

機関番号：32667

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592377

研究課題名（和文） 三叉神経節ニューロンの興奮性に対するグリア細胞由来神経栄養因子の役割

研究課題名（英文） Role of Glial cell line-derived neurotrophic factor on the excitability of trigeminal ganglion neurons

研究代表者

武田 守 (TAKEDA MAMORU)

日本歯科大学 生命歯学部 准教授

研究者番号：20227036

研究成果の概要（和文）： グリア細胞由来神経栄養因子（GDNF）の三叉神経節（TRG）ニューロン興奮性に対する修飾作用を *In-vitro* 及び *In-vivo* 条件下で系統的に解析した。その結果、通常、侵害受容性TRGニューロンの細胞体および神経末端からパラクリン機構により分泌されるGDNFによりその興奮性が制御され、また末梢炎症による痛覚過敏の発現にGDNFのパラクリン分泌が関与している可能性が判明した。したがって、三叉神経系の炎症性疼痛にGDNF受容体が新たな分子標的となりその拮抗薬が治療に有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）： Present study investigated that modulatory effect of Glial cell derived neurotrophic factor (GDNF) on the excitability of the trigeminal ganglion neurons under *in vivo* and *in vitro* conditions. The neuronal excitability of the nociceptive trigeminal ganglion neurons was modulated via paracrine mechanism in the soma or nerve terminals, and also this may contribute to development of trigeminal inflammatory hyperalgesia. Thus, GDNF receptor are the therapeutic molecular targets for treatment for trigeminal inflammatory hyperalgesia

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：機能系歯科学

キーワード：三叉神経節ニューロン, GDNF, パラクリン, 侵害受容, パッチクランプ法, 免疫組織化学法, 電気泳動的投与方法, 細胞外記録法

## 1. 研究開始当初の背景

神経系の発生や分化、生存などの機能には多くの神経栄養因子が深く関わることが知られている。神経栄養因子の一つである“グリア細胞由来神経栄養因子”（GDNF：Glial cell-line derived neurotrophic factor）は感覚機能を含む中枢神経及び末梢神経の様々な細胞機能に重要な役割を果たすことが知られている。例えば、一次感覚神経である脊髄後

根神経節ニューロンの胎生期から生後発達の段階において、神経成長及び機能維持に関わる栄養因子のタイプが神経成長因子（NGF：Nerve growth factor）から、GDNFに切り替わることが知られており、このことは成熟した感覚神経細胞の機能維持にGDNFが必須の役割を演じることを示唆している。実際、これらのニューロンの多くはGDNF受容体であるGFR $\alpha$ 1を高頻度に発現しており、細胞体直径が小型の感覚ニューロンである

ことが知られている。したがって GDNF/GFR $\alpha$ 1 発現侵害受容細胞は、GDNF をパラクリン分泌してその機能を調節する可能性が考えられる。

一般に歯科臨床における歯髄、顎関節、咀嚼筋などの炎症時に生じる関連痛、痛覚過敏などの症状発現には、三叉神経系の侵害情報伝達経路において生じる可塑的変化が重要であり、一次求心路の変化（末梢性感作）とこれに起因して生じる二次ニューロンレベルの変化（中枢性感作）の二つが考えられる。近年、感覚神経節内において細胞体及びグリア細胞からパラクリン・オートクリン分泌された様々な生理活性物質が近傍ニューロンに作用してその機能を修飾することが判明してきた。我々は三叉神経支配領域における顎関節など炎症時の異常疼痛（痛覚過敏、アロディニア）の発現に神経節内で分泌される神経ペプチド (Substance P), サイトカイン (Interleukin-1 $\beta$ ) によるニューロン-ニューロン間/ニューロン-グリア細胞間のクロストークが重要な役割を演ずる可能性を明らかとしてきた。一方、最近になり、人の三叉神経節 (TRG) ニューロンにおいて GDNF 及び GFR $\alpha$ 1 の局在が侵害受容に関わる小型-中型ニューロンに限局する事実が明らかとなった。したがって、これらの知見は三叉神経系を介する侵害受容伝達に、三叉神経節内 (TRGs) でパラクリン・オートクリン分泌された GDNF が深く関わることを示唆している。また侵害受容性小型脊髄後根神経節ニューロンにおいても、末梢神経切断により生じる電位依存性 Na<sup>+</sup> 電流密度の低下は GDNF 処置により回復することが報告されている。一方 GDNF を過剰発現させた動物 (トランスジェニックマウス) において、皮膚を支配する侵害受容ニューロンの機械刺激に対する閾値の低下 (感受性が増大) し、痛覚過敏を誘導する事実も指摘されている。これらの知見は GDNF がイオンチャネルのレベルで、正常な侵害受容ニューロンの興奮性を維持するのに必須の役割を果たすことを示唆している。

