

平成 21 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007-2008

課題番号：19591732

研究課題名（和文） 脊髄損傷に対する P2X 受容体の神経保護作用の検討

研究課題名（英文） Extracellular ATP facilitates excitatory synaptic transmission in rat spinal motoneurons

研究代表者

宮崎 展行 (MIYAZAKI NOBUYUKI) ・和歌山県立医科大学・医学部・助教(90438276)

研究成果の概要：

ラット脊髄横断スライス標本にホールセル・パッチクランプ法を適用し、脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体の役割を検討した。代謝安定型の ATP 受容体作動薬である ATP β S (100 μ M) を灌流投与すると、約半数の脊髄運動ニューロンにおいて内向き電流が発生すると共に、グルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅は著明に増加した。また、P2X 受容体作動薬である α, β -methylene ATP (100 μ M) は興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅を著明に増加した。以上の結果から、脊髄運動ニューロンのシナプス前には α, β -methylene ATP 感受性の P2X 受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によってグルタミン酸の遊離が増強する。さらに、シナプス後細胞にも 2-methylthio ADP 感受性の P2Y 受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によって直接的に脊髄運動ニューロンを脱分極することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000 円	660,000 円	2,860,000 円
2008 年度	1,300,000 円	390,000 円	1,690,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：整形外科

キーワード：脊髄損傷, 神経科学, ATP, パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

外傷性脊髄損傷は急激に四肢や体幹の運動・知覚麻痺を呈し、著しく ADL (Activity of Daily Life) を低下させ、患者の QOL(Quality of life)を奪ってしまう外傷である、これまで二次損傷を防ぐ目的で副腎皮

質ステロイドホルモンの大量療法が施行されてきたが、必ずしも有効性が高いわけではなく、副作用も多く、新しい作用機序を有する治療薬の登場が待ち望まれている。

2. 研究の目的

P2X₇ 受容体は脊髄運動ニューロンに発現していること(Brain Res 1020;53-61,2004)や脊髄損傷の急性期治療として P2X₇ 受容体阻害薬が有効であることが報告され(Nature Med 10,821-827,2004)、その役割が注目されているが、電気生理学的検討はなされていない。我々は脊髄スライス標本を用いて単一の脊髄運動ニューロンからホールセル・パッチクランプ記録を行い、脊髄運動ニューロンにおける ATP および P2X 受容体の機能的役割について検討を行った。

3. 研究の方法

ペントバルビタール麻酔下にラット腰仙部脊髄を摘出する。直ちに 95% O₂ □ 5% CO₂ で飽和し、かつ冷却した人工脳脊髄液 (2 □ 4 □) を浸したシャーレに移し、実体顕微鏡下に硬膜を除去した後、全ての後根および前根を切除する。さらに、クモ膜および軟膜を除去した後、浅い溝を形成したブロック状の寒天上に腰仙部脊髄を置き固定する。マイクロスライサーを用いて、厚さ 250 μm の脊髄横断スライス標本を作製する。切り出したスライスを記録用チャンバ内に移し、95% O₂ □ 5% CO₂ で飽和した人工脳脊髄液を 5 □ 10 ml/min の速度で灌流する。赤外線システムを含有する顕微鏡を用いて、テレビモニター下に脊髄前角ニューロンからパッチクランプ記録を行う。まず、低倍率の対物レンズを用いて標的層(第Ⅱ層)を確認する。その後、高倍率の水浸対物レンズに切り換え、第Ⅱ層内の脊髄前角ニューロンをテレビモニターで確認し、ホールセル・パッチクランプ法によって単一細胞から電気応答を記録する。ホールセル・パッチクランプ法による脊髄前角ニューロンの電気生理学的応答の解析は、微小ガラス電極作成装置やマイクロマニピュレーターおよび膜電位電流固定用増幅器や現有する解析用コンピュータなどを用いて実施する。ATP および各種 P2X 受容体作動薬(ATP β S, BzATP, 2methylthio-ATP, α,β-methylene-ATP など)を灌流投与して、脊髄運動ニューロンの保持膜電流や興奮性シナプス後電流に変化が生じるか観察した。

