

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目： 基盤研究(C)
 研究期間： 2007 ～ 2008
 課題番号： 19591824
 研究課題名(和文) GABAによる知覚神経節細胞体の興奮性修飾を介した痛み刺激伝達の抑制作用
 研究課題名(英文) Inhibitory effect of GABA in excitatory sensory ganglia.
 研究代表者
 早崎 華 (Hayasaki Hana)
 大阪医科大学・医学部・助教
 研究者番号： 90257866

研究成果の概要：

一次知覚神経の末梢からの興奮は細胞体を介さず、軸索を介しそのまま中枢側の終末に伝わり、シナプスの存在しない知覚性神経節では神経伝達制御に関与しないと考えられている。しかしパルス刺激により三叉神経細胞体でNa⁺の流入を認めた。このことは神経細胞体へも興奮伝導が伝わる可能性がある。また細胞外のCl⁻濃度を下げる事によりそのNa⁺の流入がほとんど無くなった。三叉神経節ではシナプスは存在しないが、細胞体周囲はsatellite cellによって取り囲まれている。細胞外ホメオスタシスはグリア細胞が担っており、ここ三叉神経節においても、グリア-ニューロン間でGABAを介した動的な神経伝達制御が行われていると考察する。またGABA_B受容体R1およびR2サブユニットが神経細胞体において発現していた。三叉神経節におけるGABA_B受容体R2の機能解析においてGABA_B受容体R2KOマウスではわずかなSP(i.v.)刺激においても硬膜血漿漏出を引き起こしたが、R2を三叉神経節で発現しているwild typeは硬膜血漿漏出を認めなかった。これらの結果はGABA_B受容体R2は片頭痛の病態である血管漏出を抑制することを示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	450,000	1,950,000
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：GABA, GABA_B受容体、知覚神経節、疼痛、パッチクランプ、satellite cell

1. 研究開始当初の背景

疾病による痛み、とりわけ末期がんの途切れ

る事の無い強い痛みは深刻である。このような痛みには麻薬でも抑えきれ無いケースがあり、神経を切断破壊するなどの対処法もあ

るが、運動麻痺などの合併症の危険性もあるため確立した対処法はいまだ無い。また入院するほどでなくても日頃、頭痛などの痛みで悩まされている人は多く、頭痛の日常生活へ及ぼす影響による損失は多大である。そのため痛みに関する研究は社会的にも必要性の高い研究であり、痛みのメカニズムを解明する基礎研究が国内外で進んでいる。本研究ではこの痛みとその抑制のメカニズムについて、末梢レベルの知覚神経節で解明する事を目的としている。

2. 研究の目的

知覚神経節は自律神経節を異なり神経細胞体にシナプスが存在せず、知覚神経節の神経伝達としての役割は未だ不明である。我々はこれまでの研究で抑制性の神経伝達物質である¹⁴C-GABA尾静脈投与のマウスにおいて三叉神経節と脊髄神経節に非常に強いGABAの取り込みが観察された(Autoradiographic distribution of radioactivity from ¹⁴C-GABA in the mouse Microsc. Res. Tech 2000 vol. 48 P116-126)。このことは知覚神経節でGABAを介した神経伝達の制御の可能性を強く示唆する。さらに末梢の知覚神経節は知覚伝導の際、その中枢側、末梢側の両側へ影響を与えうる中継点であり、そこでのGABAによる伝達制御のメカニズム解明は非常に興味深い。

これまでの我々の研究結果から、*in vitro*で次のことを明らかにした。知覚神経の細胞体周囲を取り囲むsatellite cellと知覚神経節細胞体にGABAが存在した。K⁺上昇が知覚神経節からのGABAの放出を促した。さらに神経細胞体膜でGABAによるCl⁻の流れを認めた。この結果から次の仮説を報告した。(Hayasaki *et al.* Eur J Neurosci. A local GABAergic system within rat trigeminal ganglion cells. 2006 ; 23(3):745-57, 科学研究費課題番号: 16790898) (以下図の説明) 知覚神経節に興奮が伝わった際、両細胞間のK⁺上昇する。K⁺上昇が引き金となり、satellite cellもしくは三叉神経細胞よりGABAの放出が放出される。神経細胞体膜表面に発現しているGABA_A受容体にGABAが作用し、神経の興奮に対し何らかの作用を及ぼすと考えられる。

