

機関番号：27102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890234

研究課題名（和文） 電気生理学的特徴に基づく三叉神経節ニューロンの分類と炎症ならびに癌による特性変化

研究課題名（英文） Subclassification of trigeminal ganglion neurons using electrophysiological properties and effects of inflammation and cancer

研究代表者

許 聖弘 (XU SHENGHONG)

九州歯科大学・歯学部・研究員

研究者番号：50554771

研究成果の概要（和文）：三叉神経節の神経（ニューロン）は頭頸部の様々な感覚情報（触覚、痒み、痛みなど）を脳に伝える役割を担っている。既に体幹部の感覚を伝える後根神経節ニューロンでは電気生理学的な分類法により9種類以上に分類できることが示されていた。本研究では、この分類法を若干変更することで、三叉神経節ニューロンを8つのグループに分類する事が可能であり、対応する後根神経節ニューロン群と類似した性質を示すことを示した。興味深いことに、三叉神経節と後根神経節ニューロン群に幾つかの化学反応性に相違点があることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Trigeminal ganglion (TRG) neurons play important roles for transductions of a various sensory inputs (touch, itch, pain and so on) at the orofacial region into the brain. It has been reported that dorsal root ganglion (DRG) neurons can be subclassified into over 9 cell types by using electrophysiological properties. The present study demonstrated that TRG neurons can be also subclassified into 8 cell types by using modified criteria, and the subclassified cell types showed similar characteristics to the matched DRG cell types. Interestingly, there were some chemical differences in a few cell types between the TRG and DRG.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：パッチクランプ、三叉神経節、細胞分類、炎症、癌

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) 電気生理学的特徴に基づく三叉神経節ニューロンの分類

1次求心性感覚ニューロンは末梢における様々な感覚情報を中枢に伝える役割を担っている。感覚情報には、触覚、温度感覚（温・

冷覚）、位置感覚、関節感覚、痒み、痛みといった様々な種類がある。痛みにはさらに、C線維およびA $\delta$ 線維による高閾値機械刺激、機械熱刺激、ポリモーダル刺激など10種類以上の感覚情報に分類される。ゆえに、実験上得られる単離1次求心性感覚ニューロンは機能的に異なるヘテロな細胞集団であ

り、得られたデータがどのような種類のニューロンからのものであったかは、結果を解釈する上で非常に重要となる。これまでに細胞径を指標にしたり、活動電位の形態やテトロドトキシン (TTX) 感受性、カプサイシン感受性を利用した様々な分類法のもとに電気生理学的な特徴や薬物反応性が評価されてきた。しかし、これらの指標により分類された細胞群において必ずしも細胞機能の高い同一性は確認されなかった。そこで、別の分類法として、パッチクランプ法により得られた4つの電位依存性イオン電流の特徴を利用することで、小型～中型の後根神経節ニューロンを10種類の細胞群にわけける方法が開発された(Petruska et al., 2000)。この方法によりクラス分けされた各細胞群は高い相同性を持ち、かつそれぞれが特異的な性質を示すという点で過去の分類法を凌いでいる。各細胞群は電流特性のみで分類されているにもかかわらず、活動電位特性、薬物応答性、免疫染色性、レクチン結合性においても高い相同性を示している。また、カプサイシン非感受性痛覚ニューロンを同定する事も可能である。1次求心性感覚ニューロンを対象に痛覚の実験を行う上で、記録ニューロンが本当に疼痛に関連している細胞であるかを同定することは、実験結果の精度の点で非常に重要である。

三叉神経節ニューロンは体幹部を支配する後根神経節ニューロンと異なり、頭頸部の感覚情報に関与している。基本的に三叉神経節ニューロンの電気生理学的特徴は、後根神経節ニューロンとほぼ変わらないと考えられるものの、本当にそうであるかどうかはよく調べられていない。そこでまず、本研究では既に後根神経節ニューロンの電気生理学的特徴によって分類されている9つのタイプが、三叉神経節ニューロンでも同様に認められるかどうかを検討した。研究代表者はこれまでの研究歴の中で、神経細胞の単離・培養ならびに電気生理学的な手法での神経細胞膜の電気的特性について深く研鑽を積み重ねてきた。さらに、前年度までポストドクとして所属していたシドニー大学痛覚制御研究所では後根神経節ニューロンのカプサイシン感受性のエストロゲンによる影響について研究し、2008年に *Endocrinology* に論文を発表した。研究代表者のこの過去の経験は、頭頸部の1次感覚ニューロンである三叉神経節ニューロンを単離・培養し、電気生理学的な解析を行うことに非常に有用である。