4. 研究成果

電位固定法を用いて膜電位を-70 mV に保持して、代謝安定型の ATP 受容体作動薬である ATP β S (100 μM) を灌流投与すると、約半数の脊髄運動ニューロンにおいて内向き電流が発生すると共に、グルタミン酸を介する興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅は著明に増加した。ATP β S (100 μM) によって内向き電流が観察される細胞に、P2Y 受容体作動薬である 2-methylthio ADP (100 μM) を灌流投与すると、内向き電流が観察されたが、興奮性シナプス後電流の発生

頻度ならびに振幅に変化はみられなかった。また、ATP β S 灌流投与によって生じた内向き電流は、記録電極内に GDP β S (2 mM) を加えることによって有意に抑制された。一方、P2X 受容体作動薬である α,β-methylene ATP (100 μM) ならびに BzATP (100 μM) は保持膜電流に全く影響を与えなかったが、α,β-methylene ATP (100 μM) は興奮性シナプス後電流の発生頻度ならびに振幅を著明に増加した。以上の結果から、脊髄運動ニューロンのシナプス前には α,β-methylene ATP 感受性の P2X 受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によってグルタミン酸の遊離が増強する。さらに、シナプス後細胞にも 2-methylthio ADP 感受性の P2Y 受容体などプリン受容体が発現しており、その活性化によって直接的に脊髄運動ニューロンを脱分極することが明らかとなった。脊髄損傷の急性期における脊髄運動ニューロンの遅発性神経障害にシナプス前ならびにシナプス後細胞のプリン受容体が関与してい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 11 件)

- 1) Miyazaki N, Nakatsuka T, Takeda D, Nohda K, Inoue K, Yoshida M: Adenosine modulates excitatory synaptic transmission and suppresses neuronal death induced by ischaemia in rat spinal motoneurons. Pflugers Archiv, European Journal of Physiology 457, 441-451 (2008)
- 2) Nakatsuka T, Fujita T, Inoue K, Kumamoto E: Activation of GIRK channels in substantia gelatinosa neurones of the adult rat spinal cord: a possible involvement of somatostatin. Journal of Physiology 586, 2511-2522 (2008)
- 3) Mizuta K, Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Inhibitory effects of opioids on compound action potentials in frog sciatic nerve and their chemical structures. Life Sciences 83, 198-207 (2008)
- 4) Liu T, Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Phospholipase A2 Activation Enhances Inhibitory Synaptic Transmission in Rat

