

平成22年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19603015

研究課題名（和文） 三叉神経痛覚情報処理過程における抑制性ニューロンの機能的役割

研究課題名（英文） Functional role of inhibitory neurons in the signal processing of the trigeminal pain

研究代表者

桑名 俊一（KUWANA SHUN-ICHI）

植草学園大学・保健医療学部・教授

研究者番号：70129998

研究成果の概要（和文）：三叉神経脊髄路核内における痛覚情報処理過程を解明するため、抑制性神経伝達物質γアミノ酪酸（GABA）合成酵素（GAD67）遺伝子の代わりに緑色蛍光タンパク（GFP）遺伝子を組み込んだ新生マウス（GAD67-GFP ノックインマウス）の三叉神経付き脳幹スライス標本を作製した。三叉神経脊髄路核の GABA 性ニューロンは、三叉神経より興奮性入力を受け、同じ核内の非 GABA 性ニューロンの活動を抑制していた。さらに、三叉神経痛治療薬カルバマゼピンは、三叉神経核内の GABA 性ニューロンよりも非 GABA 性ニューロンへ強い抑制効果を示した。

研究成果の概要（英文）：We found that inhibitory GABAergic neurons in the trigeminal subnucleus caudalis (Sp5C) of GAD67-GFP knock-in mouse received exclusively excitatory postsynaptic inputs, and were characterized by multipolar-shaped somata. Furthermore, we showed that an analgesic action of carbamazepine resulted from the large depression of non-GABAergic neuron in the Sp5C compared with that of GABAergic neuron.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：三叉神経痛，三叉神経脊髄路核尾側亜核，遺伝子操作マウス，ガンマアミノ酪酸

## 1. 研究開始当初の背景

三叉神経は顔面の知覚を司る神経であるが、その領域に出現する頑固な疼痛は、特発性三叉神経痛、頭蓋内腫瘍、帯状疱疹後神経

痛、歯科口腔外科疾患などで見られ、慢性疼痛疾患の中でも比較的頻度の高い疾患である。その原因として、痛みを受容する中枢性三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)の二次ニ

ニューロンの可塑性が考えられている。さらに、慢性疼痛発症に GABA 性ならびにグリシン性ニューロンの抑制性ニューロンの関与も示唆されていたが、これらの抑制性ニューロンの役割を詳細に調べた研究はなされていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、膜電位イメージング法および遺伝子操作動物に電気生理学的手法を併せることにより、痛覚情報処理における Sp5C 内の神経回路網の応答、特に抑制性 GABA ニューロンの機能的役割および鎮痛剤の修飾効果を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 標本

GAD67-GFPノックイン新生マウスをエーテルで深麻酔し、尾のピンチ反応が消失したことを確認した後、脳幹・脊髄を摘出した(図 1 a)。さらに、脳幹の長軸方向の矢状面に沿って切断した三叉神経付き脳幹スライス標本(図 1 b)を作製し、酸素化人工脳脊髄液を満たしたチャンバー内で維持した。

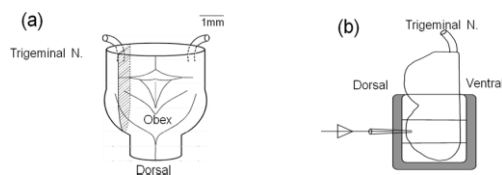


図 1. 標本

### (2) ホールセルパッチクランプ法

蛍光顕微鏡下で、Sp5C内のGFP陽性(GABA性)およびGFP陰性(非GABA性)ニューロンを同定した後、ガラス電極を用いてホールセルパッチクランプ法により、その活動を記録した。三叉神経根に電気刺激を与え、GABA性ニューロンおよび非GABA性ニューロンの応答を解析した。

### (3) 膜電位イメージング法

標本を膜電位感受性色素で染色した後、蛍光顕微鏡下の記録用チャンバー内に標本を固定した。三叉神経根の電気刺激を行い、特殊高速高感度光計測システムで蛍光変化を計測・記録した。