## 2. 研究の目的

上述のことより、三叉神経系の疼痛伝達に関わる三叉神経節 TRG ニューロンの興奮性が GDNF により機能維持され、この機能異常 (GDNF/GFR $\alpha$ 1 の変化) が異常疼痛発現に関わる可能性が強く示唆される。現在まで、神経栄養因子である GDNF の三叉神経系の疼痛伝達に関わる TRG ニューロン機能維持に対する修飾作用を *in vitro* から *in vivo* の条件下で系統的に解析した研究は見当たらない。

そこで、本研究では三叉神経系の疼痛伝達

に関わる TRG ニューロンの興奮性に対する GDNF の生理的役割を明らかとするため *in vivo* と *in vitro* の条件下で電気生理学的、免疫組織学的手法を用いて解析を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 免疫組織化学的解析 (*in vitro*)

① 顔面皮膚支配の TRG ニューロンの蛍光標識: Wistar ラット (B.W.:100-150g) をネブタール麻酔後(45mg/Kg, i.p.)、同側の顔面皮膚に (0.2% Fluorogold: FG, 10 $\mu$ l) をマイクロシリンジを用いて注入し、この部位を支配するニューロンを FG により蛍光標識した。

### ② GDNF 及び GFR $\alpha$ 1 の免疫組織化学

● 凍結切片作成と免疫染色: 蛍光標識 2-3 日後のラットをホルマリン灌流固定後、片側 TRG を取り出し、固定後、厚さ 10 $\mu$ m の凍結切片を作成した。TRG 切片をスライドガラス上に付着させ、GDNF 抗体 (1:100) と GDNF 受容体抗体 (GFR $\alpha$ 1) (希釈倍率 1:500) に 24 時間インキュベーション後、二次抗体として励起波長の異なる 2 種の蛍光抗体 (Alexa488/568/1:1000) を反応させた。

● GDNF, GFR $\alpha$ 1 免疫陽性細胞の解析: 共焦点レーザ顕微鏡を用いて FG で標識された TRG ニューロンの細胞体の大きさ (<30 $\mu$ m : A $\delta$ -、C-ニューロンに相当; 31-40 $\mu$ m : A $\delta$ -、A $\beta$ -ニューロンに相当;>41 $\mu$ m : A $\alpha$ -ニューロンに相当) と GDNF 及び GFR $\alpha$ 1 の発現関係を解析した。

### (2) TRG ニューロンのパッチクランプ法による解析 (*in vitro*)

① ニューロンの急性分離: 蛍光標識 2-3 日後、Wistar ラット (BW, 100-150g) を断頭処置後、FG 注入側の TRGs を摘出した。組織は細切後、コラゲナーゼにて酵素処理し、パスツールパイペットを用いて細胞を機械的に分離した。麻酔処置したラットを断頭処置後、TRG を取り出し、15-25 分、37 $^{\circ}$ C、Hank's balanced salt solution (130 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5.6 mM glucose, 10 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES), pH 7.3) にてインキュベート、コラゲナーゼ type XI and type II (2 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, U S A) で酵素処理した。

### ② ホールセルパッチクランプ法

● 蛍光励起装置を用いて FG に標識されたニューロンを蛍光励起装置を用いて同定した。アンホテリシン B (60mg/ml) を電極内液 (120 mM potassium ethanesulphonate, 20 mM KCl, 7.5 mM HEPES and 2 mM EGTA (ethylene

glycol-bis-β-minoethyl ether N,N,N',N'-tetraacetic acid), pH 7.3) に入れ、ホールセルモードにて実験した (抵抗: <20M Ω)。

