

## 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5月21日現在

機関番号： 63905

研究種目： 基盤研究（C）

研究期間： 2009 ～ 2011

課題番号： 21600019

研究課題名（和文） 小胞型抑制性アミノ酸運搬体とGABA合成酵素の共役とその慢性疼痛による変化の解析

研究課題名（英文） Functional coupling between GABA synthetic enzyme and vesicular GABA transporter and its modulation by persistent pain

研究代表者

石橋 仁（ISHIBASHI HITOSHI）

生理学研究所・発達生理学研究室・准教授

研究者番号： 50311874

研究成果の概要（和文）：本研究は、脊髄抑制性シナプス前神経終末部の小胞型抑制性アミノ酸運搬体（VIAAT）とグルタミン酸を基質にGABAを生成する酵素（GAD）に着目して、これらの機能共役の機構を解析し、その生理学的意義を明らかにするとともに、慢性疼痛時の変化を考察することを目的とした。慢性疼痛時には脊髄への感覚入力が高まって脊髄でのグルタミン酸放出が増えると考えられるが、細胞外のグルタミン酸は、抑制性神経終末部にに取り込まれてGADとVIAATの共役によりシナプス小胞のGABA濃度を増加させ、グリシン濃度を低下させることがわかった。また、神経回路活動が活発になることによりGADとVIAATの共役は強化され、一方、神経回路活動が抑制されるとGADの発現が弱まることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to determine the regulatory mechanisms underlying functional coupling between GABA synthetic enzyme (GAD) and vesicular inhibitory amino acid transporter (VIAAT), and its modulation under persistent pain conditions. For this purpose, we analyzed the spinal inhibitory transmission using paired whole-cell recordings. Glutamatergic inputs onto spinal neurons are thought to be increased under persistent pain conditions. Application of glutamate markedly increased the GABAergic component of inhibitory transmission. On the other hand, glutamate reduced glycinergic component of IPSC. The results suggest the increase in GABAergic component is due to the functional coupling between GAD and VIAAT. The inhibition of neuronal activity reduced the coupling. The present results suggest that the GABA/glycinergic inhibitory transmission is dynamic, and may be able to easily change the component in response to changes in network activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード： GABA, glycine, glutamate,

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、体性感覚の伝達経路に可塑的变化が生じることにより発生していると考えられており、その可塑的な変化は末梢の感覚神経系だけでなく、中枢神経系でも起きていることが示唆されている (Campbell ら、Neuron 52:77, 2006; Zhou ら J Neurosci 28, 7445-53, 2008 など)。脊髄の抑制性シナプス伝達を担う神経伝達物質の一つである GABA の慢性疼痛による変化に関しても、これまでにいくつかのグループが検討を行っている。しかし、慢性疼痛モデル動物の脊髄で、GABA が増加するという報告と GABA が減少するという報告の両者があり、議論が分かれていた (Kontinen ら、Anesthesiology 94:333, 2001; Lee ら、Neuroscience 158:904-914, 2009 など)。一方、慢性疼痛による抑制性シナプスの機能的な変化として、慢性疼痛により脊髄ニューロンの細胞内 Cl<sup>-</sup> 濃度が上昇して抑制性シナプス後電位 (IPSP) を減少させるという報告がなされている (Coull ら、Nature 438:1017, 2005)。しかし、GABA には膜電位に対する効果だけでなく、シャント効果 (チャネルが開くこと自体で膜抵抗が減少して脱分極電位の伝導を抑制する効果) や代謝型 GABA(B) 受容体を介した作用があり、これらの作用を介して痛みの伝達を抑制し得ることから、抑制性シナプスにおいて GABA 自体の放出機構やもう一つの伝達物質であるグリシンの放出機構が慢性疼痛によりどの様に変化しているかを明らかにすることは重要であり早期に解決されるべき課題と考えられる。

GABA とグリシンは、共に小胞型抑制性アミノ酸運搬体 (VIAAT) によってシナプス小胞に取り込まれ、活動電位に伴う Ca<sup>2+</sup> 流入がトリガーとなり、開口放出によって両伝達物質は同時に放出される。脊髄抑制性神経終末部には VIAAT 以外に、グルタミン酸を基質に GABA を生成する酵素 (GAD)、細胞外から GABA を取り込む GABA 運搬体 (GAT)、グリシンを取り込むグリシン運搬体 (GlyT) とグルタミン酸を取り込むグルタミン酸運搬体 (EAAC) などが存在する。しかし、これらがどの様に機能してシナプス小胞内の GABA およびグリシンの量を制御しているかはこれまでほとんど明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本申請研究では、脊髄抑制性シナプス前神

