

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 6 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21600005

研究課題名（和文） 脊髄後角第 I 層細胞における後根誘起シナプス応答の解明

研究課題名（英文） Clarification of dorsal root evoked synaptic responses in lamina I neurons

研究代表者

吉村 恵 (YOSHIMURA MEGUMU)

熊本保健科学大学・大学院保健科学研究科・教授

研究者番号：10140641

研究成果の概要（和文）：L4 または L5 後根に単一および頻回刺激を加えると、グルタミン酸誘起の fast EPSP が誘起された。頻回刺激を加えると約 20% の細胞では fast EPSP に続いて緩徐シナプス応答が観察された。この応答をしめす細胞にサブスタンス P を灌流投与すると興奮性の脱分極が惹起された。Slow EPSP とサブスタンス P 誘起の応答は NK1 受容体拮抗薬で抑制された。記録された細胞の形態と軸索の方向から投射ニューロンと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Intracellular recordings were made from lamina I neurons which were identified by antidromic action potentials evoked by focal stimulation near the central canal. Stimulation of the dorsal root elicited a fast EPSP in the majority of neurons and repetitive stimulation evoked a slow EPSP in 20 % of lamina I neurons. The latter neurons were depolarized by application of substance P and antagonized by a NK1 receptor antagonist, suggesting that the lamina I neurons receive substance P containing C afferent fibers which could modulate the nociceptive transmission in the lamina I.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経・筋肉生理学

キーワード：slow EPSP, サブスタンス P, 後角第 I 層、投射ニューロン

1. 研究開始当初の背景

痛みの情報は末梢から細い有髄の A δ 線維と無髄の C 線維によって脊髄後角に運ばれるが、特に C 線維は慢性疼痛発生と密接に関係していること、また、情動反応を起こし易いことなどから C 線維による痛覚情報伝達の理解は重要であった。C 線維の一部は多くの種類のペプチドを含有していることが明らかにされているが、特にサブスタンス P は多

くの実験結果が報告されており、痛みの伝達または修飾に重要な役割を果たしているものと考えられている。しかしながら、サブスタンス P が如何なる作用を示すかは未だ明らかではない。かつ如何なる脊髄細胞とシナプスをつくるかもハッキリしていない。

2. 研究の目的

痛覚伝達におけるサブスタンス P の機能的な

役割を明らかにするため、成熟ラット脊髄スライス標本を用い、サブスタンス P 含有の C 線維が入力している脊髄後角第 I 層の細胞から細胞内記録を行い、灌流投与したサブスタンス P の作用と、後根の頻回刺激によって誘起される slow EPSP を電気生理学的手法を用いて解析する。本研究を進めることによってサブスタンス P 誘起のシナプス応答を明らかにすることができる。また、この応答がグルタミン酸誘起の fast EPSP にたいしてどのような修飾作用を示すかを検討することによって痛覚伝達におけるサブスタンス P の役割を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

成熟ラットをウレタンによって麻酔し、腰仙部の椎弓切除を行った。摘出した脊髄を直ちに冷却した Krebs 液に浸し酸素不足による神経細胞のダメージを抑制する。L4 または L5 の後根を残し、他の前根と後根を切除した。残した後根の周囲を除いて他の部位の硬膜と軟膜を切除し、寒天に設けた溝に脊髄を設置した。寒天と脊髄をスライサーにセットし、後根を付した約 600 mm の厚さの脊髄横断スライスを作製した。スライスは記録用チャンバーにもうけたナイロンメッシュの上に置き酸素負荷した Krebs 液で持続的に灌流した。この状態では 10 時間にわたって記録を行う事が可能で、かつ単一の細胞から 3 時間にわたる安定した記録ができた。後根は吸引電極を用いて刺激し、誘起された応答を記録用解析装置によって保存解析を行った。