●電圧固定下での解析: 通常の細胞外液(155 mM NaCl, 3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, and 20 mM glucose, pH 7.35)より Na<sup>+</sup>置換した溶液(150 mM choline chloride, 3 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, and 20 mM glucose, pH 7.35)を用いて、2つのパルスプロトコール (図 1) を用いて膜の興奮性の変調に関わる K<sup>+</sup>(I<sub>A</sub>, I<sub>K</sub>)電流を分離して GDNF (1,10, 100ng/ml) 投与により電流が変調されるか否かを調べた。最後に GDNF による変化が K252b によりブロックされるか否かを調べ、受容体特異的な変化か否かを検討した。

●電流固定下での解析: 通常の細胞外液を用いて GDNF (10ng/ml) 投与より三叉神経節ニューロンに膜電位変化が誘発されるか否かを検討した (過分極パルスにより膜抵抗の変化をモニター)。もし膜電位の変化が得られたなら、この変化が GDNF の濃度依存性 (1-100ng/ml) を示すか否かを調べ、次に GDNF 受容体遮断薬(K252b, 100ng/ml)の同時投与により受容体特異的反応か否かを確認した。また、ステップパルス(10-500pA/300ms)により誘発されるスパイク発火頻度、持続時間、発火閾膜電位の変化の有無を解析し、最後に GDNF による変化が K252b によりブロックされるか否かを調べ、受容体特異的な変化か否かを検討した。

### (3) TRG ニューロンの細胞外ユニット記録法による解析 (in vivo)

①TRG 単一ニューロン活動の記録: ネンブター麻酔(45mg/Kg, i.p.)したラットを脳定位固定装置に固定後、吸引処置後、三叉神経組織を露出する。TRGs にマルチバレルのガラス微小電極を刺入してユニット放電を AC アンプ及びゲーター解析装置を用いて記録した。顔面皮膚に刺入したステンレススチールの双極刺電極を用いて電気刺激 (0.1-3ms, 0.1-5mA, 1Hz) して応答するニューロンの神経伝導速度をその反応潜時と刺激—記録部位の距離より算定しニューロンタイプ (Aδ->2m/s; C-線維≤2m/s) を同定した。

②三叉神経節内 GDNF 電気泳動的微小投与の効果

●顔面皮膚支配 TRG ニューロンの自発放電の変化: 伝導速度を算定したユニットに対して自発放電の有無を確かめた後、マルチバレルの他の電極より多チャネルの微細電気泳動装置を用いて電気泳動的に GDNF (100ng/ml, 20-40s) を記録電極近傍に投与し、自発放電が誘発されるか否かを確かめた。も

し、投与電流依存性に放電頻度が変化が誘発されたら、この反応が受容体特異的か否かを判定するためその拮抗薬(K252b) (10ng/ml)の同時投与において効果の消失を検討した。

●顔面皮膚機械刺激に対する TRG ニューロンのユニット放電: 顔面皮膚の機械刺激に対して応答性に対して、電気泳動的 GDNF 投与により、興奮性増大が誘発されるか否かを調べた。さらに侵害機械刺激 (ピンセット、4 N) に対する応答性についても検討した。GDNF 投与により、変化が得られたなら、K252b の同時投与において効果の消失を確かめる。

### ③炎症群ラットの TRG ニューロンの興奮性に対する K252b の効果

ラットの顔面皮膚に起炎物質 (CFA; Complete Freund's Adjuvant) を注入した炎症群ラットを作製した。これらの炎症誘導 2 日目のラットにおける、増強した自発放電、顔面皮膚への機械刺激に対する放電頻度に対する拮抗薬 (K252b) (10ng/ml) を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 免疫組織化学的解析