- Substantia Gelatinosa Neurons. Journal of Neurophysiology 99, 1274-1284 (2008)
- 5) Mizuta K, Fujita T, Katsuki R, Kosugi T, Tomohiro D, Nakatsuka T, Kumamoto E: Inhibitory actions of opioids on compound action potentials in frog sciatic nerves. Pain Research 23, 185-194 (2008)
 - 6) 脊髄前角細胞におけるアデノシン A_{2A} 受容体の作用. 宮崎展行, 中塚映政, 園部秀樹, 武田大輔, 西秀人, 納田和博, 阪中淳也, 岩崎博, 吉田宗人 脊髄機能診断学 29(1) :21-26,2007
 - 7) Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Kuroda Y, Kumamoto E: Activation of TRPA1 channel facilitates excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. Journal of Neuroscience 27, 4443-4451 (2007)
 - 8) Liu T, Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Phospholipase A2 activation enhances inhibitory synaptic transmission in the rat substantia gelatinosa. Pain Research 22, 11-18 (2007)
 - 9) Takeda D, Nakatsuka T, Gu JG, Yoshida M: The activation of nicotinic acetylcholine receptors enhances the inhibitory synaptic transmission in the deep dorsal horn neurons of the adult rat spinal cord. Molecular Pain ; 3(27):1-9 (2007)
 - 10) Nishi H, Nakatsuka T, Takeda D, Miyazaki N, Sakanaka J, Yamada H, Yoshida M: Hypothermia suppresses excitatory synaptic transmission and neuronal death induced by experimental ischemia in spinal ventral horn neurons. Spine 32, E741-E747 (2007)
 - 11) Nohda K, Nakatsuka T, Takeda D, Miyazaki N, Nishi H, Sonobe H, Yoshida M: Selective vulnerability to ischemia in the rat spinal cord - A comparison between ventral and dorsal horn neurons. Spine 32, 1060-1066 (2007)
- [学会発表] (計 32 件)
- 1) 中塚映政、谷口亘、川口 康彦、青山貴博、藤田亜美、熊本栄一：パッチクランプ法を用いた脊髄電気刺激による鎮痛機構の解析 第 31 回脊髄機能診断研究会 (東京) 2009.2.7.
 - 2) 中塚映政、谷口亘、藤田亜美、熊本栄一：パッチクランプ法を用いた脊髄電気刺激による鎮痛機構の解明 生理学研究 所研究会「筋・骨格系と内臓の痛み研究会」(岡崎) 2009.1.22-23.
 - 3) Nakatsuka T, Fujita T, Aoyama T, Taniguchi W, Kawasaki Y, Kumamoto E: Cellular mechanism of spinal cord stimulation-evoked analgesia: a possible involvement of somatostatin. 38th Annual Meeting of Society for Neuroscience (Washington DC) 2008.11.15-19.
 - 4) Nakatsuka T, Kosugi M, Fujita T, Kumamoto E: Presynaptic TRPA1 mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. 12th World Congress on Pain (Glasgow) 2008.8.17-22.
 - 5) 中塚映政、藤田亜美、青山貴博、熊本栄一：脊髄電気刺激による鎮痛機構 第 30 回日本疼痛学会 (福岡) 2008.7.19-20.
 - 6) Nakatsuka T, Kosugi M, Fujita T, Aoyama T, Kumamoto E: TRPA1 channel-mediated enhancement of excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. The 3rd Asian Pain Symposium (Fukuoka) 2008.7.18-19.
 - 7) Piao L-H, Koga A, Fujita T, Liu T, Yue H-Y, Jiang C-Y, Mizuta K, Aoyama T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Inhibition by tramadol of excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons through mu-opioid receptor activation but not monoamine uptake inhibition. The 3rd Asian Pain Symposium (Fukuoka) 2008.7.18-19.
 - 8) Mizuta K, Fujita T, Katsuki R, Kosugi T, Tomohiro D, Liu T, Yue H-Y, Piao L-H, Nakatsuka T, Kumamoto E: Relationship between the chemical structures of opioids and their inhibitory actions on compound action

