

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20616

研究課題名(和文) 痛覚特異的三叉神経節ニューロン群におけるATPを介した細胞間相互作用の解明

研究課題名(英文) Search for neuron-glia interaction via extracellular ATP in trigeminal ganglion.

研究代表者

黒田 英孝(Kuroda, Hidetaka)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90755018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：ラット三叉神経節における神経細胞とグリア細胞の両細胞に、イオンチャンネル型P2X受容体のサブタイプであるP2X7受容体の機能的発現を認めた。アゴニスト感受性の違いからそれらの細胞には電気生理学的特性に差異がある可能性が考えられた。単一細胞に対する細胞膜伸展機械刺激法では、両細胞間に直接的な相互作用は認めなかった。P2X7受容体アゴニスト投与によって認めた2相性の内向き電流は、pannexin 1チャンネルによって放出された細胞外ATPによるものである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Functional expression of P2X7 receptor, which was one of the ionotropic P2X receptors, was observed in neurons and glial cells derived from rat trigeminal ganglion. Compared between P2X7 receptors in neurons and glial cells, electro-physiological properties of both cells was possibly different inferring from sensitivity of P2X7 agonists. Direct neuron-glia interaction in trigeminal ganglion was not observed by mechanical stimulation of single neuron or glial cell. Biphasic inward currents by administration of P2X7 receptor agonist may be elicited by extracellular ATP released via pannexin 1 channel.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：P2X7受容体 三叉神経 グリア細胞 pannexin 1チャンネル

1. 研究開始当初の背景

難治性の痛みを伴う病態の一つとして、神経因性疼痛がある。その発生や調節機構の一つとして、ATP を介した細胞間コミュニケーションがある。一次求心性神経におけるこれらの放出路やその分子実体についての詳細は未だ不明であり、ATP がどのような細胞間シグナル、また膜輸送機構を経て細胞外に放出されるかについては、結論付けられていない。

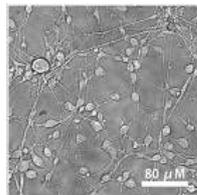
2. 研究の目的

三叉神経を用いて ATP 受容体 (特に P2X7 受容体) を介したニューロン - ニューロン相互作用、もしくはニューロン - グリア相互作用の特性について、各神経線維 (特に A ニューロン・C ニューロン (痛覚特異ニューロン)) を網羅的に検索することで、ATP を介した侵害受容機構を明らかにし、神経因性疼痛のメカニズムを解明する。

3. 研究の方法

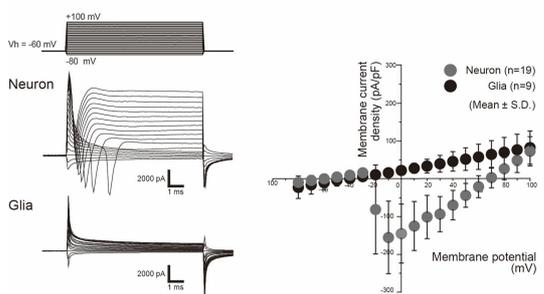
(1) 三叉神経節ニューロンおよびグリア細胞の初代培養:

本研究は東京歯科大学動物実験委員会の承認を得た (承認番号 292502)。ペントバルビタール麻酔下の新生仔 Wister ラット (6 - 7 日齢) より三叉神経節を左右両側より頭部脳底から急性単離する。三叉神経節はパパイン (20 U/ml) で酵素処理しながら機械的に単離する。培地には 10% fetal bovine serum, 1% penicillin - streptomycin, 1% fungizone, 26 mM NaHCO₃, 30 mM glucose (pH 7.4) 含有 Leibovitz 's L-15 を使用し、poly-L-lysine-coated 直径 35 mm culture dishes に播種し 48 時間培養を行う (37 °C 95% 空気, 5% CO₂ 設定インキュベーター)。培養細胞 (右図) には既に神経細胞とグリア細胞が共存しており、神経細胞 - グリア細胞共培養系が成立している。