ラットの顔面皮膚に Fluorogold (FG) を用いてこの部位を支配する TRG ニューロンを FG により蛍光標識した。その後ラットをホルマリン灌流固定後、片側三叉神経節を取り出し、固定後、凍結切片を作成した。三叉神経節切片をスライドガラス上に付着させ、GDNF 抗体と GDNF 受容体抗体 (GFRα1) を用いて免疫染色を施した。GDNF, GFRα1 免疫陽性細胞の解析は共焦点レーザー顕微鏡を用いて FG で標識された三叉神経節ニューロンの細胞体の大きさにより <30μm を小型、31-40μm を中型、>41μm を大型と過去の報告に従って分類した。

図 1 に示すように、GDNF 免疫陽性細胞は、主に侵害受容に関わる小型-中型の TRG ニューロンで観察された。これらの細胞のほとんど (約 86%) は GFRα-1 陽性であった。また TRG ニューロン周囲の衛星細胞も GDNF 陽性を示すものが観察された。

また FG により逆行性に標識される顔面皮膚支配の TRG ニューロンのうち GDNF、GFRα1 陽性ニューロンも小型-中型 (<36 μm) TRG ニューロンであった (98/126、78%) (図 2)。

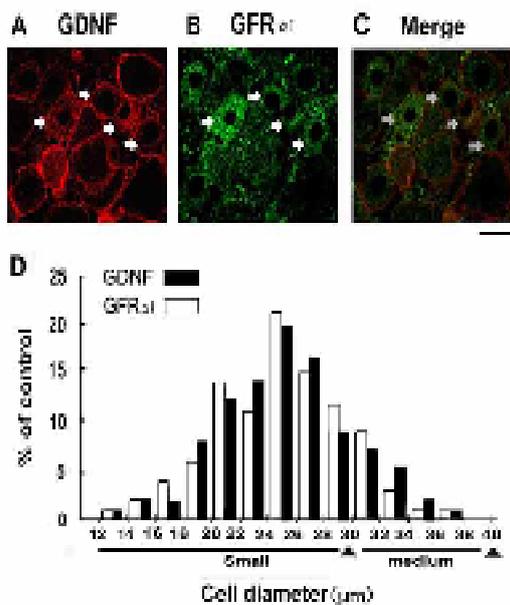


図1 GDNFとGFR $\alpha$ 1免疫活性陽性TRGニューロン

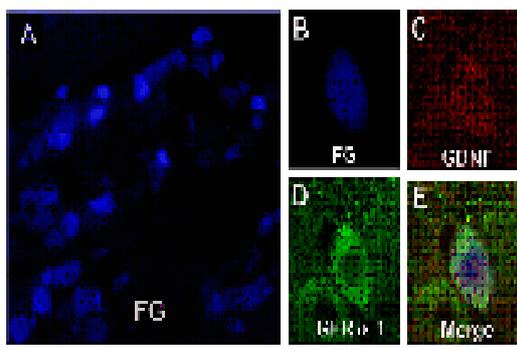


図2 GDNFとGFR $\alpha$ 1免疫活性陽性FG標識 TRGニューロン 校正(A:100 $\mu$ m)(B-E:20 $\mu$ m)

(2) パッチクランプ法による解析

蛍光色素 (FG) を麻酔したラットの顔面皮膚に注入し、この部位を支配する TRG ニューロンを逆向性標識した。前年度の研究より GDNF, GFR $\alpha$ 1 の発現は小型—中型の TRG ニューロンにおいて観察され、小型 TRG ニューロンのほとんどは両者を発現することが判明したので、急性分離した FG 陽性小型—中型 TRG ニューロンの興奮性に対する GDNF の急性投与の効果、穿孔ホールセルパッチクランプ法により電気生理学的に解析した。

ボルテージクランプの条件下において、小型 TRG ニューロンの電位依存性外向き K 電流 ( $I_A$ ,  $I_K$ ) の振幅は GDNF 投与により有意に抑制され、この効果は濃度依存性 (1-100ng/ml) であり protein tyrosine kinase inhibitor の投与により拮抗された(図3)。

