

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462885

研究課題名(和文) 神経麻痺の発症機構解明と新規治療法開発に関する研究

研究課題名(英文) The study on the mechanism of nerve paralysis and its application for the therapy

研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda, Hiroki)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：00432451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、神経麻痺の発症機構解明を解明するため、運動ニューロンに発現している漏洩カリウムチャネルの制御機構に着目して研究を推進した。小型運動ニューロン群では、一酸化窒素により入力抵抗の減少が認められ、スパイク潜時が遅延していた。一方、大型運動ニューロン群では、一酸化窒素により入力抵抗及びスパイク潜時はほとんど変化していなかった。これらの結果から、神経麻痺発症の際、一酸化窒素により運動ニューロンに発現する漏洩カリウムチャネルの機能変調が生じ、運動ニューロンの膜興奮性が変化するものと考えられる。こうした神経機構が、顎顔面の運動神経麻痺に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we studied the mechanism of nerve paralysis by focusing on the role of leak K<sup>+</sup> channels expressed in motoneurons. Following application of 8-Br-cGMP, input resistances were decreased and spike onsets were delayed in small-sized motoneurons (< 20 μm), while input resistances and spike onsets remained almost unchanged in large-sized motoneurons (> 35 μm). These results suggest that activation of NO-cGMP-PKG pathway alters membrane excitability of motoneurons through the modulation of activities of leak K<sup>+</sup> currents. Such neural mechanisms are likely to be involved in the generation of neural paralysis.

研究分野：神経科学

キーワード：漏洩カリウムチャネル 運動ニューロン 一酸化窒素 cGMP 三叉神経 顔面神経 入力抵抗 スパイク

## 1. 研究開始当初の背景

頭頸部領域には、複雑多岐にわたる神経支配が見られ、三叉神経、顔面神経、舌下神経及び迷走神経などが分布している。こうした神経が障害を受けると、神経痛、麻痺、痙攣などが出現する。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、三叉神経知覚麻痺は歯科臨床において発生頻度の高い疾患である。しかしながら、現在のところ決定的な治療法はなく、薬物療法や理学療法といった対症療法が中心に行われているため、顔面神経麻痺および三叉神経知覚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、顔面神経障害後の顔面運動神経細胞の活動低下が表情筋への出力低下(運動性出力の低下)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、三叉神経の障害により、三叉神経節に存在する一次感覚神経細胞の活動低下が中枢への出力低下(感覚性入力低下)を引き起こし、三叉神経知覚麻痺発症に関与しているものと考えられる。このように、神経障害後、顔面運動神経細胞や三叉神経節神経細胞の活動低下が生じることにより、神経麻痺が発症する可能性が強く示唆されるが、このことに着目した研究は報告されていない。そこで本研究では、神経細胞の膜興奮性制御に重要な役割を果たす漏洩カリウムチャンネルに着目し、神経麻痺の発症機構を解明する。

近年、漏洩カリウムチャンネルがクローニングされ、神経細胞の静止膜電位や入力抵抗を制御することにより、神経細胞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された(Bayliss et al., 2003)。漏洩カリウムチャンネルの中で、細胞外 pH に感受性を示す TWIK-related acid-sensitive  $K^+$  channel-1 (TASK1) 及び TASK3 チャンネルは哺乳類の脳に広く分布し、顔面運動神経細胞や三叉神経節神経細胞において豊富に発現している(Talley et al., 2001)。漏洩カリウムチャンネルは、プロトン、生理活性物質や局所麻酔薬など様々な神経修飾物質により抑制を受けることが知られているが、それを活性化する内因性修飾物質は長年不明であった。しかし、申請者らはこれまで、TASK1 チャンネルが、一酸化窒素-cGMP-PKG 経路により活性化され(Toyoda et al., J. Neurosci., 2010)、一方、TASK3 チャンネルが抑制されることを見出している(Okamoto et al., eNeuro, 2016)。一酸化窒素は、血管拡張作用、抗動脈硬化作用や神経情報伝達作用などの多彩な生理活性作用を持つことが知られている。その一方、一酸化窒素動態の異常により、動脈硬化、高血圧症、認知症、アルツハイマー病など様々な疾患が生じ