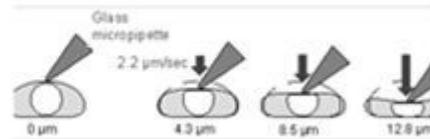
(2) 痛覚特異ニューロンとグリア細胞の同定:

Whole-cell patch clamp 法を用いて、Na⁺ 電流が発生した細胞を神経細胞、発生しなかった細胞をグリア細胞と同定した (下図)。



(3) 単一細胞に対する細胞膜伸展機械刺激法 (三叉神経ニューロンへの機械的加圧刺激モデル):

ニューロンあるいはグリア細胞の刺激によって生じる、その周囲に存在する三叉神経節ニューロンおよびグリア細胞の応答を記録する事でニューロン間、ニューロン - グリア間の細胞間ネットワークを明らかにする。そこで、三叉神経節ニューロンあるいはグリア細胞に、単一細胞加圧刺激を加える。Patch clamp 法で使用する三次元マニピレータ (手動式) およびガラス微細管を用いて単一細胞への直接機械刺激を行う (下図)。



(4) Whole-cell patch clamp 法:

ニューロン - ニューロン相互作用、もしくはニューロン - グリア相互作用の特性解明のため、細胞外および細胞内灌流法による patch clamp 法を用いて、細胞膜電流および活動電位を記録する。Whole-cell patch clamp 法は、細胞内液の入った微小ガラス管電極の先端を細胞に接触・密着を作り (ギガオームシール)、陰圧をかけることで細胞に穴をあける。細胞膜とガラス電極が一体となる (whole-cell) ことで細胞膜上の電流や電圧の総和を記録する方法である。

4. 研究成果

(1) 三叉神経節由来神経細胞・グリア細胞における P2X7 受容体の発現:

神経細胞とグリア細胞は P2X7 受容体アゴニストである 50 μM Bz-ATP により、2 相性の内向き電流を示した。神経細胞、グリア細胞ともに、50 μM Bz-ATP の連続投与で、その誘発電流密度は減少し、脱感作現象を示した。神経細胞における 100 μM Bz-ATP による内向き電流は、P2X7 受容体アンタゴニストである 6 μM A-740003 により有意に抑制された。

50 μM Bz-ATP による内向き電流の誘発電流密度と活性化時間は、1 回目の反応と 2 回目の反応ともに、グリア細胞で有意に大きい値を示した。

(2) 三叉神経節由来細胞のニューロン - ニューロン相互作用:

単一神経細胞に対して細胞膜伸展機械刺激法を用いて、近傍の神経細胞の膜電流を計測した。三叉神経節由来単一神経細胞への刺激は、近傍する神経細胞の膜電流に影響しなかった。

(3) Mefloquine による 2 相性内向き電流の抑制:

三叉神経節由神経細胞は 50 μM Bz-ATP に

より、2相性内向き電流を示した。この2回目の反応は Pannexin 1 チャネル阻害薬である 10 μM Mefloquineni により抑制された。

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 10件)

Kuroda H, Kawamura G, Soya M, Kitamura T, Ichinohe T, Yamada Y.

Impact of Epinephrine Contained in Local Anesthetic Solution on Serum Lactate Level during Orthognathic Surgery.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 75(8): 1637-1642, 2017. (査読アリ)

征矢学, 黒田英孝, 小松紀子, 細川瑠美子, 山田芳嗣, 一戸達也.

舌縮小術後に挿管管理を行った Beckwith-Wiedemann 症候群患児の1例. 日本歯科麻酔学会誌, 44(2): 165-167, 2016. (査読アリ)

小林紗矢香, 征矢学, 平田淳, 黒田英孝, 半田俊之, 一戸達也.

気管挿管時に気管内膨隆が認められた症例.

日本歯科麻酔学会誌, 44(2): 171-173, 2016. (査読アリ)

荻原有紀, 黒田英孝, 高橋香央里, 一戸達也.

