

## 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 5月28日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21600014

研究課題名（和文） 侵害受容性感覚神経における GABA の興奮伝導修飾作用

研究課題名（英文） Effect of GABA on excitatory conduction in nociceptive sensory neurons

研究代表者

八木 淳一 (YAGI JUNICHI)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：90265760

研究成果の概要（和文）：感覚神経から脊髄内のニューロンへのシグナル伝達は、シナプス前抑制で修飾される。シナプス前抑制とは、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）が感覚神経の終末部に作用して、感覚神経から放出される伝達物質の放出量を減らすことで起こる伝達抑制である。独自の実験法を開発してこのシナプス前抑制の機序を調べたところ、GABA が感覚神経に脱分極を起こして活動電位の伝導を遮断することでシナプス前抑制を起こすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Signal transmission from sensory neurons to the secondary neurons in the spinal cord is modulated by presynaptic inhibition, in which  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) reduces release of neurotransmitters in the presynaptic sensory neuronal terminals. A novel method was developed to investigate the underlying mechanisms. It was suggested that the presynaptic inhibition would be due to GABA-induced membrane depolarization, leading to a blockade of action potential propagation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,000,000	0	1,000,000
2011年度	1,100,000	0	1,100,000
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経科学、痛覚、感覚神経、シナプス前抑制、パッチクランプ記録

## 1. 研究開始当初の背景

脊髄後角の感覚情報伝達において、 $\gamma$ -アミノ酪酸（GABA）は脊髄後根神経節（DRG）ニューロンの中枢側終末部に作用して、GABA(A)受容体を介して「シナプス前抑制」を起こす。その機序は、一般に、中枢側神経終末部の脱分極による  $\text{Na}^+$ チャネルの不活性化、あるいは塩素イオンコンダクタンス上昇によるシャント効果と考えられている。しかし、これまで終末部の電気活

動を直接測定する手段がなく、「シナプス前抑制」の機序は不明である。

## 2. 研究の目的

GABA(A)受容体を介するシナプス前抑制のメカニズムについては、2つの仮説が提唱されている。一つは、神経終末の脱分極による  $\text{Na}^+$ チャネルの不活性化説である。DRGニューロンの細胞内塩素イオン濃度が比較的高いために、塩素イオンの平衡電位は静止膜電位

よりも脱分極側にある。GABA(A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネルが活性化すると神経終末部に脱分極が起こり、Na<sup>+</sup>チャンネルを不活性化させ、活動電位の伝導が遮断されるという説である。もう一つの仮説は、シャント効果説である。GABA(A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネルが開閉し、入力抵抗が低下すると十分に脱分極できず、活動電位の伝導が遮断されるという説である。しかし、実験による仮説の検証は未だ行われていない。これは、現段階で、微細構造の神経終末部に電極を刺入して電気的活動を直接記録することができないという技術的な制約があるためである(図1A)。そこで、シナプス前抑制の電気生理学的機序を解析するため、神経終末部をモデル化した「ラットDRG-神経付 *in vitro* 標本によるDRGニューロンパッチクランプ法」を独自に開発した。すなわち、神経線維を付けたDRGニューロンの細胞体を神経終末に見立て、細胞体からパッチクランプ記録を行い、末梢から伝導する活動電位がGABAによってどのような機序で遮断されるのかを解析する方法である(図1B)。本研究は、この手法を用いて、上記の仮説を検証し、「シナプス前抑制」の電気生理学的機構の解明を目指した。

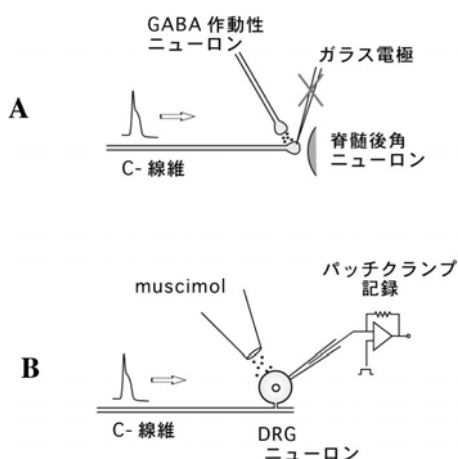


図1 「DRG-神経付 *in vitro* 標本」による神経終末のモデル化

### 3. 研究の方法

#### (1) 皮膚を支配するDRGニューロンの標識

「皮膚」を支配し、C-線維あるいはA $\delta$ -線維を有するDRGニューロンは、その興奮性膜の性質から5つのClassに分類される(日誌, Vol. 65, 2003)。この分類から、各ClassのDRGニューロンの受容野応答特性を推定できる。皮膚を支配するDRGニューロンを識別するため、SD系ラット(6週齢)をネンブータルで麻酔し、両側の後足の甲(有毛部)に神経