以上これまで研究の結果からシナプスが存在しない知覚神経節における神経伝達制御にはGABAが重要な役割を担っている可能性が示唆された。

そこで我々は電気生理、免疫組織化学、薬理学、さらに*in vivo*レベルでGABAによる知覚神経節細胞体の痛みの抑制作用を本研究で解明する事を目的とした。

具体的には以下の事を明らかにすることを目的としている。

1) 末梢の知覚細胞体は興奮するのか。また細胞外Cl⁻濃度によってその興奮は変異するのか。

2) 三叉神経節における GABA_B 受容体の発現の検討

3) GABA_B 受容体R2 KOマウスを用いて、疼痛を病態とする片頭痛とGABA_B 受容体R2との関係の検討。

3. 研究の方法

1) ラット三叉神経節を patch clamp 法による Na⁺ current を測定。と細胞外 Cl⁻濃度による Na⁺ current の変位。

細胞外液 NaCl 145mM, KCl 5mM, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, HEPES 10mM, glucose 10mM, sucrose 20mM

Control として NaCl 145mM の代わりに NMDG-Cl 145mM を用いた。

細胞外の Cl⁻ 濃度の調製は NaCl の代わりに D-GLUCONIC-ACID sodium 145mM を用いた。

細胞内液 NaCl 10mM, KCl 140mM, MgCl₂ 1mM, Mg-ATP₂ 2mM, GTP-tris 0.1mM, EGTA 1mM, HEPES 10mM pulse protocol は-80mV-60mV

三叉神経細胞培養方法

動物 SD ラット 週齢 2~3 週を断頭後、三叉神経節を取り出し、トリプシン(1mg/ml)とコラゲナーゼ(2.8mg/ml) 32°C 60-70min 処理後、カバーガラスにて培養後 2 時間後に測定。

2) 三叉神経節における GABA_B 受容体の発現

用いた抗体: anti-GABA_B receptor R1 もしくは R2 polyclonal antibody

二次抗体として、Alexa 488 をラベルした蛍光免疫染色を行った。

ラット麻酔後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、30%スークロースを浸透後凍結切片を作成した。

3) GABA_B 受容体 R2 KO マウスを用いて、疼痛を病態とする片頭痛と GABA_B 受容体 R2 との関係の検討。

動物: KO マウス: BALB/c 系 GABA_B 受容体 (R2)-/-マウス

control群: Wild type: BALB/c 系 GABA_B受容体 (R2)+/ +マウス

硬膜血管炎性マウスの作成：

SP (i.v. 1.4 μ g/kg) 投与により硬膜血症漏出を惹起する。

硬膜血漿漏出評価：

SP (i.v. 1.4 μ g/kg) 投与後30分→ Evans blue dye (i.v. 50mg/kg) → 0.9% salineで灌流し、硬膜をアセトン：5%Na₂SO₄ in water=7:3の溶液にてホモジナイズ後12,000 r.p.m.にて遠心上清を吸光度計 (620 nm)にて測定

形態学的評価は共焦点レーザー顕微鏡による観察：

投与後30分→ Evans blue dye (i.v. 50mg/kg) → マウス屠殺後、硬膜の切片を作成し、レーザー顕微鏡にて観察

サブスタンスP (i.v. 1.4 μ g/kg) 投与後の三叉神経節におけるサブスタンスP (SP)の発現：

免疫染色法にて検討した。用いた一次抗体はAnti-SP、二次抗体はAnti-rabbit Alexa 488のいずれも polyclonal antibodyである。ラット麻酔後、4%パラホルムアルデヒドにて灌流固定後、30%スクロース浸透後凍結切片を作成した。