4. 研究成果

脊髄後角最背側の層から記録を行い、中心管の腹側に設置した単極刺激電極で刺激し、逆行性の活動電位を記録した。投射ニューロンは中心管の腹側部を通過して反側に移行し、上行することが知られていることから、これらの細胞は投射ニューロンで有ることが確認できる。同定を行った細胞に対してサブスタンス P (1 mM) を灌流投与し、緩徐脱分極電位が発生するか否かを検討した。脱分極を示した細胞において後根を頻回刺激し、slow EPSP が誘起されるか否かを検討した。その結果、多くの投射ニューロンではサブスタンス P によって脱分極電位が発生し、かつ、後根の頻回刺激によって slow EPSP が誘起された。これらの応答がサブスタンス P 受容体によって仲介されているかを調べるため NK1 受容体拮抗薬を予め投与しておき、同様の実験を行った。拮抗薬は有意にサブスタンス P 誘起の脱分極と後根刺激誘起の slow EPSP を抑制した。

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 11 件)

1. Akitoshi Ito, Mineko Takeda, Takeshi Yoshimura, Takayuki Komatsu, Takeshi Ohno, Hiroshi Kuriyama, Akio Matsuda and Megumu Yoshimura: Analgesic effect of calcitonin on neuropathic pain interacting with peripheral calcitonin receptors. *Molecular Pain*, 2012.
2. Du-Jie Xie, Daisuke Uta, Peng-Yu Feng, Masahito Wakita, Min-Chul Shin, Hidemasa Furue and Megumu Yoshimura: Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn *in vitro*. *Molecular Pain*. 2012.
3. Yamamoto S, Yoshimura M, Shin M-C, Wakita M, Nonaka K, Akaike N. GABA_A receptor-mediated presynaptic inhibition on glutamatergic transmission. *Brain Research Bulletin*. 84: 22-30, 2011
4. Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Uta D, Yamamoto J, Furuse S, Katfuchi T, Imoto K, Iwamoto Y, Yoshimura M. Bone cancer pain induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord. *Molecular Pain* 6:38, 2010
5. Hachisuka H, Furue H, Furue M, Yoshimura M. Responsiveness of C neurons in rat dorsal root ganglion to 5-hydroxytryptamine-induced pruritic stimuli *in vivo*. *Journal of Neurophysiology*. 104 (1): 271-279, 2010
6. Uta D, Furue H, Pickering AE, Rashid MDH, Mizuguchi-Takase H, Katafuchi T, Yoshimura M. TRPA1-expressing primary afferents synapse with morphologically identified subtypes of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. *European Journal of Neuroscience*. 31 (11): 1960-1973, 2010
7. Maeda A, Katafuchi T, Oba Y, Shiokawa

H, Yoshimura M. Enhancement of GABAergic tonic currents by midazolam and noradrenaline in rat substantia gelatinosa neurons in vitro. *Anesthesiology*. 113 (2): 429-437, 2010

8. Kato G, Kawasaki Y, Koga K, Uta D, Kosugi M, Yasaka T, Yoshimura M, Ji RR, Strassman AM. Organization of intra- and translaminal neuronal connectivity in the superficial spinal dorsal horn. *J Neurosci*. 29(16): 5088-5099. 2009

9. Katafuchi T, Duan S, Take S, Yoshimura M. Cytokine-induced suppression of medial preoptic neurons. Mechanisms and neuroimmunomodulatory effects. *Neuroimmunomodulation: Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1153: 76-81, 2009

10. Takazawa T, Furue H, Nishikawa K, Uta D, Takeshima K, Goto F, Yoshimura M. Actions of propofol on substantia gelatinosa neurons in rat spinal cord revealed by in vitro and in vivo patch-clamp recordings. *European Journal of Neuroscience* 29(3): 518-28, 2009

11. Abe K, Kato G, Katafuchi T, Tamae A, Furue H and Yoshimura M. Responses to 5-HT morphologically identified neurons in the rat substantia gelatinosa in vitro *Neuroscience*. 159 (1): 316-324, 2009

[学会発表] (計 19 件)