経終末部の VIAAT と GAD の機能共役に着目して、そのメカニズムを解明するとともに、慢性疼痛時の変化について考察することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本申請研究は、これまで我々のグループで実績のある電気生理学 (パッチクランプ法、細胞内灌流法) の手法を主に用いて、脊髄抑制性シナプス伝達の解析によって、GAD と VIAAT の機能共役という点に焦点をあてて、そのメカニズムを解明することを目的としている。そのため、本研究では、まず、抑制性ニューロンに GFP が発現した遺伝子改変ラットから脊髄培養細胞を作成し、抑制性のシナプス前ニューロンとシナプス後ニューロンの両者に従来型のホールセルパッチ法を適用し、シナプス前細胞の短時間の脱分極によって惹起される抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録した。一部の実験では、ラット海馬から作成した培養細胞も用いた。薬液の投与は Y チューブ法により行った。

また、ラット脊髄よりスライス標本を作成し、スライスパッチクランプ法を用いて IPSC を記録した。

### 4. 研究成果

脊髄ニューロンの IPSC に対し、GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬であるガバジン投与すると、一部が抑制され、残りの成分はグリシン受容体拮抗薬ストリキニーネにより完全に抑制された。従って、1つの脊髄ニューロンは GABA とグリシンを伝達物質としていた。また、ガバジンの IPSC に対する抑制率は、1時間の記録中に変化しなかった (図 1)。

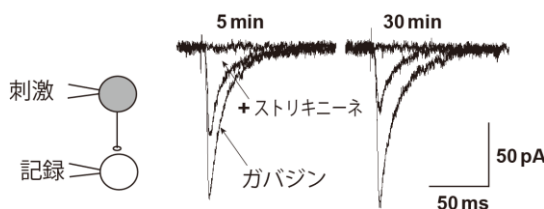


図 1. ラット脊髄培養細胞の IPSC

そこで、まずこの標本を用い、細胞質の神経伝達物質の濃度によって GABA 成分およびグリシン成分が変化するか検討した。

シナプス前細胞のパッチ電極内にグリシンを 100mM 添加すると、シナプス前細胞のホ

ールセル記録開始から 1 時間後には IPSC の成分はほぼ完全にグリシン成分となった。同様に GABA を 100mM 含むバッチ内液をシナプス前細胞に用いたところ、1 時間後の IPSC はほぼ GABA 成分となった。さらに、シナプス前細胞にグルタミン酸 100mM を含む内液を用いたところ、記録開始から 1 時間後の IPSC は、ほぼ完全に GABA 作動性となった。従って、IPSC を担う伝達物質は、細胞質内の抑制性および興奮性伝達物質の濃度に依存することがわかった。

シナプス伝達は、シナプス前神経終末部から放出される伝達物質とシナプス後膜の受容体によって担われているが、上記の結果から、抑制性シナプス伝達が、GABA 性になるかグリシン性になるかは、シナプス前細胞から放出される物質によって決まることが示唆された。そこで、本来は GABA のみのシナプス伝達を行っている海馬を用い、シナプス前細胞にグリシンを添加することにより、グリシン性のシナプス伝達が惹起できるか検討した。その結果、細胞内のグリシンは濃度依存性に、IPSC の GABA 性をグリシン性に変化させた。100mM グリシンを添加した場合、記録開始 1 時間後には、IPSC の約 60% がグリシン性となった。すなわち、GABA のみによる伝達を行っている海馬においても、シナプス後膜にはグリシン受容体が存在し、シナプス前終末部からグリシンが放出されると、グリシン伝達が行われることがわかった。面白いことに、このグリシンの放出は、グリシンと同時に低濃度 (~15mM) の GABA も添加するとグリシンの放出が著明に抑制された。従って、グリシンよりも GABA の方が、実際のシナプス伝達に利用されやすいことが示唆された。

一方、シナプス前細胞の細胞体に 20mM グリシンを添加すると 1 時間後には IPSC の約 10 % がグリシン性となったが、あらかじめテトロドトキシンを加え神経活動を抑制した状態で 3 日間培養した細胞では、20mM グリシンの添加により、約 30% がグリシン性になった。神経活動を抑制すると GAD の発現量が低くなることが報告されていることから、本研究の結果とあわせ、GAD と VIAAT の共役が低下すると、シナプス小胞に取込まれる GABA 量が減少し、グリシン量が増加することが示唆された。