ることが報告されている。神経損傷により、一酸化窒素の産生増加が起こることが知られており、末梢顔面神経損傷および末梢三叉神経損傷後では、それぞれ顔面運動神経細胞や三叉神経節神経細胞において、一酸化窒素合成酵素の増加が認められている。さらには、ヘルペスウイルスを用いた顔面神経麻痺モデルマウスの顔面神経では、一酸化窒素の産生増加が認められており、一酸化窒素が神経麻痺の発症に関与する可能性が報告されている。以上のことから、神経損傷により産生される一酸化窒素が、神経麻痺の発症に関与している可能性が非常に高い。これらの知見を踏まえ、本研究課題では、「神経損傷を受けた神経細胞において、一酸化窒素の産生増加が生じ、漏洩カリウムチャンネルが活性化される。その結果、神経細胞の活動(膜興奮性)が低下し神経麻痺が発症する」という作業仮説を立てた。本研究では、この作業仮説を検証し、神経麻痺の発症機構を解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

神経麻痺発症の際、ニューロンにおいて、一酸化窒素の産生増加が生じることが示唆されている。このため、一酸化窒素が、ニューロンに発現している漏洩カリウムチャンネルを修飾し、膜興奮性を変化させ、神経麻痺発症に寄与している可能性が高い。本研究ではこうした可能性を検証するため、以下の項目について検討する。

- (1) 運動ニューロンにおける TASK1 および TASK3 チャンネルの発現量および発現分布
- (2) 運動ニューロンのサイズと入力抵抗の関係
- (3) 小型および大型運動ニューロンに発現する漏洩カリウムチャンネルに対する 8-Br-cGMP の作用
- (4) 三叉神経中脳路核から三叉神経運動核へ投射する線維を刺激したときに生じるシナプス後電位(EPSP)に対する 8-Br-cGMP の作用

## 3. 研究の方法

- (1) 運動ニューロンにおける TASK1 および TASK3 チャンネルの発現量および発現分布  
三叉神経運動核咬筋領域および顔面神経核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咬筋領域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う。細胞径が 20  $\mu\text{m}$  以下と 35  $\mu\text{m}$  以上の二群に分け、細胞径が 20  $\mu\text{m}$  以下のものは約 80 個の細胞体を 1 サンプル、細胞径が 35  $\mu\text{m}$  以上のものは約 400 個の細胞体を 1 サンプルとして TASK1 および TASK3 mRNA の発現量を

検討する。

#### 免疫組織化学的手法を用いた解析

生後5-6週齢のWistar系ラットの灌流固定標本を作成し、三叉神経運動核咬筋領域および顔面神経核運動ニューロンの細胞体や軸索に分布するTASK1およびTASK3チャンネルの発現分布を観察する。そして、細胞径によるその差異の有無を検討する。

#### (2) 運動ニューロンのサイズと入力抵抗の関係

生後7-14日齢のWistar系ラットから三叉神経運動核を含む厚さ250  $\mu\text{m}$  の冠状断スライス標本を作製し、三叉神経運動核咬筋領域のニューロンに対し、ホールセルパッチクランプを形成する。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、蛍光色素である Lucifer yellow を填入する。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、得られる電流-電圧関係から入力抵抗を算出し、細胞径との関係を検討する。

#### (3) 運動ニューロンにおける静止膜電位および入力抵抗に対する8-Br-cGMPの作用

(2)と同様にスライス標本を作製する。様々な大きさの運動ニューロンにおいて、電流パルスの注入により求められる入力抵抗や静止膜電位が、8-Br-cGMPの投与によりどのような影響を受けるかを検討する。また、細胞径との関係を検討する。

