

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700432

研究課題名（和文） 神経損傷に起因する神経麻痺におけるリークカリウムチャネルの機能的役割

研究課題名（英文） Functional roles of leak K⁺ channels in injured motoneurons

研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda Hiroki)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：00432451

研究成果の概要（和文）：

末梢神経損傷後、損傷を受けたニューロンでは一酸化窒素(NO)の産生増加が生じることが知られている。その結果、ニューロンの興奮性が変化し、神経麻痺が生じる可能性が示唆されるが、詳細な機序は不明である。本研究では、ニューロンの静止膜電位や入力抵抗の制御に必須である漏洩K⁺チャネルに焦点を当て、NOによる漏洩K⁺チャネル制御機構を検討した。運動ニューロンから記録を行い、cGMP アナログである 8-Br-cGMP 投与に対する電流応答を観察したところ、大型運動ニューロン群では、漏洩 K⁺電流の減少が認められ、小型運動ニューロン群では、漏洩 K⁺電流の増加が認められた。これらの結果から、NO-cGMP-PKG 経路の活性化により運動ニューロンに発現する漏洩 K⁺チャネルが制御を受け、ニューロンの興奮性が変化することが明らかとなった。NO によるニューロンの活動様式の変化が、神経麻痺発症のメカニズムである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

It is known that production of nitric oxide (NO) is enhanced in injured motoneurons after peripheral nerve injury, The enhanced NO production is thought to contribute to the occurrence of nerve paralysis, However, it remains unknown how the enhanced NO production induces nerve paralysis, In this study, I focused on the changes in the membrane excitability by NO as the mechanism of neural paralysis, In particular, I studied on the NO-mediated modulation of leak K⁺ currents, which regulate the resting membrane potential and the input resistance, Following application of 8-Br-cGMP, leak K⁺ currents were decreased in large-sized motoneurons, while those were increased in small-sized motoneurons, These results suggest that activation of NO-cGMP-PKG pathway alters the membrane excitability of motoneurons through modulating the leak K⁺ currents, It is possible that such neural mechanisms are involved in the occurrence of neural paralysis,

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：神経・筋肉生理学

キーワード：漏洩 K⁺チャネル、ニューロン、一酸化窒素

1, 研究開始当初の背景

三叉神経や顔面神経が障害を受けると、顔面神経麻痺や三叉神経知覚麻痺が出現する。その中で、顔面神経麻痺は脳神経にみられる麻痺のうちで最も多い疾患であり、また、三叉神経麻痺は歯科臨床において非常に重要な疾患である。このため、顔面神経麻痺及び三叉神経麻痺の発症機構を理解し、新たな治療法を確立することが望まれる。顔面神経は表情筋の運動を司っているため、顔面神経損傷後の顔面神経核運動ニューロンの活動低下が表情筋へのインパルス低下を引き起こし、顔面神経麻痺発症に関与している可能性が示唆される。また、三叉神経損傷により、三叉神経節に存在する一次感覚ニューロンの活動低下が中枢へのインパルス低下を引き起こし、三叉神経麻痺発症に関与しているものと考えられる。以前の研究により、舌下神経損傷後、舌下神経核運動ニューロンにおいて、神経活動(運動性出力)の低下が認められているため、顔面神経核運動ニューロン及び三叉神経節ニューロンにおいても、神経損傷後、活動低下が生じている可能性が高い。これまで、神経損傷によるニューロンの活動低下に関与する詳細な分子及び細胞機構、特にイオンチャンネル制御機構については研究が進んでいないため、まずこれを明らかにする必要がある。

近年、漏洩 K^+ チャンネルがクローニングされ、ニューロンの静止膜電位や入力抵抗を制御することにより、ニューロンの活動制御に重要な役割を果たしていることが明らかになった。漏洩 K^+ チャンネルの中で、TWINK-related acid-sensitive K^+ channel 1 (TASK-1) 及び TASK-3 チャンネルは、顔面神経核運動ニューロンや三叉神経節ニューロンにおいて豊富に発現している。これまで、漏洩 K^+ チャンネルを活性化する内因性修飾物質が発見されていなかったが、申請者は、最近、前脳基底野のアセチルコリンニューロンに発現している漏洩 K^+ チャンネルが、NO-cGMP-PKG 経路により活性化されることを明らかにした。NO は神経伝達物質として働き、神経損傷により増加することがよく知られており、末梢顔面神経損傷及び末梢三叉神経損傷後では、それぞれ顔面神経核運動ニューロンや三叉神経節ニューロンにおいて、NO 産生の増加が認められている。このため、神経損傷により産生される NO が、神経損傷に起因する神経麻痺の発症に関与している可能性が強く示唆される。

