

平成22年4月28日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19791058
 研究課題名（和文） 痛覚情報伝達における抑制シナプスと脱抑制の関与：遺伝子改変マウスを用いた総合解析

研究課題名（英文） Analysis of the functional contribution of inhibitoru neuron and disinhibition in nociceptive processing: using genetically modified mice

研究代表者

麻生 知寿 (ASO CHIZU)
 群馬大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号：40436308

研究成果の概要（和文）：

GABA 合成酵素が抑制された遺伝子改変マウス（以下 GAD65^{-/-}-mouse）を用いて、疼痛に対する逃避行動と抑制性シナプスにおけるシナプス後電位の解析を行った。GAD65^{-/-}-mouse では野生型マウスでは、脊髄を介する逃避行動に差はみられなかったが、上位中枢を介する逃避行動に差があった。また、抑制シナプス後電位の解析では、GAD65^{-/-}-mouse で有意な tonic inhibition の減弱が認められた。これらのことから、上位中枢を介する侵害受容反応には GABA 合成が重要な役割を果たしていると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

This study tested whether partial reductions in GABAergic inhibitory tone by GAD65 gene knockout [GAD65^{-/-}] would contribute to the regulation of pain threshold in mice. In the hot plate test, which reflects supraspinal sensory integration, a significant reduction in the latency was observed for GAD65^{-/-} mice. In the hot plate test, which reflects supraspinal sensory integration, a significant reduction in the latency was observed for GAD65^{-/-} mice. We also measured GABA(A) receptor-mediated inhibitory postsynaptic currents in GAD65^{-/-} mice and wild-type (WT) mice. Although properties of the phasic component of inhibitory postsynaptic currents were similar in both genotypes, tonic inhibition was significantly reduced in GAD65^{-/-} mice. These results support the hypothesis that GAD65-mediated GABA synthesis plays significant roles in nociceptive processing via supraspinal mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,300,000	0	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	480,000	3,380,000

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：疼痛治療学

1. 研究開始当初の背景

近年、麻酔科学分野において、遺伝

子改変マウスを用いた麻酔薬の分子・シナプス・個体レベルでの作用に関する研究が注目されている。この研究では、中枢神経系の抑制性神経回路における重要な伝達物質の一つである γ -aminobutyric acid (GABA)を合成する酵素、グルタミン酸デカルボキシラーゼ (glutamate decarboxylase: GAD)の遺伝子を操作し、発現を抑えたGAD65ノックアウトマウスを用いて(群馬大学遺伝・発達・行動学研究室柳川教授より提供)、麻酔・鎮痛薬の疼痛情報伝達への修飾作用がGABA releaseに及ぼす影響を解析した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、GABAの合成が抑制されたマウスにおいて、行動・電気生理学的手法を用いて、痛覚情報伝達におけるGABAの役割(脱抑制)と、シナプス修飾作用における前終末からのGABA releaseの関与について明らかにすることである。

<GABA作動性の抑制シナプスを研究対象とした理由>

GABA (γ -amino butyric acid)受容体チャネルは、中枢神経系に存在するCl⁻チャネルの1種で抑制系神経伝達の中心を担っている。神経伝達物質であるGABAがGABA受容体に結合して活性化すると、Cl⁻の細胞内流入が亢進し、IPSP (inhibitory postsynaptic potential: 抑制性シナプス後電位)が生じる。これまでの分子生物学的研究から、GABA(A)受容体は5つのサブユニットから構成され、それぞれのサブユニットが4つの疎水性膜貫通領域 (transmembrane segment, TM)を持つと予想される。N末端から2番目の膜貫通領域 (TM 2)のアミノ酸の一部はCl⁻イオン通過路(ポア)の形成に関与すると考えられる。これまでに少なくとも16のサブユニットをコードする遺伝子がクローニングされ、さ