4. 研究成果

1) ラット三叉神経節を patch clamp 法による Na⁺ current を測定と細胞外 Cl⁻濃度による Na⁺ current の変位。

Fig.1 三叉神経節の Na⁺ current の測定。

Fig.1A は細胞外液に Na⁺を含む 1B は細胞外液に Na⁺を含まない control 群である。

Fig.1A に Na⁺ current が観察された。

このことより、三叉神経節細胞は神経細胞体に電位依存型 Na channel を発現していることが示唆される。

このことは、神経細胞体にも活動電位が発生する可能性を示唆する。

Fig.1 A 三叉神経節の current clamp による Na current の測定

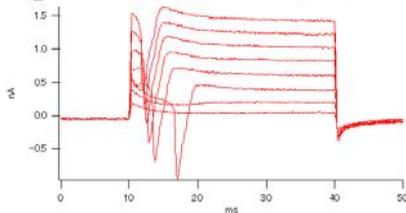


Fig.1 B

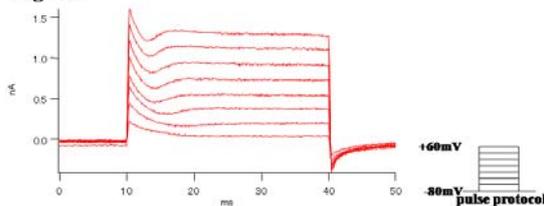


Fig.2 細胞外 Cl⁻濃度による Na⁺ current の変位。

Fig.2A は細胞外液 NaCl 145mM (control) で Na⁺ current が観察された。

Fig.2B 細胞外液を NaCl 145mM から D-GLUCONIC-ACID sodium 145mM に変更することにより Cl⁻濃度を低くした。その結果 Na⁺ current が control (Fig.2A) に比して小さくなった。従来の考えでは細胞内への Cl⁻流入による過分極が Na⁺による興奮を抑制すると言われている。しかし、今回の結果は細胞外の Cl⁻濃度が細胞の興奮の惹起 (Na⁺の流入) そのものに影響を与える可能性を示唆した。

三叉神経節細胞のWhole cell 電流への細胞外Cl⁻濃度の影

Fig.2 A

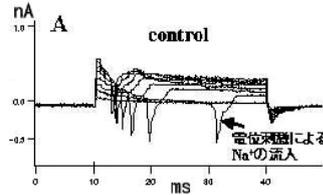
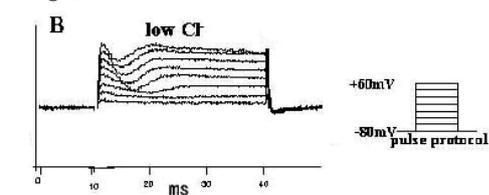


Fig.2 B



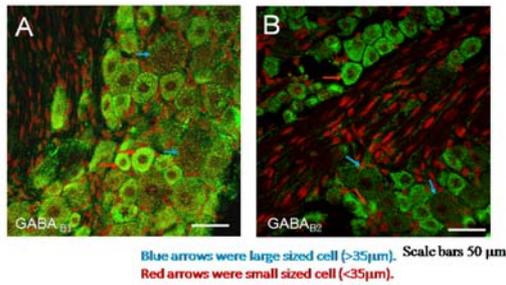
2) 免疫染色により三叉節細胞での GABA_B 受容体の発現を検討した。

GABA_B 受容体には R1 と R2 サブユニットが存在しており、その両サブユニットがヘテロダイマーを形成することにより機能的な GABA_B 受容体になるといわれる。

三叉神経節において R1 (Fig. 3A) と R2 (Fig. 3B) 両サブユニットが発現していた。矢印青で示す細胞は大型細胞で直径約 35 μ m 以上、矢印赤で示す細胞は直径約 35 μ m 以下。