2, 研究の目的

神経損傷により産生増加するNOが、ニューロンに発現する漏洩 K^+ チャンネルを活性化することによりニューロンの膜興奮性が変化し、その結果、

神経麻痺が生じる可能性が示唆される。そこで、本研究では、以下の事項について明らかにすることを目的とした。(1)ニューロンにおける TASK1/3 チャンネルの分布、(2)小型および大型三叉神経運動ニューロンにおける入力抵抗の比較、(3)ニューロンに発現する漏洩 K^+ チャンネルに対する 8-Br-cGMP の作用、(4)三叉神経運動核背内側部をタングステン電極で微小刺激した際に得られるシナプス後電位 (EPSP) に対する 8-Br-cGMP の作用。

3, 研究の方法

(1)ニューロンにおける TASK1/3 チャンネルの分布

①三叉神経運動核および顔面神経核の運動ニューロンにおける TASK1 および TASK3 mRNA の発現量の検討

生後 15-22 日齢の Wistar 系ラットから三叉神経運動核および顔面神経核を含む厚さ $20 \mu\text{m}$ の連続冠状断脳幹切片を作製し、レーザーマイクロダイセクションシステムによる細胞採取を行った。細胞径が $20 \mu\text{m}$ 以下と $35 \mu\text{m}$ 以上の二群に分け、40-427 個の細胞体を 1 サンプルとし、TASK1 および TASK3 mRNA の発現量を検討した。

②免疫組織化学的手法を用いた解析

生後 21 日齢の Wistar 系ラットの灌流固定標本を作成し、顔面神経核運動ニューロン及び三叉神経節ニューロンの細胞体や軸索に分布する TASK-1 及び TASK-3 チャンネルの発現分布を観察した。

(2)小型および大型三叉神経運動ニューロンにおける入力抵抗の比較

生後 15-22 日齢の Wistar 系ラットから三叉神経運動核を含む厚さ $250 \mu\text{m}$ の冠状断薄切標本を作製し、三叉神経運動核背側部のニューロンに対し、ホールセルパッチクランプを形成した。パッチ電極には、電気生理学的記録後の組織学的解析のため、蛍光色素 Lucifer yellow を填入した。電流固定下で、パッチ電極を通じて持続時間 1 秒の電流パルス通電に対する電位応答を記録した。得られた電流-電圧関係から入力抵抗を算出し、細胞径との関係を検討した。

(3)漏洩 K^+ 電流に対する 8-Br-cGMP の作用

膜電位固定下でランプ波を与え、cGMP アナログである 8-Br-cGMP 投与前後に得られる電流応答を記録し、8-Br-cGMP が漏洩 K^+ コンダクタンスに与える影響を検討した。

(4)三叉神経運動核背内側部をタングステン電極で微小刺激した際に得られる EPSP に対する 8-Br-cGMP の作用

三叉神経中脳路核からの入力線維束が通過する三叉神経運動核背内側隣接部をタングステン電極で微小刺激を与えることにより EPSP を記録し、8-Br-cGMP 投与前後でどのように変化するかを観察した。

4, 研究成果

(1) TASK1 および TASK3 チャンネルの分布

①リアルタイム PCR 法を用いた三叉・顔面神経核運動ニューロンにおける TASK1 および TASK3 チャンネルの分布: 大型運動ニューロン群では、主として TASK1/3 ヘテロダイメリックチャンネルが発現し、小型運動ニューロン群では、主として TASK1/1 ホモダイメリックチャンネルが発現していた。

②免疫組織化学染色を用いた TASK1 および TASK3 チャンネルの分布: 小型運動ニューロンでは、細胞体において TASK1 チャンネルが発現していたが、TASK3 チャンネルの発現はほとんど認められなかった。大型運動ニューロンでは、細胞体に TASK1 チャンネルの発現が認められ、遠位樹状突起において TASK3 チャンネルが豊富に発現していた。

(2) 小型および大型三叉神経運動ニューロンにおける入力抵抗の比較

三叉神経運動ニューロンにおいて入力抵抗を計測したところ、大型運動ニューロン群 (25 μ m \times) では、小型運動ニューロン群 (15-20 μ m) と比較して有意に小さな値を示した。発現分布の結果と合わせて考慮すると、大型運動ニューロン群では、リーク K⁺電流がコンダクタンスの大きい TASK1/3 ヘテロダイメリックチャンネルにより媒介されるため、比較的小さい入力抵抗を示し、小型運動ニューロン群では、リーク K⁺電流がコンダクタンスの小さい TASK1/1 ホモダイメリックチャンネルにより媒介されるため、比較的大きい入力抵抗を示すことが明らかとなった。

(3) 漏洩 K⁺電流に対する 8-Br-cGMP の作用

大型運動ニューロン群では、漏洩 K⁺電流が減少し入力抵抗の増加が認められた。その一方、小型運動ニューロン群では、漏洩 K⁺電流が増加し入力抵抗の減少が認められた。