#### (2) 炎症ならびに癌による特性変化

炎症や神経障害および癌の発生により痛覚過敏 (アルゲジア) や異種性痛覚 (アロディニア) といった異常疼痛が発生する。臨床の現場においてこのような異常疼痛は治療

困難な場合が多く、特に顔面や顎間接および口腔内で引き起こされた場合は、他の体幹部と異なり、摂食時に機械的刺激や熱刺激が容易に与えられるため、摂食困難により著しくQOL(生活の質)を低下させてしまう。このような事から、頭頸部における炎症や神経障害モデル動物を使った異常痛覚に関する研究は多い。この異常疼痛の発生メカニズムについては不明な点が多く、原因により異なったメカニズムを介している可能性が示唆されている。

そこで本研究課題の第2の目的として、炎症性・癌性疼痛に関わる三叉神経節ニューロンの電気生理学的特性にどのような変化が起きているのかを解明することにある。

## 2. 研究の目的

本研究目的は、三叉神経節ニューロンを電気生理学的なパラメーターをもとに分類し、各細胞タイプの薬物応答性ならびに神経化学的な特徴について調べることである。この結果をもとに、炎症ならびに癌モデルにおいて三叉神経節ニューロンにおける電気生理学的変化、薬物応答性の変化を調べることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 電気生理学的特徴に基づく三叉神経節ニューロンの分類

4週齢雄性Wistarラットをペントバルビタール(50 mg/kg, ip)で麻酔後、三叉神経節を摘出し、コラゲナーゼとトリプシンによる酵素処理後にピペッティングにより分散し、細胞が培養ディッシュ(細胞接着因子処理済み)に付着するまで3時間ほど37°Cの5%CO<sub>2</sub>インキュベーター内に置いた。

その後、記録チャンバーにセットし、ホールセルパッチクランプ法にて記録を行った。電流固定下にて、静止電位ならびに電流刺激による活動電位形態と発火パターンを記録し、電圧固定下にて、IA電流、IK電流、I<sub>h</sub>電流などを記録し、急速薬物投与にてカプサイシン(1 μM)、酸刺激(pH 5.0)、ATP(10 μM)を投与して薬物応答性について検討した。

### (2) 炎症ならびに癌による特性変化

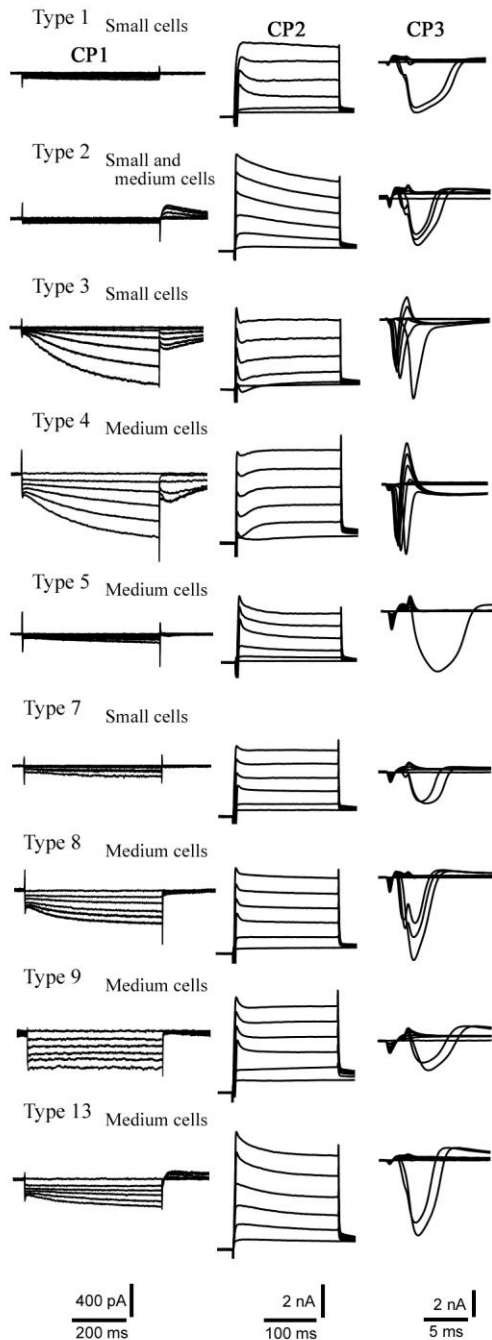
チオペンタール(50 mg/kg, ip)で麻酔後、ラットの右鼻毛部に神経トレーサーを含んだPBS 100 μlもしくは同様に神経トレーサーを含んだ炎症誘発物質(Complete Freund Adjuvant : PBS = 1:1) 100 μl、神経トレーサー遺伝子を導入した癌細胞(Walker 256B)を4x10<sup>6</sup> (in PBS 100 μl)をそれぞれsham群、炎症群、癌群として投与した。投与後2日後に右側三叉神経節を摘出し、(1)