- potentials in frog sciatic nerves. The 3rd Asian Pain Symposium (Fukuoka) 2008.7.18-19.
- 9) Tomohiro D, Mizuta K, Fujita T, Nishikubo Y, Liu T, Yue H-Y, Piao L-H, Jiang C-Y, Nakatsuka T, Kumamoto E: Inhibitory actions of capsaicin and its analogs on compound action potentials in frog sciatic nerves. The 3rd Asian Pain Symposium (Fukuoka) 2008.7.18-19.
 - 10) Takeda D, Nakatsuka T, Gu JG, Yoshida M: Enhancement of inhibitory synaptic transmission in the spinal deep dorsal horn through activation of nicotinic acetylcholine receptors. The 3rd Asian Pain Symposium (Fukuoka) 2008.7.18-19.
 - 11) 中塚映政、藤田亜美、青山貴博、谷口亘、熊本栄一：脊髄後角における GIRK チャネルの活性化□内因性ソマトスタチンの関与の可能性について 第 31 回日本神経科学大会（東京） 2008.7.9-11.
 - 12) 青山貴博、中塚映政、藤田亜美、熊本栄一：プリン受容体活性化による脊髄運動ニューロンの興奮性シナプス伝達の増強 第 31 回日本神経科学大会（東京） 2008.7.9-11.
 - 13) 中塚映政、小杉雅史、藤田亜美、熊本栄一：脊髄におけるシナプス前 TRPA1 チャネルの機能的意義について 生理学研究所研究会「TRP チャネルの機能的多様性とその統一的理解」（岡崎） 2008.6.5-6.
 - 14) 中塚映政：シンポジウム□慢性痛のターゲットは？□末梢から中枢まで□脊髄内疼痛伝達機構の可塑的变化 第 12 回日本神経麻酔・集中治療研究会（新潟） 2008.4.11-12.
 - 15) 中塚映政、藤田亜美、青山貴博、谷口亘、熊本栄一：成熟ラット脊髄膠様質ニューロンにおける内因性のソマトスタチンによる GIRK チャネルの活性化 第 85 回日本生理学会大会（東京） 2008.3.25-27.
 - 16) 青山貴博、中塚映政、古賀秀剛、藤田亜美、熊本栄一：P2X ならびに P2Y 受容体の活性化によるラット脊髄運動ニューロンの直接的な興奮 第 85 回日本生理学会大会（東京） 2008.3.25-27.
 - 17) 中塚映政、小杉雅史、藤田亜美、熊本栄一：TRPA1 の活性化による興奮性シナプス伝達の増強 生理学研究所研究会「シナプス伝達の細胞分子調節機構」（岡崎） 2007.11.21-22.
 - 18) Nakatsuka T, Kosugi M, Fujita T, Aoyama T, Mizuta K, Tomohiro D, Kumamoto E: Direct activation of postsynaptic NMDA receptors by TRPA1-induced glutamate release onto substantia gelatinosa neurons of the adult rat spinal cord. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2007.11.3-7.
 - 19) Fujita T, Nakatsuka T, Liu T, Kumamoto E: Enhancement by PAR-1 activation of the spontaneous release of L-glutamate from nerve terminals in the adult rat spinal dorsal horn. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2007.11.3-7.
 - 20) Liu T, Fujita T, Yue H-Y, Piao L-H, Nakatsuka T, Kumamoto E: Phospholipase A2 activation enhances inhibitory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2007.11.3-7.
 - 21) Aoyama T, Nakatsuka T, Koga S, Fujita T, Mizuta K, Takeda D, Kumamoto E: Extracellular ATP facilitates excitatory synaptic transmission in rat spinal motoneurons. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2007.11.3-7.
 - 22) Miyazaki N, Takeda D, Nohda K, Sakanaka J, Yoshida M, Nakatsuka T: Adenosine suppresses neuronal death induced by experimental ischemia in spinal motoneurons. 37th Annual Meeting of Society for Neuroscience (San Diego) 2007.11.3-7.
 - 23) 宮崎展行、中塚映政、西秀人、納田和博、阪中淳也、吉田宗人：実験的虚血負荷による脊髄運動ニューロンの細胞死に対するアデノシンの作用 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会（浜松）