トレーサー DiI (2.5 mg/ml, 10  $\mu$ l) を注入した。

#### (2) 「DRG-坐骨神経付着 *in vitro* 標本」の作成

DiI 注入から2~6週間後、再びラットをネンブータルにより深く麻酔した。椎弓切除を行い、両側のL4レベルのDRG(L4-DRG)とそれに続く坐骨神経を腸骨付近まで露出(約3 cm)した。腸骨部で坐骨神経を離断して、L4-DRG-坐骨神経付着標本を摘出した。標本を、95%酸素-5%炭酸ガス飽和人工脳脊髄液(ACSF)を充たしたシャーレの中に入れ、実体顕微鏡下で神経節を取り巻く神経上膜を剥離した。

#### (3) ホールセルパッチクランプ記録による解析

標本をノマルスキー鏡筒上下型正立顕微鏡のステージ上のチェムバーに入れ、ACSFを還流した。記録前に、DRGニューロンを取り囲むsatellite細胞に、コラゲナーゼ(1 mg/ml)を局所投与(約15分)し、satellite細胞の細胞間結合を軟化した。ターゲットとなるDiI陽性DRGニューロン(すなわち皮膚を支配するDRGニューロン)の周りのsatellite細胞を、陽圧をかけた記録用パッチピペットで破った。DRGニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、以下の解析を行った。なお、薬物刺激には、GABA(A)受容体の選択的アゴニストmuscimolを使用した。

① 電位固定モードにて、-60 mVから-120 mVへの過分極パルスを与えてイオン電流を記録する。次に、膜電位記録モードにて、2組の刺激電極で坐骨神経を電気刺激し、細胞体に発生する活動電位の潜時の差から軸索の伝導速度を算出する。以上の記録、「イオンチャンネルの発現パターン」、「軸索の伝導速度」、「活動電位の形状」から、DRGニューロンを5つのClassに分類した。

② 膜電位記録モードにて、坐骨神経を0.5 Hzで刺激して活動電位を誘発させた。さらに、ガラスピペットを通じてmuscimolをDRGニューロンの細胞体へ向けて局所投与した。Muscimolの投与が活動電位に与える影響を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) DRGニューロンの分類

今回の研究では、5つのClassの内、以下の4つのClassのDRGニューロンから記録した。Class I; C線維-高閾値機械受容型(C-HTM)、Class II; C線維-中閾値機械受容型(C-MTM)、Class III; C線維-低閾値機械受容型(C-LTM)、Class V; A $\delta$ 線維-高閾値機械受容型(A $\delta$ -HTM)。

(2) Muscimol による脱分極と活動電位の伝導ブロック

DRG ニューロンの細胞内塩素イオン濃度は、40 mM 前後と報告されている。そこで、40 mM の塩素イオンを含むパッチピペット（塩素イオンの平衡電位 = -34 mV）で Class II の DRG ニューロンから記録を行った。電流固定モードで2秒毎に坐骨神経を電気刺激し、細胞体に伝導する活動電位を記録した。100  $\mu$ M の muscimol を細胞体周囲に局所投与すると脱分極が起こり、活動電位の振幅は著しく減弱し、伝導はブロックされた（図2A）。次に、muscimol を投与せず、脱分極性のランプパルスを細胞体に通電することにより脱分極を起こすと、ほぼ同じ膜電位レベルで同様に活動電位の伝導ブロックが起こった（図2B）。

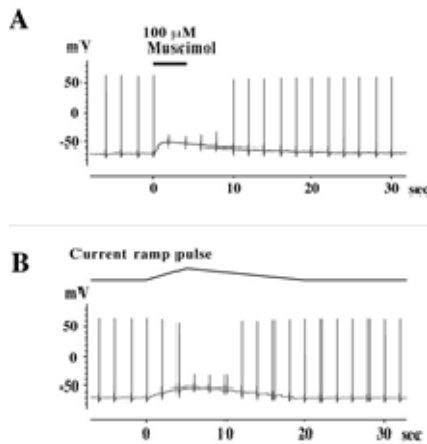


図2 脱分極と活動電位の伝導ブロック

次に、別の Class II の DRG ニューロンで、10 mM の塩素イオンを含むパッチピペットで記録した（塩素イオンの平衡電位 = -69 mV）。100  $\mu$ M の muscimol の投与により入力抵抗の減少は起こるが脱分極はほとんど起こらなかった。この条件下では活動電位の伝導ブロックは起こらなかった。一方、muscimol を投与せず、脱分極性のランプパルスを細胞体に通電することにより脱分極を起こすと、活動電位の伝導ブロックが起こった。