(4) 大型ニューロンで生じる EPSP に対する 8-Br-cGMP の作用

大型ニューロン群では、遠位樹状突起に TASK3 チャンネルが発現しており、シナプス入力の制御に関与している可能性が示唆されたため、大型ニューロンで生じる EPSP に対し、8-Br-cGMP の効果を検討した。8-Br-cGMP 投与後、膜電位が脱分極側にシフトし、EPSP の増大が認められた。このことから、大型ニューロンの遠位樹状突起で発現している TASK3 チャンネ

ルは NO により抑制され、その結果、ニューロンの興奮性が増大することが明らかとなった。

以上の結果から、NO-cGMP-PKG 経路の活性化により、運動ニューロンに発現する漏洩 K⁺電流が制御を受け、ニューロンの興奮性が増大することが明らかとなった。NO によるニューロンの活動様式の変化が、神経麻痺発症のメカニズムである可能性が示唆された。

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 7 件)

- ① Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y, PKG dynamically modulates TASK1-mediated leak K⁺ currents in cholinergic neurons of the basal forebrain, *Journal of Neuroscience* 30: 5677-5689, 2010. (査読有)
- ② Toyoda H, Zhao MG, Mercaldo V, Chen T, Descalzi G, Kida S, Zhuo M, Calcium/calmodulin-dependent kinase IV contributes to translation-dependent early synaptic potentiation in the anterior cingulate cortex of adult mice, *Molecular Brain* 3:27, 2010. (査読有)
- ③ Kang Y, Saito M, Toyoda H, Sato H, Rank-ordered recruitment of masseter motoneurons by the activity of mesencephalic trigeminal neurons during slow closing phase of mastication cycle, *Journal of Oral Bioscience* 52(4), 330-335, 2010. (査読有)
- ④ Toyoda H, Zhao MG, Ulzhöfer B, Wu LJ, Xu H, Seeburg PH, Sprengel R, Kuner R, Zhuo M, Roles of the AMPA receptor subunit GluA1 but not GluA2 in synaptic potentiation and activation of ERK in the anterior cingulate cortex, *Molecular Pain* 5, 46, 2009. (査読有)
- ⑤ Saito M, Toyoda H, Sato H, Ishii Y, Kang Y, Rapid use-dependent down-regulation of γ -aminobutyric acid type A receptors in rat mesencephalic trigeminal neurons, *Journal of Neuroscience Research* 87, 3120-3133, 2009. (査読有)
- ⑥ Zhao MG, Toyoda H, Wang YK, Zhuo M, Enhanced synaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult wild mice as compared with that in laboratory mice, *Molecular Brain* 2, 11, 2009. (査読有)

- ⑦ Toyoda H, Zhao MG, Zhuo M, Enhanced quantal release of excitatory transmitter in anterior cingulate cortex of adult mice with chronic pain, *Molecular Pain* 5, 4, 2009. (査読有)

[学会発表] (計 20 件)