両サブユニットとも大型と小型細胞両方陽性であったが、小型細胞の方が大型細胞に比して強い発現であった。小型の細胞は侵害受容に関与する細胞で知られており、このことから GABA_B 受容体は侵害受容情報伝達制御に関与する可能性が示唆された。

Fig. 3
三叉神経節におけるGABA_B 受容体の発現

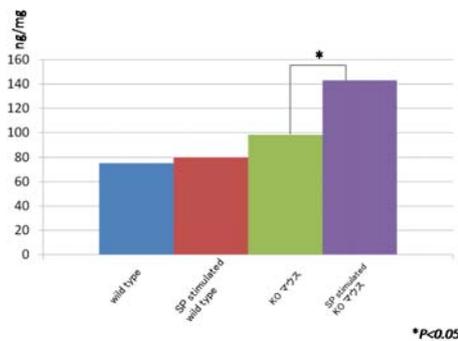


3) GABA_B 受容体 R2 KO マウスを用いて、疼痛を病態とする片頭痛と GABA_B 受容体 R2 との関係の検討。

Fig. 4 ラット硬膜における Evans blue 漏出量

Evans blue は血液中のアルブミンと強く結合することが知られている。SP (i. v.) による血漿漏出が惹起される場合、硬膜にある Evans blue 量を測定することにより血漿漏出の程度を評価することができる。その結果 Wild type は SP (i. v. 1.4 μg/k g) 投与と未投与の間に優位な差は無かった。それに対して GABA_B 受容体 R2 KO マウスでは SP (i. v. 1.4 μg/k g) 投与と未投与を比較した場合、投与群が硬膜における Evans blue 量が優位に高かった。

Fig. 4
ラット硬膜における Evans blue 漏出量



Evans blue 漏出量を共焦点レーザー顕微鏡にて評価した。

Fig. 5 A, B はその蛍光像である。

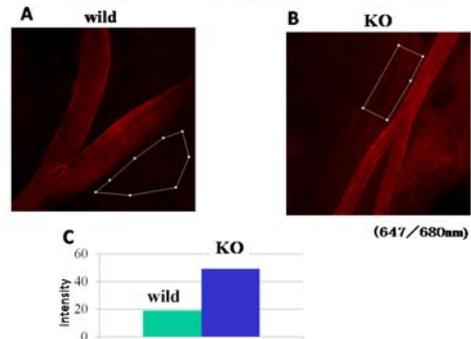
Evans blue は励起波長 647 nm、蛍光波長 680 nm であるため、硬膜に漏出がある場合血管周囲に 680 nm の蛍光波長にて観察することができる。血管の周囲に 680 nm の蛍光が観察された。

SP 投与 (i. v.) KO マウス (5B) は wild type (5A) に比し Evans blue 漏出が強い。

この蛍光強度を比較 (5C) すると約 2 倍 KO マウスが wild type に比して高い結果となった。この結果は Fig. 4 の結果と同じである。

SP (i. v. 1.4 μg/k g) は wild type は硬膜血漿漏出を引き起こさなかったが、KO マウスは硬膜血漿漏出が確認された。

Fig. 5
SP(i.v. 1.4μg/kg), Evans blue(i.v.) 投与後におけるラット硬膜

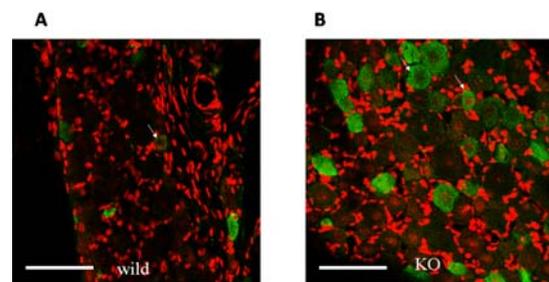


SP (i. v.) 投与後におけるラット三叉神経節での SP 発現

Fig. 6A, B はその蛍光像である。

SP (i. v.) 投与 wild type (6A) と GABA_B 受容体 R2 KO マウス (6B) の三叉神経節での SP 陽性細胞は明らかに、KO マウスの方が多。また発現している細胞は痛みに関与するといわれている小型 (35 μm 以下) であった。