1. Yoshimura M, Xie D, Uta D, Furue H. Sensitization of TRPV1 channel expressed at the primary C afferent terminals by inflammation in the rat spinal dorsal horn. 4th Asian Pain Symposium, 2011, Shanghai, China

2. 吉村 恵、九州麻酔学会特別講演、2011 福岡、日本。

3. Yoshimura M, J Hachisuka J, Furue H, Furue M. In vivo analysis of 5-HT-induced pruritic responses in rat DRG C neurons 日本神経科学大会シンポジウム. 2010, 神戸、日本。

4. 吉村 恵 慢性炎症性疼痛発生における BDNF の関与と脊髄内感覚回路の可塑性. 情報技術協会シンポジウム. 2010, 東京、日本

5. 吉村 恵、痛みを考える— 生理学的研究からみた慢性疼痛の発生機序—、日本カイロプラスティック学会特別講演、2010、福岡、日本。

6. Yoshimura M, Xie D, Furue H, Hachisuka J, Uta D, Functional role of the TRPV1 receptors expressed at the terminal of primary C afferent in the spinal dorsal horn, 第 34 回日本神経科学大会、2010、横浜、日本、シンポジウム

7. Yoshimura M, Uta D, Furue H, Hachisuka Y. Synaptic connection in the superficial dorsal horn revealed by laser photostimulation. 9th Japan – Korea Joint Symposium, 2010, Kagoshima

8. Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Uta D, Imoto K, Iwamoto Y, Yoshimura M. The plastic changes of spinal excitatory synaptic transmission in a murine model of cancer-induced bone pain. Society for Neuroscience, 2010, San Diego.

9. Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Uta D, Iwamoto Y, Imoto K, Yoshimura M. Enhancement of excitatory synaptic transmission in the substantia gelatinosa of the spinal cord in a mouse model of bone cancer pain. Society for Neuroscience, 2009, Chicago.

10. Uta D, Furue H, Imoto K, Yoshimura M. Actions of TRPA1 and TRPV1 agonists on synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. Society for Neuroscience, 2009, Chicago.4.

11. Nishikawa Y, Uta D, Sasaki A, Andouh T, Furue H, Yoshimura M, Kuraishi Y. Actions of endothelin-1 on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult mouse spinal cord. Society for Neuroscience, 2009, Chicago..

12. Yoshimura M. Effects of acupuncture on the inhibitory transmission in the spinal cord. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto (Symposium).
13. Yoshimura M. Mizumura K. Comprehensive approaches to pain – from molecular to organism – The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto (Chair).
14. Shibata S, Sakakibara S-I, Furue H, Yoshimura M., Takagi T, Ohkuma R, Kuwako K-I, Okano H, Okano H. Sensory Neural network formation with RNA binding protein musashi2 deficient mice. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto.
15. Uta D, Furue H, Yoshimura M. Modulation of nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal dorsal horn via activation of TPA1 and TRPV1. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto.
16. Furue H, Ito A, Yoshimura M. Selective loss of presynaptic 5-HT inhibitory actions on spinal mechanical noxious synaptic transmission in ovariectomized rats in vivo. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto.
17. Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Namiki A, Iwamoto Y, Yoshimura M. Plastic changes in spinal nociceptive transmission of bone cancer pain model mice. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences. 2009, Kyoto
18. Andrew J. Todd , Neuronal circuitries and receptors involved in spinal cord pain processing. Nagoya Pain 2009, Nagoya 2009, Chair by Yoshimura M.

19. Yoshimura M. Responsiveness of C neurons in rat DRG and spinal dorsal horn neurons to 5-HT induced itch stimulation in vivo. 4th International Conference of Neurons and Brain Diseases, 2009, Toronto (Symposium)

〔図書〕（計 1 件）

1. 吉村 惠（分担）.標準生理学、体性感覚、2009, 医学書院

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 惠 (YOSHIMURA MEGUMU)

熊本保健科学大学・大学院保健科学研究科・教授

研究者番号：10140641