#### (4) 三叉神経中脳路核から三叉神経運動核へ投射する線維を刺激したときに生じるシナプス後電位(EPSP)に対する8-Br-cGMPの作用

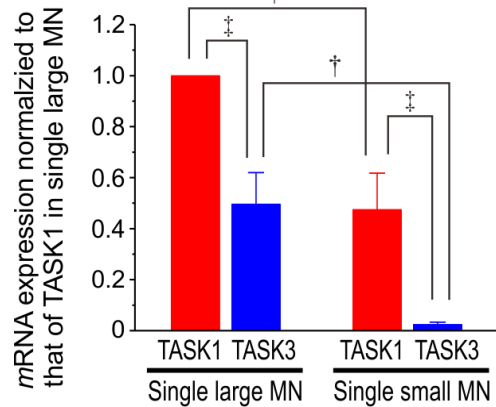
三叉神経中脳路核からの入力線維束が通過する三叉神経運動核背内側部をタングステン電極で微小刺激を与えることによりEPSPを誘発する。8-Br-cGMP投与前後で、EPSPの振幅がどのように変化するかを観察し、細胞径との関係を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1) 運動ニューロンにおけるTASK1およびTASK3チャンネルの発現様式

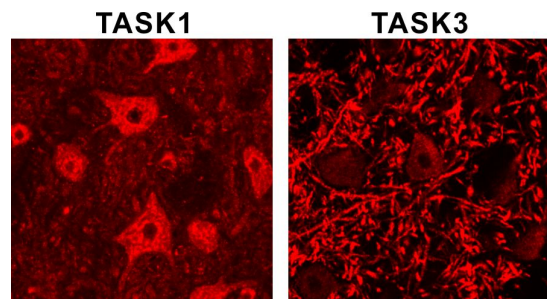
三叉神経運動核咬筋領域および顔面神経核運動ニューロンにおけるTASK1およびTASK3 mRNAの発現量の検討

TASK1、TASK3、GAPDHのmRNA量をリアルタイムPCR解析により定量化した。その結果、大型運動ニューロンに比べて、小型運動ニューロンのTASK1 mRNAの発現量は50%程度であり、TASK3 mRNAの発現量は5%以下であった。これらの結果から、大型運動ニューロンでは、漏洩カリウム電流が主としてTASK1およびTASK3チャンネルにより媒介され、小型運動ニューロンでは、漏洩カリウム電流が主としてTASK1チャンネルにより媒介されることが明らかになった。



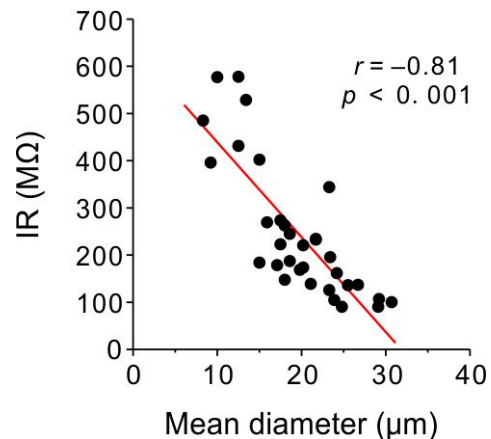
#### 免疫組織化学的手法を用いた解析

TASK1チャンネルは、細胞径の大小に関わらず、常に細胞体に発現していた。一方、TASK3チャンネルは、主に樹状突起に発現していることが明らかになった。樹状突起は、大型の運動ニューロンで特に発達しており、小型の運動ニューロンでは発達していなかった。



#### (2) 運動ニューロンのサイズと入力抵抗の関係

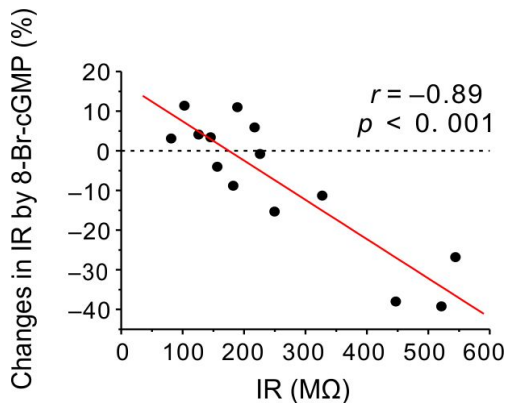
三叉神経運動核咬筋領域における運動ニューロンの細胞径と入力抵抗の間には逆相関が認められた。これらの所見は、細胞径が大きくなるにつれ、漏洩カリウムチャンネルの発現量が増えることを示唆していた。