### (4) カルバマゼピンの影響

てんかん発作および三叉神経痛の治療に使用されるカルバマゼピン(CBZ)を入れた人工脳脊髄液で標本を灌流し、薬剤が神経興奮伝播過程に及ぼす影響をホールセルパッチクランプ法および膜電位イメージング法で解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 三叉神経核内における GABA 性ニューロンの分布

図 2 に示すように Sp5C には、GFP 陽性すなわち GABA 性ニューロンが多数存在していた。

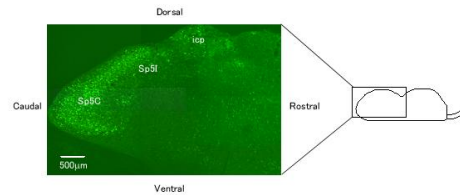


図 2. GABA 性ニューロンの分布

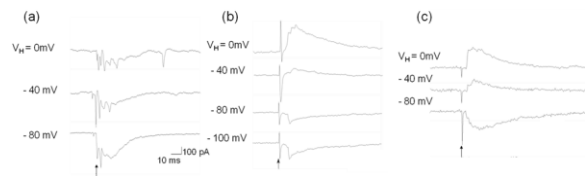


図 3. 三叉神経電気刺激に対するニューロンの応答

電圧固定状態で電気刺激(↑)を行い、シナプス電流を測定した。下向きの振れは興奮性シナプス電流(EPSC)を表し、電位を 0mV にした時に上向きに振れる電流は抑制性シナプス電流(IPSC)を表わす。

### (2) 三叉神経電気刺激に対する GABA 性および非 GABA 性ニューロンの応答

図 3 に示すように、Sp5C のニューロンは、電気刺激により興奮性シナプス入力(EPSC)だけを受けるもの(図 3 a)、抑制性シナプス入力(IPSC)だけを受けるもの(図 3 c)、両方の入力(EPSC と IPSC)を受けるもの(図 3 b)があった。Sp5C で記録した 51 個のニューロンを表 1 のようにシナプス入力によって分類した。GABA 性ニューロンは、主に興奮性のみの入力を受けるものが多かった。これに対し、非 GABA 性ニューロンは抑制性の入力を受けているものも多数存在していた。GABA 性と非 GABA 性ニューロンにおいては電気生理学的性質において差が見られなかった。

表 1. シナプス入力の種類

Neuron type	Synaptic input	n
GABAergic (n=20)	EPSC	17
	EPSC+IPSC	3
Non-GABAergic (n=31)	EPSC	18
	EPSC+IPSC	11
	IPSC	2

以上の結果から、Sp5C 内の GABA 性ニューロンと非 GABA 性ニューロンの結合、すなわち Sp5C 内の神経回路は、図 4 のように接続しているものと考えられた。

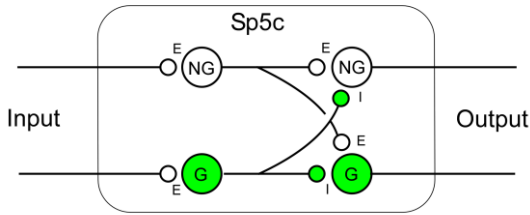


図4. 三叉神経脊髄路核尾側亜核内における神経回路  
G: GABA ニューロン, NG: 非 GABA 性ニューロン, E: 興奮性シナプス, I: 抑制性シナプス

### (3) GABA 性ニューロンおよび非 GABA 性ニューロンの形態

ホールセル記録用の電極に色素を入れ、ニューロンの形態を観察した。表2に示すように、GABA 性ニューロンは多極型細胞が多く、非 GABA 性ニューロンは双極型あるいは錐体型細胞であった。Sp5C 内ニューロンの細胞体の大きさは約  $10\mu\text{m} \times 14\mu\text{m}$  の大きさであり、ニューロン間での差は見られなかった。

表2. ニューロンの形態

Neuron type	Soma type	n
GABAergic (n=10)	Multiplolar	8
	Fusiform	2
Non-GABAergic (n=10)	Fusiform	5
	Pyramidal	5

