

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：	34401
研究種目：	基盤研究(C)
研究期間：	2009～2011
課題番号：	21591990
研究課題名（和文）	局所的 GABA システム仮説に立脚した三叉神経痛発生メカニズムへのアプローチ
研究課題名（英文）	The approach to a trigeminal neuralgia mechanism based on a local GABA system hypothesis
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（和文）：

三叉神経節での細胞外 GABA リリースをイメージングすることにより satellite cell -神経細胞の神経伝達制御の可能性を検討した。

その結果、分散培養下でニューロンと SG の両方から GABA が放出されており、GAT 阻害剤（nipecotic acid）によりニューロンからの GABA リリースが阻害され、アニオンチャネル阻害剤（DNDS）により SG からの GABA リリースが阻害された。また三叉神経節組織においても神経周囲からの GABA リリースが確認された。

これらの結果は三叉神経節における GABA を介した神経伝達制御の存在を示唆する。

研究成果の概要（英文）：

We investigated possibility of the neural transmission regulation of the SC - nerve cell by imaging of extracellular GABA release at the trigeminal ganglion.

As a result, GABA was released both from neuron and SG on dispersion culture, and the GABA release of neuron was inhibited by GAT inhibitor (nipecotic acid), and GABA release of SG was inhibited by anion channel inhibitor (DNDS).

Also, on the trigeminal ganglion tissue, GABA release from the neuron surroundings was observed. These results suggest presence of the neural transmission regulation via GABA at the trigeminal ganglion.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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, 三叉神経節、satellite cell

1. 研究開始当初の背景

現在の臨床において、痛覚過敏（軽い痛刺激をより強い痛み刺激と感じる症状）やアデロニア（本来痛みを引き起こさない触覚刺激によって発生する痛み）、非ステロイド抗炎症薬（NSAID）や麻薬性鎮痛薬が効きにくく有効な治療法が確立されていない事実は、神経因性疼痛メカニズムに関する現在の常識の限界を示すとともに、従来型の発想の展開ではなく、全く異なる発想でメカニズムを考える必要性を訴えている。

我々はこの痛みのメカニズム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細胞で解明する事を目的としている。知覚神経節は自律神経節と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。しかし我々の過去の研究で抑制性の神経伝達物質である ^{14}C -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。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が強く示唆する。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。

2. 研究の目的

シナプスが存在しない三叉神経節（TG）内における抑制性神経伝達物質 GABA の生理的役割はよく解っていない。我々は、これまで三叉神経節の神経細胞体（NC）とサテライト細胞（SC）に GABA が存在し、分散培養の神経細胞体では GABA 受容体が機

能発現していることを報告し、三叉神経節内における NC-SC 間の GABA を介した神経伝達制御機構の存在の可能性を報告した。今回、GABA 介在性神経伝達制御明らかにする目的で、画像解析と免疫染色法にて三叉神経節での細胞外 GABA の放出の可能性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 三叉神経節組織に Ca^{2+} 感受性蛍光色素の fluo-4 による Ca^{2+} イメージングを行い電位依存的な Ca^{2+} を誘発することを証明する。関連蛋白の発現は蛍光免疫染色法と Western 法、関連蛋白の mRNA の発現は RT-PCR 方にて検討した。

(2) 神経節での GABA 放出を GABAase (GABA の特異的分解酵素)と NADP の酵素反応を用いることによりイメージング化する。(図 1 参照)

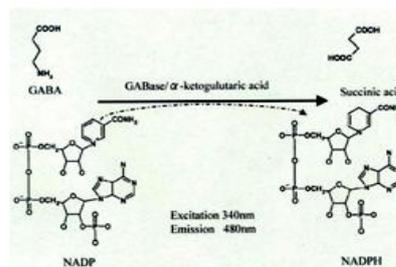


図 1

GABAase は放出された細胞外の GABA を酸化し NADPH を形成する、GABA 1 分子で NADPH が 1 分子形成される。NADPH の励起波長は 340nm で蛍光波長は 480nm である。この方法を用いると放出された GABA は細胞内の GABA と混同されずに検出することが可能である。これをイメージングするシステムは図 2 参照。

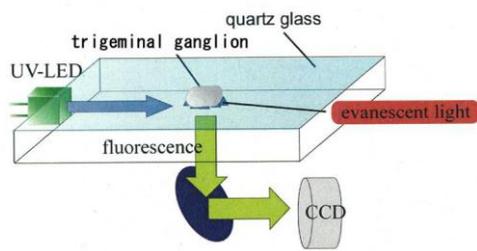


図 2

4. 研究成果

結果：（1）末梢刺激興奮による三叉神経節細胞の活動電位のイメージングと Na channel の発現について検討した。

三叉神経節組織に Ca²⁺感受性蛍光色素を導入し、Ca²⁺イメージングを行い電位依存的な Ca²⁺を誘発した。また、電位依存的な Nav1.1 と Nav1.8 の発現を免疫染色学的に確認した。その発現は神経細胞によって異なっており、三叉神経節神経細胞の機能は一樣ではないと推測される。