#### (3) 小型および大型運動ニューロンに発現する漏洩カリウムチャンネルに対する8-Br-cGMPの作用

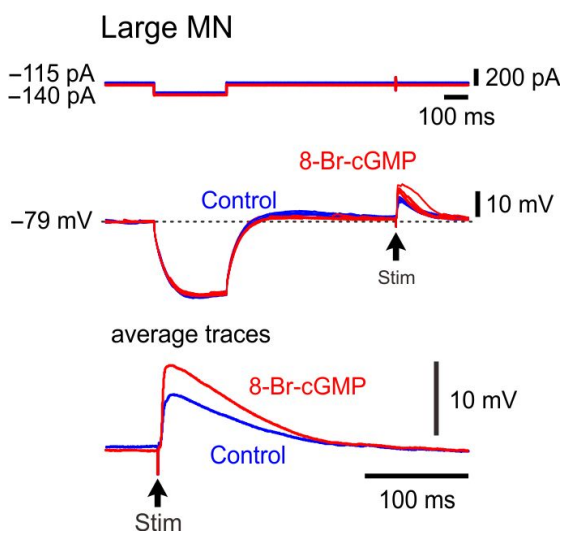
小型運動ニューロンでは、8-Br-cGMPの投

与により、入力抵抗は減少し、静止膜電位も過分極方向にシフトした。大型運動ニューロンでは、8-Br-cGMP の投与により、入力抵抗は殆ど影響を受けないか或いは僅かな増加が認められ、静止膜電位も変化しないか、僅かに脱分極方向にシフトしていた。



(4) 小型および大型運動ニューロンで誘引される EPSP に対する 8-Br-cGMP の作用

小型運動ニューロンにおいては、8-Br-cGMP により EPSP の振幅が減少していた。一方、大型ニューロンでは、8-Br-cGMP により EPSP の振幅が増大した。このことは、大型運動ニューロンの樹状突起には TASK3 チャンネルが発現しており、8-Br-cGMP により TASK3 チャンネルが抑制され、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。



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カリウム電流が修飾を受け、その結果、運動ニューロンの興奮性が変化することが明らかとなった。神経麻痺発症の際には、一酸化窒素が増加することから、一酸化窒素による運動ニューロンの活動様式の変化が、神経麻痺を引き起こしている可能性が示唆される。

## 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 8 件)

1. Kang Y, Sato H, Saito M, Yin DX, Park SK, Oh SB, Bae YC, Toyoda H. A role of CB1R in inducing  $\theta$ -rhythm coordination between the gustatory and gastrointestinal insula. *Scientific Reports* 6: 32529, 2016. doi: 10.1038/srep32529. (査読有)
2. Okamoto K, Emura N, Sato H, Fukatsu Y, Saito M, Tanaka C, Morita Y, Nishimura K, Kuramoto E, Yin DX, Furutani K, Okazawa M, Kurachi Y, Kaneko T, Maeda Y, Yamashiro T, Takada K, Toyoda H, Kang Y. The possible role of TASK channels in rank-ordered recruitment of motoneurons in the dorsolateral part of the trigeminal motor nucleus. *eNeuro* 3: 3, 2016. doi: 10.1523/ENEURO.0138-16.2016. (査読有)
3. Kawakami S, Sato H, Sasaki AT, Tanabe HC, Yoshida Y, Saito M, Toyoda H, Sadato N, Kang Y. The brain mechanisms underlying the perception of pungent taste of capsaicin and the subsequent autonomic responses. *Frontiers in Human Neuroscience* 9: 720, 2016. doi: 10.3389/fnhum.2015.00720. (査読有)
4. Toyoda H, Saito M, Sato H, Kawano T, Kawakami S, Yatani H, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced lateral inhibition in the barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 in mice. *Pflügers Archives–European Journal of Physiology* 467(7):1445-1456, 2015. (査読有)
5. Toyoda H, Saito M, Sato H, Tanaka T, Ogawa T, Yatani H, Kawano T, Kanematsu T, Hirata M, Kang Y. Enhanced desensitization followed by unusual resensitization in GABA<sub>A</sub> receptors in phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2 double-knockout mice. *Pflügers Archives–European Journal of Physiology* 467(2): 267-284, 2015. (査読有)
6. Sato H, Kawano T, Saito M, Toyoda H, Maeda Y, Turker KS, Kang Y. Teeth clenching reduces arm abduction force.