高用量レミフェンタニル投与に伴って房室解離を生じた2症例.

日本歯科麻酔学会誌, 44(2): 192-194, 2016. (査読アリ)

江里口麻子, 一岡理華, 黒田英孝, 一戸達也.

McGRATHMMAC を用いて意識下挿管を行った病的肥満患者の1例.

日本歯科麻酔学会誌, 45(1): 38-40, 2017. (査読アリ)

佐藤彩乃, 黒田英孝, 一戸達也.

歯科恐怖症による心因性嘔吐・嘔気を伴う22q11.2欠損症候群患者に対する静脈内鎮静法の1例.

日本障害者歯科学会雑誌, 38(1): 53-57, 2017. (査読アリ)

星野立樹, 黒田英孝, 松浦信幸, 一戸達也.

顎下部皮弁剥離中に洞停止を生じた1例.

日本歯科麻酔学会誌, 45(2): 169-171, 2017. (査読アリ)

橘継国, 黒田英孝, 中山藍, 重藤玲子, 小林紗矢香, 征矢学, 松浦信幸, 一戸達也.

凝固第13因子欠乏症による術後出血の1例.

日本歯科麻酔学会誌, 45(2): 190-192,

2017. (査読アリ)

久木留宏和, 征矢学, 黒田英孝, 山田芳嗣, 一戸達也.

無症候性心筋虚血を合併した腹膜透析患者の舌癌に対する全身麻酔の1症例.

日本歯科麻酔学会雑誌, 45(2): 226-228, 2017. (査読アリ)

高野恵実, 黒田英孝, 川口潤, 松浦信幸, 一戸達也.

Le Fort 型骨切り術中に気管チューブのインフレーションラインを損傷した症例.

日本歯科麻酔学会雑誌, 46(1): 37-39, 2018. (査読アリ)

[学会発表](計 14件)

黒田英孝, 西山明宏, 半田俊之, 片倉朗, 一戸達也.

気管支ファイバースコープを用いて意識下挿管を行った下顎前歯部歯槽骨骨折手術の一例.

第18回日本口腔顎顔面外傷学会総会・学術大会, 平成28年7月31日, 東京都. 日本口腔顎顔面外傷学会誌, 15(1-2): 71, 2016.

黒田英孝, 辻野啓一郎, 一戸達也.

精神遅滞を伴った先天性爪肥厚症患児の全身麻酔経験.

第33回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 平成28年9月30-10月2日, さいたま市.

日本障害者歯科学会雑誌, 37(3): 305, 2016.

重藤玲子, 黒田英孝, 一戸達也.

ラット三叉神経節ニューロンにおけるブラジキニン B1 受容体の温度感受性の検索.

第44回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 平成28年10月28-30日, 札幌市. 日本歯科麻酔学会雑誌, 44(4): 569, 2016.

Kimura M, Sato M, Kojima Y, Higashikawa A, Shiozaki Y, Satou R, Shigefuji R, Shimada M, Kuroda H, Ogura K, Mochizuki H, Kouno K, Shibukawa Y, Tazaki M.

Alkali- and ADP-sensitive store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) mediated by Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ (CRAC) channels in rat odontoblasts. 第94回日本生理学会大会, 平成29年3月28-30日, 浜松市.

The Journal of Physiological Sciences, 67(supp.1): S98, 2017.

井上博之, 黒田英孝, 一岡理華, 木村麻記, 佐藤正樹, 澁川義幸, 田崎雅和, 一戸達也.

ラット三叉神経節細胞における P2X7 受容体の機能検索.