と同様に実験を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 電気生理学的特徴に基づく三叉神経節ニューロンの分類

既に後根神経節ニューロンにおいて行われている分類法に多少手を加えることにより、三叉神経節ニューロンを電気生理学的なパラメーターをもとに9つの細胞タイプに分類することに成功した(Xu et al., 2010, J Neurophysiol, 下图参照)。



この各サブタイプは相同性の高い活動電位形態ならびに薬物応答性を示した。さらに、

ほとんどのサブタイプが同名の後根神経節ニューロンのサブタイプとほぼ同じ性質を示していた。しかしながら、興味深いことに、酸刺激とATP刺激によって引き起こされる電流特性に違いが見られた。これは過去の論文において示唆されていた後根神経節と三叉神経節ニューロンの違いと一致していた。

さらに、各細胞分類と isolectin B<sub>4</sub> との結合性との関連性を調べたところ、同名の後根神経節ニューロンのサブタイプとほぼ同じ結合性を示すことが分かった(Ono et al., 2010, Neurosci lett)。

これらの結果より、三叉神経節ニューロンは電気生理学的特徴に基づく分類が可能であり、後根神経節ニューロン群と大まかに同じであるものの、神経節特異的な反応性を一部有する事が明らかとなった。これらの結果は、今後三叉神経節ニューロンの電気生理学的な実験を行っていく上で非常に有意義であり、後根神経節ニューロンの結果を注意深く参照する必要があることが示唆された。

##### (2) 炎症ならびに癌による特性変化

神経トレーサーとして、小麦胚芽レクチンである WGA を FITC ラベルしたもので実験を行った。予備実験として、PBS だけを投与したものと WGA を混合した PBS を投与し、4 日後に単離三叉神経節ニューロンからパッチクランプ記録を行い、細胞分類ならびに薬物応答性について検討した。結果、神経トレーサー WGA によって、何ら影響は見られなかった。次に、炎症誘発物質 (Complete Freund Adjuvant) を投与し、WGA を混合した PBS を投与した sham 群と比較した。しかしながら、現在までのところ、電気生理学的な性質や薬物応答性に有意な差を見いだせていない。原因として、WGA の漏れにより、炎症に関わらないニューロンまでもラベルされてしまったためだと考えている。現在は、より漏れの少ない別の神経トレーサーの使用を検討している。

癌モデルには、神経トレーサーの投与が必ずしも有効ではなかった事から、DsRed ラベルした WGA 遺伝子を癌細胞に導入することで達成した。抗 DsRed 抗体を用いて免疫染色をすることにより、ラベルされた細胞を明瞭に同定する事には成功したが、生きた細胞の状態では確信を持ってラベルされているというほどの蛍光強度がなく、実験を中断している。現在は、遺伝子導入をやり直し、より DsRed 蛍光の強い細胞株の作製を予定している。

結果的に、(2) 実験は本研究期間内に論文としてまとめる事が出来なかった。今後の検討課題としたい。

## 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 2 件)

- ① Ono K, Xu S, Inenaga K. Isolectin B<sub>4</sub> binding in populations of rat trigeminal ganglion cells. *Neurosci Lett*. 2010 486(3):127-31.
- ② Xu S, Ono K, Inenaga K. Electrophysiological and chemical properties in subclassified acutely dissociated cells of rat trigeminal ganglion by current signatures. *J Neurophysiol*. 2010 104(6):3451-61.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Ono K, Xu S, Inenaga K. Cell classification for rat trigeminal ganglion neurons by current signatures. Annual Meeting Society for Neuroscience. 2010 Nov 16, San Diego, USA.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

許 聖弘 (XU SHENGHONG)

九州歯科大学・歯学部・研究員

研究者番号：50554771