Fig. 6
SP(i.v.) 投与後におけるラット三叉神経節での SP 発現



考察

一般的に一次知覚神経の末梢からの興奮は細胞体を介さず、軸索を介しそのまま中枢側の終末に伝わる。そのため神経細胞体そのものが *in vivo* で興奮するかは未だ明らかでなく仮説のままである。今回の結果で三叉神経細胞体に -80mV ~ 60mV のステップパルスを与えた時、Na⁺の流入を認めた。このことは神経細胞体が電氣的に興奮する可能性があることを確認した (Fig. 1)。また細胞外の Cl⁻濃度を下げる事によりその Na⁺の流入がほとんど無くなった (Fig. 2)。従来の考えでは細胞内への Cl⁻流入による過分極が Na⁺による興奮を

抑制すると言われている。しかし、今回の結果は細胞外のCl⁻濃度が細胞の興奮の惹起(Na⁺の流入)そのものに影響を与える可能性を示唆した。我々はこのCl⁻のホメオスタシスに水チャネルであるアクアポリンが関与していると考えている(H₂Oの変化は細胞内だけでなく細胞外物質のホメオスタシスを決定付ける)。一般的に神経細胞にはアクアポリンは発現しておらず、グリア細胞がアクアポリンを持つ。三叉神経節ではシナプスは存在しないが、細胞体周囲はグリア細胞

(satellite cell)によって取り囲まれている。グリア細胞も従来では神経細胞のメンテナンスや過剰な神経伝達物質の回収といった静的な働きしか知られていなかったが、近年になって、多種多様な神経伝達物質の受容体が発現していること、受容体へのリガンド結合を経てグリア細胞自身もイオンを放出するなど、これまで神経細胞のみが担うとされてきた動的な役割も果たしていることが次々に示されてきている。ここ三叉神経節においても、グリア-ニューロン間でGABAを介した動的な神経伝達制御が行われていると考察する。

またGABA_B受容体R1およびR2サブユニットが神経細胞体において発現していた。とくに中小型の細胞が強い発現を示した(侵害受容に関連していると言われている)。これらの結果からGABA_B受容体は三叉神経節において侵害刺激の制御に関与している可能性が示唆された。

SP (i.v. 1.4 μg/kg)ではwild typeの三叉神経節では中小型のSP陽性細胞がwild typeに比べて多かった。

KOマウスはGABA_B受容体R2が発現していないため、わずかなSP刺激においても三叉神経が活性化し、順行性刺激によって三叉神経節でのSP産生が活発化した可能性がある。SP産生の活発化は逆行性にも硬膜血漿漏出を促進する可能性がある。

これらの結果はGABA_B受容体R2は片頭痛の病態である血管漏出を抑制することを示唆する。

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 9件)

1) Marked regression of liver metastasis by combined therapy of ultrasound-mediated NF kappaB-decoy transfer and transportal injection of paclitaxel, in mouse. Azuma, H., Tomita,

N., Sakamoto, T., Kiyama, S., Inamoto, T., Takahara, K., Kotake, Y., Segawa, N., Morishita, R., Takahara, S., Hayasaki, H., Otsuki, Y., Horie, S., Tanigawa, N. and Katsuoka, Y. Int. J. Cancer 122: 1645-1656, 2008 (査読あり)

2) Constitutive activity of inwardly rectifying K⁺ channel at physiological [Ca]ⁱ is mediated by Ca²⁺/CaMK II pathway in opossum kidney proximal tubule cells. Mori, Y., Yoshida, H., Miyamoto, M., Sohma, Y. and Kubota, T. J. Physiol. Sci. 58:199-207, 2008 (査読あり)