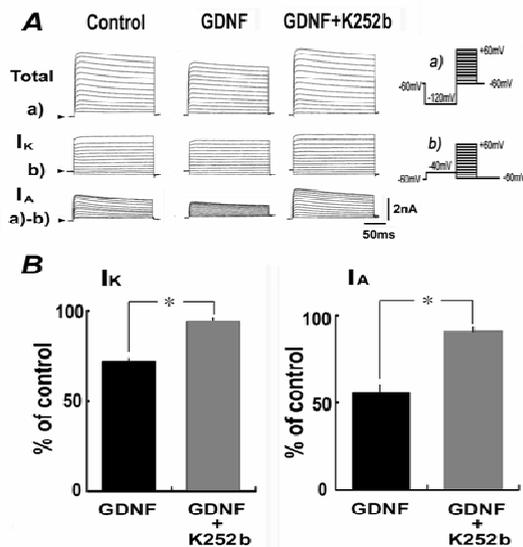


図3 FG標識TRGニューロンのK電流に対するGDNFによる抑制効果と ret 受容体拮抗薬による遮断

カレントクランプの条件下においては、脱分極パルスで誘発される Tetrodotoxin (TTX)(1 $\mu$ M) 抵抗性スパイクの閾膜電位及び静止膜電位は減少し、またスパイク持続時間は延長を伴う発火頻度の増加を示した。この効果も K252b により拮抗された(図4)。これらの結果は顔面皮膚領域を支配する小型 TRG ニューロンの興奮性に GDNF の急性投与は tyrosine kinase 系を介した K 電流抑制によりそれを増強する役割を果たすことを示しており、正常状態において、侵害受容性 TRG ニューロンの細胞体または神経末端から分泌される GDNF によりその興奮性が制御される可能性が示唆された。

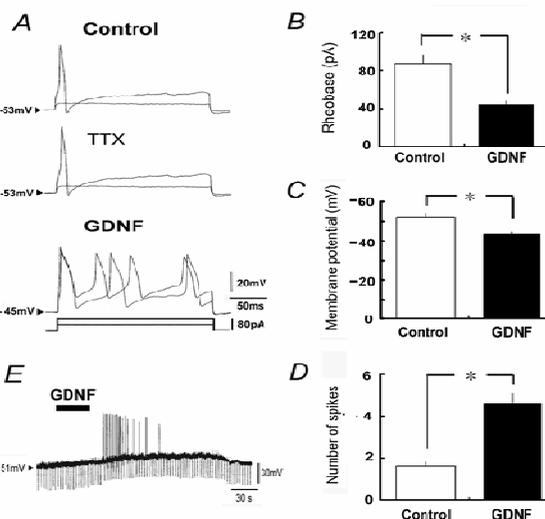


図4 FG標識TRGニューロンの興奮性に対するGDNFの増強効果

### (3) 細胞外記録法による解析

*In vitro* のパッチクランプ法により得られたデータをもとに *in vivo* の条件下において三叉神経系の疼痛伝達に関わる TRG ニューロンの興奮性に対する GDNF の生理的役割について、マルチパレル微小電極を用いた細胞外記録法により電気生理学的に解析した。ネンプタル麻酔したラットの三叉神経節 (TRG) にマルチパレルのガラス微小電極を刺入して、ユニット放電を顔面皮膚の電気刺激に応答する A $\delta$ -TRG-ニューロンより細胞外スパイクを記録した。これらの TRG-ニューロンの 76% (16/21) は微小電気泳動的に投与した GDNF (10ng/ml, 10-90nA, 20-40s) により自発放電が誘発され、電流依存性に放電頻度は有意に増加した (図 5)。

また顔面皮膚の非侵害性機械刺激 (von Frey hair) と侵害刺激で誘発される放電頻度は電気泳動的に投与した GDNF (10ng/ml, 10-90nA, 20-40s) により有意に増加した。これらの増強効果 GDNF 拮抗薬 (K252b) (10ng/ml, 90nA, 20-40s) の同時投与により有意に抑制された (図 6)。