またパッチクランプ法においても、三叉神経細胞のスパイクが確認された。

そのスパイクは GABAB 受容体のアゴニストである baclofen で増減し、その作用は GABAB 受容体のアンタゴニストで抑制された。

また、三叉神経節組織での神経細胞膜上に GABAB 受容体が発現している事を免疫組織学的に明らかにした。これらの結果は、末梢での刺激が三叉神経節に伝わり、三叉神経節で GABA が放出され、細胞膜上に発現している GABA 受容体に作用する可能性を示唆する。

（2）スライスされた TG 組織において、NC 周囲に持続的な GABA 放出が観察された。この自発的 GABA 放出は、細胞外高 K⁺ 条件およびアニオンチャネル阻害剤 (DNDS) それぞれ単独投与によって増加

したが、興味深いことに高 K⁺ 刺激により増加した GABA 放出は DNDS 投与することにより抑制された。また、細胞外の低 Ca²⁺状態は GABA 放出に影響を与えなかった。

GABA free における分散培養 24 時間後の TG においては、NC からの GABA 放出は認められたが、SC からの GABA 放出は観察できなかった。しかしながら、100 μM GABA 添加 1 時間後においては、NC のみならず SC からも GABA 放出が観察された。このとき、NC からの GABA 放出は、DNDS では抑制されず、GABA 輸送体 (GAT) 阻害剤 (ニペコ酸) によって抑制された。一方、SC からの GABA 放出はニペコ酸で抑制されず、DNDS によって抑制された。

これらの結果から、神経細胞体は GAT を介して GABA を放出し、サテライト細胞はアニオンチャネルを介して GABA の可逆的な取り込み・放出を行なっていると考えられた。我々は、三叉神経節内において局所的な GABA 作動性システムが神経細胞体とサテライト細胞の間に形成されて、神経伝達に重要な役割を果たしていると推測している。

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 19 件)

① Kuwabara H, Yoneda M, Hayasaki H, Nakamura T, Shibayama Y. A hyaluronan synthase suppressor, 4-methylumbelliferone, inhibits the tumor invasion associated with N-cadherin decreasement Pathol Int. 査読有 2011 Apr;61(4):262-3. doi: 10.1111/j.1440-1827.2011.02660.x.

②Shimizu-Okabe, C., Tanaka, M., Matsuda, K., Mihara, T., Okabe, A., Sato, K., Inoue, Y., Fujiwara, T., Yagi, K., Fukuda, A. KCC2 was downregulated in small neurons localized in epileptogenic human focal cortical dysplasia. *Epilepsy Res.* 査読有93: 177-184, 2011.

③Uchida, T., Oki, Y., Yanagawa, Y. and Fukuda A. A heterozygous deletion in the glutamate decarboxylase 67 gene enhances maternal and fetal stress vulnerability. *Neurosci. Res.* 査読有69: 276-282, 2011.

④Yu YC, Miki H, Nakamura Y, Hanyuda A, Matsuzaki Y, Abe Y, Yasui M, Tanaka K, Hwang TC, Bompadre SB, *Sohma Y (2011) Curcumin and genistein additively potentiate G551D-CFTR. *J. Cystic Fibrosis.* 査読有10: 243 – 252

⑤Shimizu H, Yu YC, Kono K, Kubota T, Yasui M, Li M, Hwang TC, *Sohma Y (2010) A stable ATP binding to nucleotide binding domain is important for reliable gating cycle in an ABC transporter CFTR. *J. Physiol. Sci.* 60: 353–362 査読有

[学会発表] (計 5 件)

①早崎 華、GABA handling system in the rat trigeminal ganglion、第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、平成 24 年 3 月 27 日 (水)、山梨大学

②早崎 華、An immunocytochemical study for the local GABAergic system in rat trigeminal ganglion. 第 34 回日本神経科学大会、平成 23 年 9 月 16 日 (金)、パシフィコ横浜

[図書] (計 1 件)

①渡辺正仁、小西正良、杉本雅晴、西村敦、柴田雅朗、伊藤裕子、早崎華、金山忠志、廣川書店、2010、396 ページ

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

福田 敦夫 (Fukuda Atsuo)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50254272