3) Expression of GABAergic system in pulmonary neuroendocrine cells and airway epithelial cells in GAD67-GFP knock-in mice Y. Yabumoto, M. Watanabe, Y. Nakamura, Y. Ito, K. Maemura, Y. Yanagawa, K. Obata K. Watanabe, Y. Otsuki Med. Mol. Morphol. 41:20-27, 2008 (査読あり)

4) Proliferative effects of gamma-aminobutyric acid on the gastric cancer cell line are associated with extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation Maemura, K. Shiraishi, N. Sakagami, K. Kawakami, K. Inoue, T. Murano, M. Watanabe, M. Otsuki, Y. J Gastroenterol Hepatol. 2008 (査読あり)

5) Cells expressing GABA synthetic enzyme, glutamate decarboxylase, in stomach and intestine: RT-PCR and immunohistochemistry studies. Akamatsu, K., Nakamura, Y., Hayasaki, H., Kanbara, K., Maemura, K., Yanagawa, Y., Obata, K., Watanabe, M. and Ueno, H. J. Biol. Macromol. 7:55-62, 2007 (査読あり)

6) G551D and G1349D, two CF-associated mutations in the signature sequences of CFTR, exhibit distinct gating defects. Bompadre, S. G., Sohma, Y., Li, M. and Hwang, T.C. J. Gen. Physiol. 129:285-298, 2007 (査読あり)

7) Effects of γ-aminobutyric acid (GABA) on proliferation of the gastric cancer cell line, KatoIII. N. Shiraishi, K. Maemura, E. Umegaki, K. Kawakami, T. Takeuchi, K. Katsu M. Watanabe "Bull. Osaka Med. Coll. 53: 33-43, 2007 (査読あり)

8) Physiological role of L-type Ca²⁺

channels in marginal cells in the stria vascularis of guinea pigs. T. Inui, Y. Mori, M. Watanabe, A. Takamaki, J. Yamaji, Y. Shoma, R. Yosida, H. Takenaka, T. Kubota J. Physiol. Sci. 57: 287-298, 2007 (査読あり)

9) Invasive ability of human renal cell carcinoma cell line Caki-2 is accelerated by gamma-aminobutyric acid, via sustained activation of ERK1/2 inducible matrix metalloproteinases. T. Inamoto, H. Azuma, T. Sakamoto, S. Kiyama, T. Ubai, Y. Kotake, M. Watanabe, Y. Katsuoka Cancer Invest 25:574-583, 2007 (査読あり)

[学会発表] (計 4 件)

1) 第 114 回日本解剖学会
発表者: 早崎 華
2009 年 3 月 29 日
片頭痛と GABA
岡山理科大学

2) 第 31 回日本神経科化学大会
発表者: 早崎 華
2008 年 7 月 9 日
ラット三叉神経節における GABA 受容体の発現
東京国際フォーラム

3) 第 113 回日本解剖学会総会
発表者: 早崎 華
平成 20 年 3 月 27 日 (木) ~ 3 月 29 日 (土)
大分県由布市挾間町医大ヶ丘 1 丁目 1 番地
ラット三叉神経節 における GABA_b 受容体の
発現とその作用について
大分大学医学部

4) 第 50 回神経化学大会
発表者: 早崎 華
2007 年 9 月 10 日 (月) ~ 12 日 (水)
三叉神経節内での GABA を介した神経伝達機
構
パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早崎 華 (Hayasaki Hana)
大阪医科大学・医学部・助教
研究者番号: 90257866

(2) 研究分担者

相馬 義郎 (Sohma Yoshiro)
慶應義塾大学・医学部・准教授
研究者番号: 60268183

渡辺 正仁 (Watanabe Masahito)
大阪医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 70084902