- Experimental Brain Research* 232(7): 2282-2291, 2014. (査読有)
7. Sato H, Toyoda H, Saito M, Kobayashi M, Althof D, Kulik A, Kang Y. GABA<sub>B</sub> receptor-mediated presynaptic inhibition reverses inter-columnar covariability of synaptic actions by intracortical axons in the rat barrel cortex, *European Journal of Neuroscience* 37(2): 190-202, 2013. (査読有)
  8. Saito M, Tanaka T, Sato H, Toyoda H, Aoyagi T, Kang Y. A mathematical model of negative covariability of inter-columnar excitatory synaptic actions caused by presynaptic inhibition. *European Journal of Neuroscience* 38(7): 2999-3007, 2013. (査読有)

〔学会発表〕(計 11 件)

1. 豊田博紀, 佐藤元, 尹東旭, 姜英男. アナグミドにより島皮質味覚野と胃腸自律神経野間にネットワークオシレーションが誘発される. 第 94 回日本生理学会大会, 浜松, 2017 年 3 月 28 日.
2. 豊田博紀. 島皮質オシレーションと味覚-摂食機能連関. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム, 札幌, 2016 年 8 月 24 日.
3. Toyoda H, Hirao K, Emura N, Saito M, Sato H, Kawano T, Kuramoto E, Kaneko T and Kang Y. The role of TASK channels in rank-ordered recruitment of trigeminal jaw-closing motoneurons. The International Symposium on Neuroscience in Orofacial sensory-motor functions 2015, Osaka, May 11th, 2015.
4. 豊田博紀, 佐藤元, 齋藤充, 河野奨, 姜英男. ラットバレル皮質におけるカイン酸誘発性オシレーション. 第 92 回日本生理学会大会・第 120 回日本解剖学会総会全国学術集会合同大会, 神戸, 2015 年 3 月 21 日.
5. 豊田博紀, 佐藤元, 齋藤充, 河野奨, 姜英男. 大脳皮質体性感覚野バレル皮質領野におけるカラム間の周期的同期化機構. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会サテライトシンポジウム, 福岡, 2014 年 9 月 25 日.
6. Toyoda H, Saito M, Sato H, Kawano T, Kanematsu T, Hirata M and Kang Y. Enhancement of lateral inhibition in the mouse barrel cortex by deletion of phospholipase C-related catalytically inactive protein-1/2. The 44th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Washington, USA, November 17th, 2014.
7. 豊田博紀. 島皮質に発現する味覚関連受容体の役割解明. 第 19 回うま味研究助成成果発表会, 東京, 2014 年 12 月 19 日.
8. 豊田博紀, 佐藤元, 齋藤充, 河野奨, 姜英男. 大脳皮質体性感覚野バレル皮質領野におけるカラム間の周期的同期化機構. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 福岡, 2014 年 9 月 27 日.
9. 豊田博紀, 平尾圭子, 榎村徳仁, 齋藤充, 佐藤元, 姜英男. TASK チャネルによる咬筋運動ニューロンの序列動員生成機序. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 2014 年 9 月 11 日.
10. Toyoda H, Saito M, Sato H, Kanematsu T, Hirata M and Kang Y. Phospholipase C-related inactive proteins are involved in the regulation of phasic and tonic inhibition in the barrel cortex. The 43rd Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, November 11th, 2013.
11. 豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元, 兼松隆, 平田雅人, 姜英男. バレル皮質錐体細胞において PRIP 遺伝子欠損により細胞外シナプス GABA<sub>A</sub> 受容体の発現が増加する. 第 36 回日本神経科学大会, 京都, 2013 年 6 月 21 日.

## 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・准教授  
 研究者番号: 00432451