### (4) カルバマゼピンの影響

#### ①膜電位イメージング法による観察

図5に示すように、三叉神経根の電気刺激後 10ms で Sp5C に強い蛍光、すなわち興奮が認められ、その後数百 ms 持続した。興奮が長期間持続する状態は central sensitization (中枢神経における痛覚増強) と考えられた。電気刺激によって誘発される Sp5C の興奮はカルバマゼピン (CBZ) の灌流中に著しく抑制された。

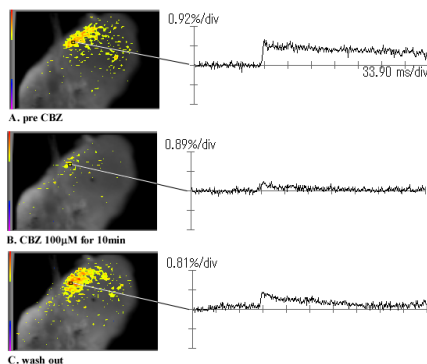


図5. カルバマゼピン (CBZ) の効果

CBZ の灌流中 (B パネル), 電気刺激によって誘発される興奮は空間的・時間的にも小さくなった。

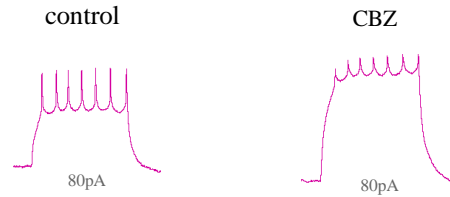


図6. 通電刺激に対する GABA 性ニューロンの応答強度 80pA, 持続時間 300ms の通電により活動電位が発生する。100 $\mu\text{M}$  CBZ の灌流により活動電位の数および振幅の減少がみられる。

### ②電気生理学的検討

図6に示すように通電刺激に対する Sp5C ニューロンの応答を CBZ 灌流前と灌流中で記録した。GABA 性ニューロンおよび非 GABA 性ニューロンの興奮は、CBZ の灌流で抑制された。しかしながら、非 GABA 性ニューロンの方がより抑制された (表3)。このことから、CBZ の鎮痛作用は Sp5C において抑制性ニューロンよりも興奮性ニューロンを強く抑制することで惹起されると考えられた。

表3. 通電刺激に対するスパイク数

Neuron type	Number of spikes	
	Control	CBZ
GABAergic (n=9)	$7.2 \pm 2.8$	$5.2 \pm 3.6$
Non-GABAergic (n=6)	$7.2 \pm 1.2$	$3.5 \pm 1.4$

### 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)

- ① Tsujita M, Sakuraba S, Kuribayashi J, Hosokawa Y, Hatori E, Okada Y, Kashiwagi M, Takeda J, Kuwana S. (2007) Antagonism of morphine-induced central respiratory depression by donepezil in the anesthetized rabbit. *Biological Research* 40(3):339-46, 査読有
- ② Kuribayashi J, Sakuraba S, Hosokawa Y, Hatori E, Tsujita M, Takeda J, Yanagawa Y, Obata K, Kuwana S. (2008) CO<sub>2</sub>-sensitivity of GABAergic neurons in the ventral medullary surface of GAD67-GFP knock-in neonatal mice. *Adv Exp Med Biol*. 605:338-42, 査読有.
- ③ Okada Y, Kuwana S, Masumiya H, Kimura N, Chen Z, Oku Y. (2008) Chemosensitive neuronal network organization in the ventral medulla analyzed by dynamic voltage-imaging. *Adv Exp Med Biol*. 605: 353-358, 査読有