第303回東京歯科大学学会・例会, 平成

29年6月3日, 東京都.
歯科学報, 117(3): 256, 2017.
東川明日香, 小島佑貴, 寺島玲子, 井上博之, 河野恭祐, 安藤正之, 黒田英孝, 木村麻記, 澁川義幸, 田崎雅和.
Neural communication between Merkel cells and neurons.
第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 29 年 9 月 16-18 日, 塩尻市.
Journal of Oral Biosciences, Supplement 2017: 295, 2017.
井上博之, 黒田英孝, 石川昂, 木村麻記, 佐藤正樹, 澁川義幸, 田崎雅和, 一戸達也.
A search for expression of P2X7 receptors in rat trigeminal ganglions.
第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 29 年 9 月 16-18 日, 塩尻市.
Journal of Oral Biosciences, Supplement 2017: 307, 2017.
小島佑貴, 東川明日香, 大山定男, 河野恭祐, 安藤正之, 西幸一, 黒田英孝, 木村麻記, 澁川義幸, 田崎雅和.
Glial cells in rat trigeminal ganglion express delayed-rectifier K⁺ currents.
第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 29 年 9 月 16-18 日, 塩尻市.
Journal of Oral Biosciences, Supplement 2017: 308, 2017.
寺島玲子, 東川明日香, 小島佑貴, 井上博之, 川口綾, 黒田英孝, 木村麻記, 澁川義幸, 田崎雅和, 一戸達也.
Ca²⁺ mobilization via bradykinin B1 receptor activation in rat trigeminal ganglion neurons.
第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 平成 29 年 9 月 16-18 日, 塩尻市.
Journal of Oral Biosciences, Supplement 2017: 311, 2017.
黒田英孝, 井上博之, 重藤玲子, 東川明日香, 小島佑貴, 川口綾, 征矢学, 一戸達也.
ラット三叉神経節由来神経細胞・グリア細胞の P2X7 受容体の検索.
第 45 回日本歯科麻酔学会総会・学術集会, 平成 29 年 10 月 13-15 日, 松本市.
日本歯科麻酔学会雑誌, 45(4): 531, 2017.
黒田英孝, 高野恵実, 飯嶋和斗, 白澤里佳, 永井諭子, 征矢学, 川口潤, 井出智子, 松木由起子, 松浦信幸, 一戸達也.
帰宅後に悪心・嘔吐を生じた日帰り全身麻酔の 3 症例.
第 34 回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 平成 29 年 10 月 27-29 日, 福岡市.
日本障害者歯科学会雑誌, 38(3): 277,

2017.
井上博之, 黒田英孝, 石川昂, 木村麻記, 澁川義幸, 田崎雅和, 一戸達也.
ラット三叉神経節細胞における P2X7 受容体の電気生理学特性.
第 11 回三叉神経領域の感覚 - 運動統合機構研究会, 平成 29 年 12 月 2-3 日, 吹田市.
Kimura M, Higashikawa A, Kojima Y, Terashima R, Inoue H, Nagai S, Kamata S, Shimada M, Kuroda H, Ogura K, Mochizuki H, Kouno K, Ando M, Shibukawa Y, Tazaki M.
Odontoblasts express plasma membrane Ca²⁺-ATPase 1 and 4.
第 95 回日本生理学会大会, 平成 30 年 3 月 28-30 日, 高松市.
The Journal of Physiological Sciences, 68(supp.1): S149, 2018.
Inoue H, Kuroda H, Ishikawa N, Kimura M, Shibukawa Y, Tazaki M, Ichinohe T.
Comparison of electrophysiological properties of P2X7 receptors between neurons and glial cells in rat trigeminal ganglion.
第 95 回日本生理学会大会, 平成 30 年 3 月 28-30 日, 高松市.
The Journal of Physiological Sciences, 68(supp.1): S170, 2018.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 英孝 (KURODA, Hidetaka)
東京歯科大学・歯学部・講師
研究者番号: 9 0 7 5 5 0 1 8

(3) 連携研究者

一戸 達也 (ICHINOHE, Tatsuya)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 4 0 1 8 4 6 2 6

田崎 雅和 (TAZAKI, Masakazu)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 4 0 1 5 5 0 6 5

澁川 義幸 (SHIBUKAWA, Yoshiyuki)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 3 0 2 7 6 9 6 9

(4) 研究協力者

井上 博之 (INOUE, Hiroyuki)