以上の結果から、GABA (A) 受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化による活動電位の伝導ブロックには、塩素イオンコンダクタンス上昇によるシャント効果は不十分であり、膜の脱分極が必要であることが示唆された。

(3) 分類された DRG ニューロンにおける muscimol の効果

これまでに40 mMの塩素イオンを含むパッチピペットで記録したClass I、II、III、

VのDRGニューロンすべてにおいて、100  $\mu$ Mのmuscimolは脱分極を引き起こした。すなわち、記録したすべてのClassのDRGニューロンにGABA (A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルが発現していることが示唆された。しかし、muscimolによる活動電位の伝導ブロックは、Class II（11個中11個）とClass III（2個中2個）で起こり、Class I（12個中2個）、Class V（4個中0個）ではほとんど起こらなかった。また、muscimolを投与せず、ランプパルスの通電による脱分極で活動電位の伝導ブロックを起こす実験をしたところ、伝導ブロックが起こる膜電位レベルは、Class I（-23.9  $\pm$  3.2 mV）、Class V（-28.1  $\pm$  4.1 mV）と比較してClass II（-54.7  $\pm$  1.0 mV）とClass III（-51.3 mV）で低かった。

(4) まとめと考察

① 脊髄後角の感覚情報伝達におけるGABA (A)受容体を介する「シナプス前抑制」の電気生理学的機序を解析するため、神経終末部をモデル化した「ラットDRG-神経付 *in vitro*標本によるDRGニューロンパッチクランプ法」を開発した。

② GABA (A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルが活性化は活動電位の伝導ブロックを起こした。この伝導ブロックが起こるには、塩素イオンコンダクタンス上昇によるシャント効果は不十分であり、膜の脱分極が必要であることが示唆された。

③ GABA (A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルが活性化による活動電位の伝導ブロックは、Class II（C線維-中閾値機械受容型）とClass III（C線維-低閾値機械受容型）で起こり、Class I（C線維-高閾値機械受容型）とClass V（A $\delta$ 線維-高閾値機械受容型）ではほとんど起こらなかった。

④ シナプス前抑制とシナプス後抑制の様式を比較すると、シナプス後抑制は興奮性入力と抑制性入力が入力側で競合して起こる抑制であるのに対し、シナプス前抑制の場合は特定の入力を選択的に遮断できるという特性を持つ。③の結果から、GABA (A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルが活性化によるシナプス前抑制は、低閾値と中閾値の機械受容型感覚神経で起こり、高閾値型の感覚神経では起こらない可能性が示唆された。

⑤ GABA (A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャネルの活性化によるシナプス前抑制は、「脱分極によるNa<sup>+</sup>チャネルの不活性化」に起因するとの仮説から、種々のDRGニューロンにおいて、不活性化の電位依存性が異なるNa<sup>+</sup>チャネル（TTX感受性型とTTX抵抗型）の発現パターンの差がGABAによる伝導ブロック効果の差に関連すると推察された。しかし、現在まで、Na<sup>+</sup>チャネルの発現パターンの差から、すなわち、Na<sup>+</sup>チャネル不

活性化の電位依存性の差からGABAによる伝導ブロック効果の差を十分に説明することはできない。現在、引き続き、GABA(A)受容体・Cl<sup>-</sup>チャンネルの活性化による伝導ブロック効果について、Na<sup>+</sup>チャンネル以外の電位依存型イオンチャンネルの関与も含めて研究を行っている。

#### 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0件)

[学会発表] (計5件)

- ① J. Yagi, Y Kobayashi, EW McCleskey and N Hirai, Blockade of action potential propagation by GABA(A) receptor activation in rat dorsal root ganglion neurons, Soc. for Neuroscience, Nov.12-16 2011, Washington DC
- ② 八木淳一、小林靖、平井直樹、「脊髄後根神経節 - 神経標本」を用いたシナプス前抑制機構の解析、第32回日本疼痛学会、2010年7月2-3日、京都
- ③ J. Yagi, ASIC3 and muscle ischemic pain, 第87回日本生理学会 日・韓・中合同シンポジウム、2010年5月19-21日、盛岡
- ④ J. Yagi, Membrane depolarization is required for muscimol-induced blockade of action potential propagation in rat DRG neurons, The Spring Pain Conference 2010, Apr.17-24 2010, Grand Cayman
- ⑤ J. Yagi, Y. Kobayashi and N. Hirai, Effect of GABA on propagated action potentials in DRG neurons using the ganglion-nerve preparation of rats, 36th International Congress of Physiological Sciences, Jul.27-Aug.1 2009, Kyoto

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

八木 淳一 (YAGI JUNICHI)  
杏林大学・医学部・講師  
研究者番号：90265760

(2)研究分担者

なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ( )

研究者番号：