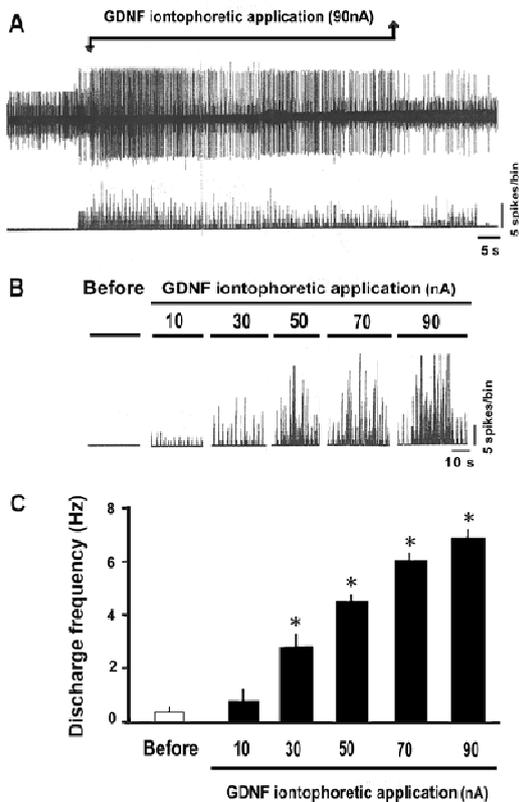


図5 顔面皮膚機械刺激に対するA $\delta$  TRGニューロンの GDNF 電気泳動的投与による自発放電の増強効果

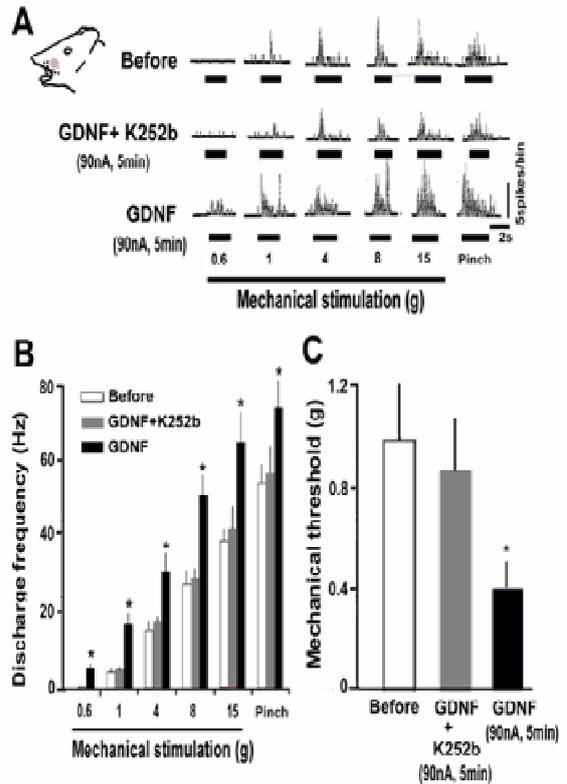


図6 顔面皮膚機械刺激に対するA $\delta$  TRGニューロンの興奮性に対するGDNF 電気泳動的投与による増強効果と K252b による拮抗効果

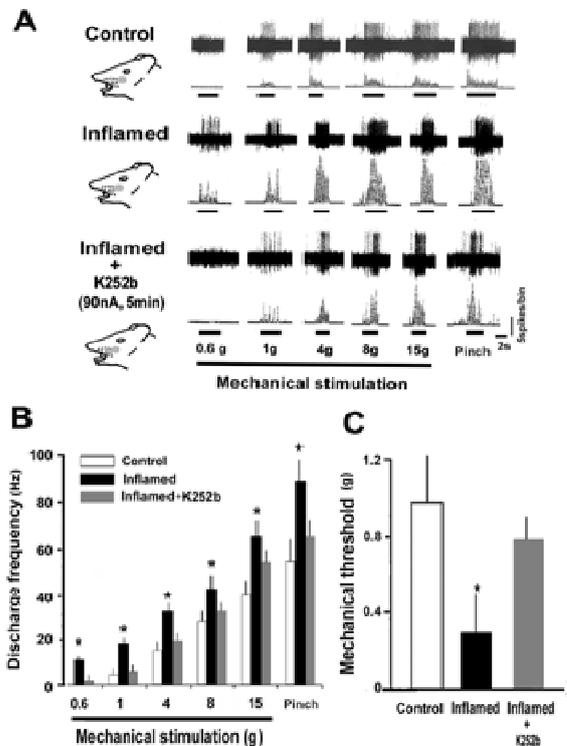


図7 炎症群における顔面皮膚機械刺激に対するTRGニューロンの興奮性増強に対する K252b投与の効果

最後に、図7に示すように、炎症動物に対する GDNF 拮抗薬の効果を検討した。以前の我々の報告と同様に顔面皮膚に起炎物質 (CFA) を注入し、2日後の炎症群ラットの A $\delta$ -TRG ニューロン自発放電頻度は有意に増大した。

また顔面皮膚への機械刺激に対する放電頻度は正常群より有意に増加した。これらの増強効果は GDNF 拮抗薬(K252b)(10ng/ml, 90nA,5min)の TRGs 内への電気泳動的投与により有意に抑制された (図7)。

#### (4) まとめ

以上の結果より、正常状態において侵害受容性 TRG ニューロンの細胞体または神経末端から分泌される GDNF によりその興奮性が制御され、また末梢炎症による痛覚過敏の発現に GDNF のパラクリン分泌が関与している可能性が示唆された。

さらに、末梢組織損傷における神経断端における局所的な GDNF 濃度上昇は侵害受容性 TRG ニューロンの興奮性を増大させる可能性を示唆しており、神経因性疼痛モデルにおける痛覚異常に関与することが推察できる。したがって、三叉神経系の炎症性疼痛に GDNF 受容体 (GFR $\alpha$ 1) が新たな分子標的となりその拮抗薬が治療に有効である可能性が示唆された(図8)。

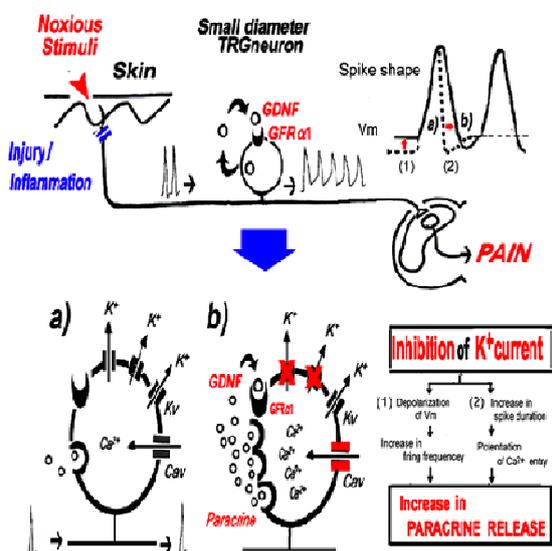


図8 三叉神経支配領域の神経損傷、炎症における GDNF の TRG ニューロンに対する興奮性効果

#### 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 1件)

Takeda M, Kitagawa J, Nasu M, Takahashi M, Iwata K, Matsumoto S. Glial cell line-derived neurotrophic factor acutely modulates the excitability of rat small-diameter trigeminal ganglion neurons innervating facial skin. *Brain Behav Immun* 24:72-82, 2010

[学会発表] (計 2件)

① Takeda M, Kitagawa J, Nasu M, Takahashi M, Iwata K, Matsumoto S, Glial cell line-derived neurotrophic factor acutely modulates the excitability of rat small-diameter trigeminal ganglion neurons innervating facial skin. *Neurosci Res* 68 (Supple 1) e162, 2010

② 武田 守, 北川純一、那須優則、高橋誠之、岩田幸一、松本茂二 顔面皮膚を支配する小型三叉神経節ニューロンの興奮性に対する GDNF の効果  
*J Oral Biosci* 52(Supple):S161,2010

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

武田 守 (TAKEDA MAMORU)  
日本歯科大学 生命歯学部 准教授  
研究者番号：20227036

##### (2) 研究分担者

(0)

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

(0)

研究者番号：