らに幾つかのサブファミリー (α_{1-6} , β_{1-4} , γ_{1-4} , δ , ϵ , and π)に分類されている。GABA(A)受容体は、麻酔薬など多くの神経作用薬で修飾されることが知られおり、脳内の抑制系神経伝達における主要な役割を担っていることから、今回の研究ではGABA受容体作動性抑制シナプスを対象とした。

<GABA受容体に関するこれまでの研究業績>

群馬大学麻酔神経科学講座では、以下のような研究実績がある。特にGABA(A)受容体の構造と機能、麻酔薬による神経修飾、吸入麻酔薬の効果がなくなる点変異導入

GABA(A)受容体への麻酔薬の作用、さらに点変異導入GABA(A)受容体を発現させた遺伝子変換マウスの行動学的・電気生理学的解析などを行ってきた。その結果、吸入麻酔薬は



GABA(A)受容体の α サブユニットの2番目の膜貫通領域に存在するアミノ酸(Ser270)に結合することが判明した。一方、プロポフォールはGABA(A)受容体 β サブユニット(Met286)に作用することがわかり、分子レベルでの作用部位は異なることが結論された。これらの結果は新しい麻酔・鎮静薬の開発に重要な知見で、当研究グループから以下の原著論文で発表されている。また、今回の研究課題とも直接関連する分野である。

3. 研究の方法

(1) 行動実験

GABA releaseの低下が予想される生後12週以降のオスを対象とする

疼痛刺激への反応の違いの評価

急性侵害刺激(熱刺激)に対する疼痛行動反応の違いをwild typeと比較する。

(逃避の潜伏時間:52度のhotplateの上で後肢をなめるまでの時間を測定する)

この反応に差があれば、炎症性疼痛(ホ

ルマリンやカラニゲン刺激)や神経因性疼痛への反応の違いも測定する。

(2) 海馬シナプス電気生理実験

ラット脳スライス標本の作製方法：成熟ラットを十分に麻酔した後に断頭してすばやく脳を摘出し、厚さ500 μm のスライスを作成し、十分に酸素化した還流液の中で記録まで少なくとも1時間回復させる。海馬CA1領域の錐体細胞からの赤外線顕微鏡下に直接細胞の形態を観察しながら、CA1領域の錐体細胞からホールセルパッチを行う。また錐体細胞は層上に多くの細胞が集まっているために、この記録は実体顕微鏡を使って盲目的にアプローチすることが可能である。

(海馬パッチクランプ記録、右下図、Nishikawa K et al. Journal of Neuroscience 2000)。

CA3-CA1シナプスでのLTPの誘導

このシナプスはグルタミン酸作動性の興奮性入力が豊富であることから、シナプスの可塑的变化を観察する実験で頻用されている。CA3領域細胞の軸索 (Schaffer側枝) を刺激電極で刺激して、細胞外記録法を用いて興奮性シナプス電圧 (field EPSP) を記録する。0.1Hzのテスト刺激に対する反応を調べてその振幅 (あるいは傾き) の変化率を経時的に測定するが、この間に条件刺激 (100Hz) を行うと、その後は持続的にシナプス電位の振幅が長時間にわたって上昇する。条件刺激の前・後にそれぞれ揮発性麻酔薬 (20分間) を投与しLTP誘導率と振幅に対する影響を調べる。

シナプス伝達効率に変化が見られたら、次にこの変化がシナプス前性 (伝達物質放出量) の変化なのか、シナプス後性 (伝達物質に対する反応性) の変化なのかを区別するために、2回連続刺激によるEPSP増大率 (paired-pulse facilitation: PPF) を測

定する。海馬Schaffer側枝の刺激では、2回目の刺激反応では1回目よりも20-30%ほど大きな振幅が観察されるが、この増大率に変化が見られた場合は、シナプス前性の変化とされる。

パッチクランプ法が神経科学研究分野において応用されてきたが、この技法は培養細胞、単離細胞や神経スライス標本など、その対象が*in vitro*標本に限定されてきた。しかし最近、*in vivo*ホールアニマルでの脳や脊髄の神経細胞からのパッチクランプ法が可能になり、当研究グループでは現在もこの手法の確立に取り組んでいる。