- 2007.10.25-26.
- 24) 阪中淳也、中塚映政、宮崎展行、武田大輔、吉田宗人：脊髄運動ニューロンにおけるドーパミンの作用 第 22 回日本整形外科学会基礎学術集会（浜松）2007.10.25-26.
- 25) 青山貴博、中塚映政、古賀秀剛、藤田亜美、熊本栄一：脊髄運動ニューロンにおける ATP 受容体の機能的役割について 第 58 回西日本生理学会（福岡）2007.10.19-20.
- 26) 水田恒太郎、藤田亜美、香月亮、柳涛、朴蓮花、岳海源、友廣大輔、中塚映政、熊本栄一：オピオイドによるカエル坐骨神経の複合活動電位抑制と構造活性連関 第 58 回西日本生理学会（福岡）2007.10.19-20.
- 27) Fujita T, Liu T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Enhancement by PAR-1 activation of glutamatergic excitatory transmission in adult rat substantia gelatinosa neurons. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, The 50th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, The 17th Annual Meeting of the Japanese Neural Network Society (Yokohama) 2007.9.10-12,
- 28) 青山貴博、中塚映政、古賀秀剛、藤田亜美、熊本栄一：脊髄運動ニューロンにおけるプリン受容体を介するシナプス前性および後性作用 生理学研究所研究会「生体システム間境界領域における ATP・アデノシン情報伝達の役割」（岡崎）2007.9.6-7.
- 29) Kosugi M, Nakatsuka T, Fujita T, Aoyama T, Kumamoto E: TRPA1-mediated facilitation of excitatory synaptic transmission in the spinal dorsal horn. The 29th Annual Meeting of the Japan Association for the Study of Pain (Yokohama) 2007,7,7, Pain Res. 22 (2): 62.
- 30) Mizuta K, Fujita T, Katsuki R, Liu T, Piao L-H, Yue H-Y, Nakatsuka T, Kumamoto E: Inhibitory effects of opioids on compound action potentials in frog sciatic nerves. The 29th Annual Meeting of the Japan Association for the Study of Pain (Yokohama) 2007.7.7.
- 31) Fujita T, Liu T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Glutamate release enhancement by activating proteinase-activated receptor-1 in the adult rat substantia gelatinosa. The 29th Annual Meeting of the Japan Association for the Study of Pain (Yokohama) 2007.7.7.
- 32) 中塚映政：痛みのターゲットは末梢か中枢か？慢性痛はどこを治療したらいいか？第 5 回整形外科痛みを語る会（東京）2007.6.30-7.1.
- 〔図書〕（計 7 件）
- 1) 中塚映政, 熊本栄一: 9 章 脊髄. 「エッセンシャル神経科学」前田正信編、pp137-164、丸善株式会社、東京（2008）
- 2) プライマリケアのための整形外科疼痛マニュアル—薬物療法—医師の立場から. 宮崎展行, 川上守, 菊池臣一 編, p81-88, 金原出版, 東京(2007)
- 3) Kumamoto E, Liu T, Fujita T, Yue H-Y, Nakatsuka T: Role of phospholipase A2 in modulating synaptic transmission in the spinal dorsal horn. In Kumamoto, editor. Cellular and molecular mechanisms for the modulation of nociceptive transmission in the peripheral and central nervous systems. Kerala: Research Signpost; pp87-120.2007.
- 4) Nakatsuka T, Fujita T, Kumamoto E: P2X receptors and pain sensations. In Kumamoto, editor. Cellular and molecular mechanisms for the modulation of nociceptive transmission in the peripheral and central nervous systems. Kerala: Research Signpost. pp69-86.2007
- 5) Fujita T, Nakatsuka T, Kumamoto E: Opioid receptor activation in spinal dorsal horn. In Kumamoto, editor. Cellular and molecular mechanisms for the modulation of nociceptive transmission in the peripheral and central nervous systems. Kerala: Research Signpost; 2007. pp87-101.

- 6) 中塚映政: 大脳皮質の機能局在. 前田正信編. よくわかる病態生理□ 神経疾患. 東京: 日本医事新報; pp130-133.2007
- 7) 中塚映政: 痛みとイオンチャンネル. 山下敏彦編. 運動器の痛み診療ハンドブック. 東京: 南江堂; pp18.2007.

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 展行 (MIYAZAKI NOBUYUKI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号: 90438276

(2)研究分担者

中塚 映政(NAKATSUKA TERUMASA)

佐賀大学・医学部・准教授

研究者番号: 30380752

(3)連携研究者