001$ )。

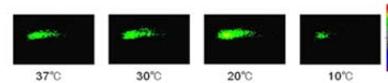


イソフルラン MAC は DKO マウスで Wild マウスに比べて低値であったことから、 $\gamma$ 2 サブユニットの消失は DKO マウスにおいて GABA<sub>A</sub> 受容体の作用を増強したことになる。この GABA<sub>A</sub> 受容体への作用はおもに痛覚伝達系で生じたと考えられ、 $\gamma$ 2 サブユニットの消失は他のサブユニットの代償性増加を誘導した可能性がある。脊髄後角ではイソフルランによる逃避反射の抑制には GABA<sub>A</sub> 受容体の  $\gamma$ 2 サブユニットは影響しないと推察される。

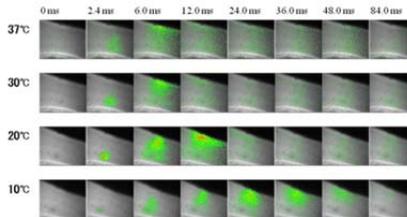
(3) 神経伝達機能の脳内部位別の差  
 海馬では 20°C 以下の低温において伝搬速度が異なる 3 相の興奮が分離して観察される。速い興奮に続く大きな興奮が CNQX で抑制されたことから、この興奮が興奮性シナプス後ニューロンの興奮であると考えられる。



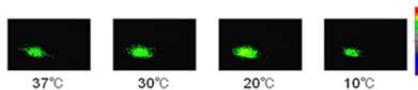
単発刺激による細胞内遊離カルシウム上昇の画像は、刺激部位の放射層に顕著で、刺激電極先端近傍に強く、遠位になるにしたがって減弱している。



また、30°C、20°C では、温度の低下とともに細胞内遊離カルシウム上昇も増加し、10°C では逆に著明に抑制されている。膜電位の興奮伝搬増強と一致していないことから、観察された細胞内遊離カルシウム上昇は、シナプス後ニューロンの興奮によるものではないと考えられる。大脳皮質でも温度の低下とともに、興奮応答の増強が認められた。大脳皮質 V 層刺激によって誘発される II - III 層内の興奮は、CNQX によって抑制されるが、低温では興奮性シナプス後ニューロンの興奮が増強した。



単発刺激による細胞内遊離カルシウム上昇の画像は、刺激部位の V 層に顕著で、刺激電極先端近傍から遠位になるにしたがって減弱している。30°C、20°C では温度の低下とともに細胞内遊離カルシウム上昇も増加しているが、10°C では逆に著明に抑制されている点は海馬と同様である。



興奮の広がる II - III 層では細胞内遊離カルシウム上昇が認められず、観察された細胞内遊離カルシウム上昇は、シナプス前における遊離カルシウム上昇を反映したと考えられる。したがって大脳皮質でも低温でのシナプス後ニューロンの興奮は増強したが、その後の持続性興奮は観察されず、刺激により誘発される興奮と鎮静の過程が異なることが示

唆された。海馬や大脳皮質の長期増強は、AMPA/kinate 受容体を介するシナプス応答の効率が変化する現象であり、高頻度刺激によって切片において細胞内遊離カルシウムレベルが上昇し持続することが観察された。

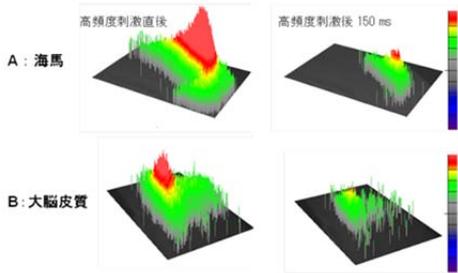
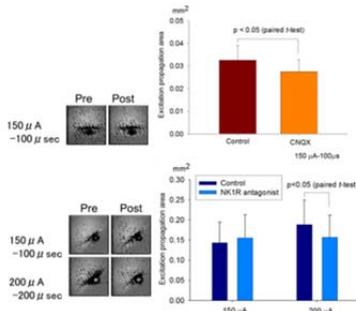