- ④ Kuribayashi J, Sakuraba S, Kashiwagi M, Hatori E, Tsujita M, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana S. (2008) Neural mechanisms of sevoflurane-induced respiratory depression in newborn rats. *Anesthesiology*. 109(2):233-42, 査読有
- ⑤ Engelmann J, van den Burg E, Bacao J, de Ruijters M, Kuwana S, Sugawara Y, Grant K. (2008) Dendritic backpropagation and synaptic plasticity in the mormyrid electrosensory lobe. *J Physiol Paris*. 102(4-6):233-45, 査読有
- ⑥ 桑名俊一, 齋藤基一郎, 小池和子 (2009) 中枢性呼吸調節機構に対するニコチンおよびニコチン性アセチルコリン受容体拮抗剤の影響—新生ラットの単離脳幹脊髓標本を用いた研究— 植草学園大学紀要 1 : 29-35, 査読有.
- ⑦ Sakuraba S, Kuribayashi J, Tsujita M, Arisaka H, Takeda J, Yoshida K, and Kuwana S. (2009) Donepezil partially reverses buprenorphine-induced central respiratory depression in anesthetized rabbits. *Biological Research*, 42:469-475, 査読有.
- ⑧ Okada Y, Kuwana S, Chen Z, Ishiguro M, Oku, Y. (2009) The central respiratory chemoreceptor: Where is it located? *Adv Exp Med Biol.*, 648:377-385, 査読有.
- ⑨ Kuribayashi J, Kuwana S, Hosokawa Y, Hatori E, Takeda J. (2010) Effect of JM-1232(-), a new sedative on central respiratory activity in newborn rats. *Adv Exp Med Biol*. 669:115-118, 査読有.
- ⑩ Sakuraba S, Hosokawa Y, Kaku Y, Takeda J, and Kuwana S. (2010) Laudanosine has no effects on respiratory activity but induces non-respiratory excitement activity in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats. *Adv Exp Med Biol*. 669:177-180, 査読有.

[学会発表] (計7件)

- ① 原田尚子, 小山田吉孝, 桑名俊一, 中谷理恵, 刀川夏詩子, 本田岳夫, 仲嶋一範, 石坂彰敏: 新生ラット摘出脳幹—脊髓標本の呼吸関連ニューロンにおける TASK の分布の検討。第 47 回日本呼吸器学会総会, 東京, 5 月, 2007 年
- ② Kuribayashi J, Kuwana S, Sakuraba S., Hosokawa Y, Takeda J.: Neural mechanisms of sevoflurane-induced central respiratory depression in neonatal rats. American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2007. San Francisco, October 13, 2007.
- ③ 細川幸希, 栗林淳也, 辻田美紀, 武田純三, 柳川右千夫, 小幡邦彦, 桑名俊一: 三叉

神経脊髓路核における GABA 性ニューロンの特性: GAD67-GFP ノックインマウスを用いた研究。第 85 回日本生理学会大会, 東京, 3 月 2008 年

- ④ Kuribayashi J, Kuwana S, Hosokawa Y, Hatori E, Takeda J.: Effect of a new sedative, JM-1232(-) on central respiratory activity in neonatal rats. Annual meeting of the American Society of Anesthesiologists. Orland, USA 2008.
- ⑤ Sakuraba S, Hosokawa Y, Takeda J, Kuwana S. Laudanosine has no effects on respiratory activity but induces non-respiratory excitement activity in isolated brainstem-spinal cord preparation of neonatal rats. XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing. Nara, Japan, 2009.
- ⑥ Kuribayashi J, Kuwana S, Sakuraba S, Hosokawa Y, Takeda J.: Effect of a new sedative, JM-1232(-) on central respiratory activity in newborn rats. XIth Oxford Conference on Modeling and Control of Breathing. Nara, Japan, 2009.
- ⑦ Kuwana S, Hosokawa Y, Kuribayashi J, Sakuraba S, Yanagawa Y, and Obata K.: Effect of carbamazepine on activities of GABAergic and non-GABAergic neurons in the mouse trigeminal nucleus caudalis. The 36<sup>th</sup> Congress of the International Union of Physiological Science. Kyoto, Japan, 2009.

[図書] (計1件)

- ① からだと酸素の事典. 酸素ダイナミクス研究会編, 田村守, 桑名俊一他117名著, 朝倉書店, 2009.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

桑名 俊一 (KUWANA SHUN-ICHI)  
植草学園大学・保健医療学部・教授  
研究者番号: 70129998

### (2) 研究分担者

細川 幸希 (HOSOKAWA YUKI)  
慶應義塾大学・医学部・助手  
研究者番号: 00348765  
(H19→H20: 連携研究者)