- ① 豊田博紀, 齋藤充, 岡澤慎, 平尾圭子, 佐藤元, 阿部遙, 高田健治, 船曳和雄, 高田昌彦, 金子武嗣, 姜英男. Bidirectional regulation of TASK1 channels expressed in HEK cells by modulation of PKG. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 28 日, 横浜.
- ② 齋藤充, 佐藤元, 豊田博紀, 田中琢真, 小林真之, Daniel Althof, Akos Kulik, 青柳富誌生, 重本隆一, 姜英男. Intercolumnar and intracolumnar desynchronization by GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition in the rat barrel cortex. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 28 日, 横浜.
- ③ 佐藤元, 川上晋平, 豊田博紀, 齋藤充, Yong-Chul Bae, 姜英男. Differential electrophysiological properties of capsaicin-induced currents between layer II/III and layer V pyramidal cells of the insular cortex. 第 88 回日本生理学会大会・第 116 回日本解剖学会総会全国学術集会 合同大会, 2011 年 3 月 28 日, 横浜.
- ④ Kawasaki Y, Saito M, Toyoda H, Sato H, Tanaka S, Kogo M, Kang Y. Membrane hyperpolarization depresses AMPA currents in the primary sensory neuron of the rat mesencephalic trigeminal nucleus. 40th Society for Neuroscience, Nov. 17th, 2010, San Diego, USA.
- ⑤ Toyoda H, Saito M, Okazawa M, Hirao K, Sato H, Abe H, Takada K, Funabiki K, Takada M, Kaneko T, Kang Y. Protein kinase G (PKG) bidirectionally modulates TASK1 currents in PKG-loaded HEK 293 cells. 40th Society for Neuroscience, Nov. 15th, 2010, San Diego, USA.
- ⑥ Saito M, Sato H, Toyoda H, Kobayashi M, Althof D, Kulik A, Shigemoto R, Kang Y. Inter- and intracolumnar desynchronization by presynaptic GABA_B inhibition in the rat barrel cortex. 40th Society for Neuroscience, Nov. 15th, 2010, San Diego, USA.
- ⑦ Sato H, Kawakami S, Toyoda H, Saito M, Bae YC, Kang Y. Electrophysiological properties of capsaicin-induced currents in layer II/III and layer V pyramidal cells of the insular cortex. 40th Society for Neuroscience, Nov. 13th, 2010, San Diego, USA.
- ⑧ 佐藤元, 豊田博紀, 齋藤充, 姜英男. カプサイシン投与により島皮質において誘発される network oscillation. 第 103 回近畿生理学談話会, 2010 年 10 月 2 日, 吹田.
- ⑨ 川寄康大, 齋藤充, 佐藤元, 豊田博紀, 姜英男. 三叉神経中脳路核ニューロンにおいてグルタミン酸作動性入力を無効化するイオン機構. 第 103 回近畿生理学談話会, 2010 年 10 月 2 日, 吹田.
- ⑩ Toyoda H, Saito M, Hirao K, Sato H, Takada K, Kaneko T, Kang Y. Bidirectional modulation of leak K⁺ currents by PKG in cholinergic neurons of the basal forebrain. 39th Society for Neuroscience, Oct. 21th, 2009, Chicago, USA.
- ⑪ Sato M, Saito M, Toyoda H, Kang Y. PKG modulates the recruitment of masseter motoneurons caused by the presumed spindle Ia inputs. 39th Society for Neuroscience, Oct. 21th, 2009, Chicago, USA.
- ⑫ Saito M, Sato M, Toyoda H, Kang Y. Inter- and intra-columnar desynchronization of excitatory input by presynaptic GABA_B inhibition in the rat barrel cortex. 39th Society for Neuroscience, Oct. 20th, 2009, Chicago, USA.
- ⑬ 豊田博紀, 平尾圭子, 齋藤充, 佐藤元, 姜英男. 咬筋運動ニューロンにおける漏洩 K⁺ 電流に対する PKG の調節作用. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16 日, 名古屋.
- ⑭ 平尾圭子, 豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元, 姜英男. 咬筋運動ニューロンにおける TASK チャネルの発現様式. 第 32 回日本神経科学大会, 2009 年 9 月 16 日, 名古屋.
- ⑮ 豊田博紀, 平尾圭子, 齋藤充, 佐藤元, 姜英男. 咬筋運動ニューロンにおける漏洩 K⁺ 電流の PKG による動的調節. 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 11 日, 新潟.
- ⑯ 齋藤充, 佐藤元, 深津雄己, 豊田博紀, 姜英男. 閉口筋運動ニューロンの序列動員と PKG によるその修飾. 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟.
- ⑰ 佐藤元, 齋藤充, 豊田博紀, 姜英男. 大脳皮質バレル野と味覚野におけるカラム情報処理機構の領野特異性. 第 51 回歯科基礎医学会, 2009 年 9 月 10 日, 新潟.

- ⑮ Sato H, Saito M, Toyoda H, Kang Y. Recruitment of masseter motoneurons by the presumed spindle Ia inputs. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Jul. 30th, 2009, Kyoto.
- ⑯ Toyoda H, Saito M, Hirao K, Sato H, Takada K, Kaneko T, Kang Y. PKG modulates TASK1-like currents in cholinergic neurons of the basal forebrain. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Jul. 29th, 2009, Kyoto.
- ⑰ Saito M, Sato H, Toyoda H, Kang Y. Presynaptic GABA_B inhibition involved in the inter- and intra-columnar desynchronization of glutamatergic input in the rat barrel cortex. XXXVI International Congress of Physiological Sciences, Jul. 29th, 2009, Kyoto.

〔図書〕 (計 2 件)

- ① Kang Y, Saito M, Toyoda H, Sato H. Recruitment of masseter motoneurons by the presumed spindle Ia inputs. *In: Breathe, Walk and Chew - The Neural Challenge: Part I (Progress in Brain Research, Vol, 187) (Gossard JP, Dubuc R, Koltá A, Eds.), Elsevier, Amsterdam, pp, 163-172, 2010. (査読無)*
- ② Kang Y, Toyoda H, Saito M, Sato H, Recruitment of masseter motoneurons by spindle Ia inputs and its modulation by leak K⁺ channels. *In: Interface Oral Health Science 2009 (Sasano T, Suzuki O, Eds.), Springer, Tokyo, pp, 60-68, 2010. (査読無)*

6, 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda Hiroki)

大阪大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：00432451