図4 脳切片における高頻度刺激による細胞内遊離カルシウムレベルの上昇。

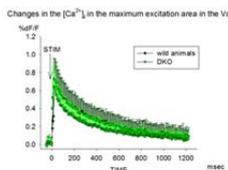
海馬切片では細胞内遊離カルシウムレベルの上昇が大きく、CA1の放射層全体に広がって観察されたが、大脳皮質では著明な増強応答は認められなかったことは、海馬が LTP を起こしやすいことに関連している。

#### (4) GABAA 受容体刺激における侵害反射の抑制効果について

三叉神経脊髄路核尾側亜核で GABAA 受容体はシナプス前とシナプス後の両方に作用して抑制性に働いているとすると、GABAA 受容体作動薬ムシモールは尾側亜核内の興奮伝搬を抑制すると考えられる。WILD のマウスでの同核内の膜電位興奮伝搬を調べると、ムシモール還流状態で刺激しても、これらには抑制が見られなかった。DKO マウスのスライスでもムシモールは抑制しなかった。



細胞内遊離カルシウム濃度の脊髄路核内の上昇は、WILD と DKO マウスで差がなかった。



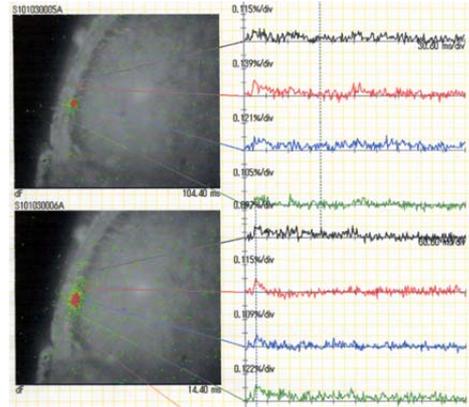
これらは侵害情報の延髄内の2次ニューロンへの興奮伝達には、GABAA 受容体が抑制していなかったことを示唆している。

#### (5) BDNF の GABAA 受容体機能変化

BDNF は GABA ニューロンを抑制性から興奮性に作用することが報告されている。そこで延髄スライス標本を 50nM に浸漬させたのちに 20μM のムシモール還流下で、膜電位の興奮を測定した。その結果、いままでもムシモールの投与では全くこの興奮伝搬は変化しなかったが、影響を受けて興奮が増強する場合が多く認められた。

脊髄路核における膜電位変化の比較

上：コントロール群、下：BDNF 前処理群



本結果は神経損傷などの状態になると GABA ニューロンは抑制性に働くことを示唆する。

#### 結論

GABAA 受容体は三叉神経脊髄路核尾側亜核における侵害刺激の伝達において、神経損傷などによる特殊な状況では興奮性に働く可能性がある。

#### 5. 主な発表論文等

【雑誌論文】 (計 5 件)

- (1) Seino H, Seo K, Maeda T, Someya G.: Behavioural and histological observations of sensory impairment caused by tight ligation of the trigeminal nerve in mice. *J Neurosci Methods*. 2009;181(1):67-72. (査読あり)
- (2) Seo K, Seino H, Yoshikawa H, Petrenko AB, Baba H, Fujiwara N, Someya G, Kawano Y, Maeda T, Matsuda M, Kanematsu T, Hirata M.: Genetic reduction of GABA(A) receptor gamma2 subunit expression potentiates the immobilizing action of isoflurane. *Neurosci Lett*. 2010;472(1):1-4. (査読あり)
- (3) Naoshi Fujiwara, Rie Sato, Kaori Takenoshita, Hijiri Nagayama, Kenji Seo: Effects of Acid-Base Balance on Intracellular Calcium Changes in Response to Neuronal Excitation in

Brain Slices of Mice. 14th Annual Meeting of the Japanese Society of Neuroanesthesia and Critical Care. (Proceeding) (査読なし)