4. 研究成果

行動実験の結果、Hot-plate上での逃避反応時間は、GAD65^{-/-} mouseでWTより有意に短縮しており、侵害受容反応において野生型と差が見られた ($P < 0.01$)。しかし、water immersion testでは、この有意差はなかった。また、行動実験前にGABA transporter 1 inhibitor, 1-[2-[(diphenylmethylene) imino]oxy] ethyl]-1,2,5,6-tetrahydro-3-pyridinecarboxylic acidhydrochloride (C₂₁H₂₂N₂O₃·HCl; NO-711),を腹腔内投与しておくGAD65^{-/-} mouse、WTともに逃避反応時間が延長した。

電気生理実験では、ホールセルパッチクランプ法を用いて抑制性シナプス後電位の測定を行ったところ、GAD65^{-/-} mouseとWTで、phasic componentでは大きな差はなかったが、tonic inhibitionはGAD65^{-/-} mouseで減弱していた。

Hot-plate上での逃避反応は上位中枢を介する反応を反映することから、中枢性の疼痛逃避反応がGABA合成により影響を受けることがわかった。一方、water immersion testにおける逃避行動は脊髄を介するものであるため、脊髄性の疼痛逃避反応にGABAの及ぼす影響は少ないと考えられる。

また、GAD65^{-/-} mouseでtonic inhibitionの減弱が認められたことから、中枢性の逃避反応にはシナプス外のGABA受容体の関与している可能性が示唆された。

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 6 件)

1) 麻生知寿、齋藤繁

血行障害によるいたみ

災害・整形外科 vol.52, No.52, 469-477, 2009
査読無

2) Kubo K, Nishikawa K, Ishizeki J, Hardy-Yamada M, Yanagawa Y, Saito S. Thermal hyperalgesia via supraspinal mechanisms in mice lacking glutamate decarboxylase 65.

J Pharmacol Exp Ther. 2009 Oct;331(1):162-9. Epub 2009 Jul 1. 査読有

3) Kuroda M, Matsuoka H, Aso C, Iriuchijima N, Miyoshi S, Kadoi Y, Saito S.

Transesophageal echocardiography is useful for an intraoperative diagnosis of pulmonary artery catheter entrapment. Anesthesia & Analgesia. 109. 1416-8. 2009. 査読有

4) Kubo K, Nishikawa K, Hardy-Yamada M, Ishizeki J, Yanagawa Y, Saito S. Altered responses to propofol, but not ketamine, in mice deficient in the 65-kilodalton isoform of glutamate decarboxylase. J Pharmacol Exp Ther. 2009 May;329(2):592-9. Epub 2009 Feb 20. 査読有

5) Sakaue H, Suto T, Kimura M, Narahara S, Sato T, Tobe M, Aso C, Kakinuma T, Hardy-Yamada M, Saito S.

Oxygen inhalation using an oxygen concentrator in a low-pressure environment outside of a hospital. Am J Emerg Med. 2008 Nov;26(9):981-4. 査読有

6) Ishizeki J, Nishikawa K, Kubo K, Saito S, Goto F

Amnestic concentrations of sevo-flurane inhibit synaptic plasticity of hippocampal CA1 neurons through GABAergic mechanisms.

Anesthesiology. 2008, Mar; 108(3):447-56. 査読有

[学会発表] (計 1 件)

1) Nishikawa K, Kubo K, Yamada M, Ishizeki J, Saito S, Goto F

Altered thermal nociceptive responses in glutamic acid decarboxylase (GAD) 65 deficient mice.

American Society of Anesthesiologists

meeting 2008, March 28 2008, San Francisco, USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

麻生 知寿 (ASO CHIZU)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：40436308

(2) 研究分担者

西川光一 (NISHIKAWA KOUICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：00334110

(3) 連携研究者

()

研究者番号：