- (4) 瀬尾憲司、藤原直土、Petrenko A、馬場洋、松田将門、兼松 隆、平田正人、イソフルランによる疼痛反射波 GABA 受容体  $\gamma 2$  サブユニットを介さない？、神経麻酔・集中治療、2009, 44-46. (査読なし)
- (5) 藤原直土、大塚隼人、松田将門、渡邊 誠、瀬尾憲司: 大脳皮質、海馬におけるサイアミラールの作用と GABAA 受容体  $\beta 2$ 、 $\beta 3$  サブユニットの分布、神経麻酔・集中治療 2010:13, 38-40(査読なし)

[学会発表] (計 7 件)

- (1) H. SEINO, H. AJIMA, G. SOMEYA, T. MAEDA, K. SEO: Behavioral and immuno-histological observations of trigeminal nerve ligation in mice. Society for Neuroscience Annual meeting, Washington DC, USA, Nov 16, 2008
- (2) K. SEO, N. FUJIWARA, T. MAEDA, T. KANEMATSU, M. HIRATA: Nociceptive transmission in the trigeminal subnucleus caudalis of PRIP-1, PRIP-2 double knockout mice, Society for Neuroscience Annual meeting, Chicago, USA Oct 18, 2009
- (3) 藤原直土、佐藤梨絵、竹野下香織、長山聖、瀬尾憲司: 神経興奮に応答する細胞内カルシウム変動に及ぼす酸塩基バランスの影響 — 灌流脳切片のカルシウム画像による解析 — 第 14 回日本神経麻酔・集中治療研究会 2010 年 4 月 24 日松本市
- (4) 藤原直土、大塚隼人、松田将門、渡邊 誠、瀬尾憲司: 大脳皮質、海馬におけるサイアミラールの作用と GABAA 受容体  $\beta 2$ 、 $\beta 3$  サブユニットの分布第 13 回日本神経麻酔・集中治療研究会 2009 年 3 月 28 日大阪市
- (5) 瀬尾憲司、藤原直土、Petrenko A、馬場洋、松田将門: イソフルランによる疼痛反射抑制は GABA 受容体  $\gamma 2$  サブユニットを介さない？ 第 13 回日本神経麻酔・集中治療研究会 2009 年 3 月 28 日大阪市
- (6) 清野宏幸、前田健康、瀬尾憲司、染矢源治: マウスを用いた下顎神経の絞扼性損

傷モデルにおける行動生理学的および免疫組織学的観察, 平成 20 年度新潟歯学会第 1 回例会, 新潟, 2008 年 7 月 19 日

- (7) 清野宏幸, 瀬尾憲司, 染矢源治: マウス・オトガイ神経における絞扼性損傷が Substance P の分布へ及ぼす影響, 第 36 回日本歯科麻酔学会総会, 吹田市, 2008 年 10 月 10 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

- 出願状況 該当事項なし
- 取得状況 該当事項なし

[その他] (計 1 件)

2008 年日本歯科麻酔学会、デンツプライ賞受賞: マウスにおける下顎神経絞扼性損傷後の触覚閾値変化に関する研究、清野 宏幸

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

瀬尾 憲司 (SEO KENJI)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 4 0 2 4 2 4 4 0

### (2) 研究分担者

藤原 直土 (FUJIWARA NAOSHI)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 7 0 1 8 1 4 1 9

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)  
新潟大学・医歯学系・教授  
研究者番号 4 0 1 8 3 9 4 1

弦巻 立 (TSURUMAKI TATSURU)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号 1 0 3 4 5 5 2 2

塚田 博子 (TSUKADA HIROKO)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号 3 0 4 6 4 0 1 9

田中 裕 (TANAKA YUTAKA)  
新潟大学・医歯学総合病院・講師  
研究者番号 5 0 3 2 3 9 7 8

吉川 博之 (YOSHIKAWA HIROYUKI)  
新潟大学・医歯学総合病院・医員  
研究者番号 2 0 5 4 7 5 7 5

倉田 行伸 (KURATA SHIGENOBU)  
新潟大学・医歯学系・助教  
研究者番号 2 0 4 6 4 0 1 8