以上の結果は、細胞内に抑制性神経伝達物質 (GABA とグリシン) および興奮性神経伝達物質 (グルタミン酸) を添加した際の結果であるが、慢性疼痛などでは神経回路機能が高まり、グルタミン酸入力が増加すると考えられる。そこで、GABA およびグリシンを共放出している脊髄培養細胞を用いて、細胞外からのグルタミン酸取り込みが GABA およびグリシンの放出がどのように変化するか検討した。

まず、ストリキニーネ (1  $\mu\text{M}$ ) 存在下で GABA 作動性 IPSC について検討したところ、細胞外へのグルタミン酸の投与により、GABA 作動性 IPSC の振幅は約 2 倍に増強された。このグルタミン酸の GABA 作動性 IPSC 増強作用は、グルタミン酸運搬体の阻害薬である TBOA により抑制された。一方、グルタミンは GABA 作動性 IPSC に対して無効であったことから、グリア細胞がグルタミン酸を取り込み、それがグルタミンに変換されて放出され、抑制性神経細胞がグルタミンをグルタミン酸に変換し、そのグルタミン酸が GAD の基質になるという経路は、今回のグルタミン酸による GABA 作動性 IPSC 増強にあまり関与していないことが示唆された。そこで、実際に抑制性神経終末部にグルタミン酸運搬体が存在しているか否かを組織化学的に検討したところ、グルタミン酸運搬体 EAAT3 が存在していることがわかった。グルタミン酸により増強された IPSC がシナプス間隙での GABA 濃度の上昇を伴ったものか否かを、低親和性 GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬である TPMPA を用いて検討した。TPMPA による IPSC の抑制効果は、グルタミン酸投与後に著明に減少した。この結果は、シナプス間隙の GABA 濃度が増加したことを示しており、シナプス小胞内の GABA 濃度は増加したことが示唆された。

同様に細胞外のグルタミン酸によりグリシン作動性 IPSC がどのように変化するか検討を行った。低濃度 (1~3  $\mu\text{M}$ ) のガバジン (GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬) 存在下で記録されるグリシン作動性 IPSC の振幅は、グルタミン酸投与によってやや減少したが、有意差は得られなかった。しかし、グルタミン酸投与後、高濃度ガバジン (100  $\mu\text{M}$ ) による IPSC 抑制率は増強された。高濃度ガバジンはグリシン受容体の低親和性拮抗薬として働くことから、グルタミン酸投与により、抑制性神経終末部がグルタミン酸を取り込むことによって、シナプス間隙へ放出されるグリシン量が減少したと考えられた。

グルタミン酸を取り込むことにより GABA 放出が増えて、逆にグリシン放出が減少する生理学的意義は何であろうか? 慢性疼痛時には脊髄神経回路は活発に活動し、抑制性シナプス伝達の頻度も上昇すると考えられる。そこで、共放出シナプスにおける GABA 作動性 IPSC およびグリシン作動性 IPSC それぞれについて、高頻度で長期に刺激を行ってシナプス伝達の変化を観察した。グリシン作動性 IPSC の振幅は、2~5Hz の高頻度刺激によって急激に減少し、ほとんど認められなくなった。一方、GABA 作動性 IPSC は、高頻度刺激においても約 30% の振幅は残存したことから、グリシンよりも GABA を伝達物質として使用した方が神経回路活動が活発な場合に抑制性伝達を維持しやすいことがわかった。

GABA 作動性 IPSC はグリシン作動性 IPSC に比べ減衰が遅く、より長く抑制をかけることが出来る。従って、神経回路活動が活発になり、GAD と VIAAT の共役が強化された状態では、グルタミン酸の取り込み増加により GABA 放出が増強され、これは慢性疼痛時などの神経回路活動が活発になった際に神経細胞保護作用として働く可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等  
(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

1. Inada H, Watanabe M, Uchida T, Ishibashi H, Wake H, Nemoto T, Yanagawa Y, Fukuda A, Nabekura J. GABA regulates the multidirectional tangential migration of GABAergic interneurons in living neonatal mice Plos One 6, e27048, 2011 査読有
2. Eto K, Kim SK, Nabekura J, Ishibashi H. Taltirelin, a thyrotropin-releasing hormone analog, alleviates mechanical allodynia through activation of descending monoaminergic neurons in persistent inflammatory pain. Brain Research 1414, 50-57, 2011. 査読有
3. Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y, Nabekura J. Inter-regional contribution of enhanced activity of the primary somatosensory cortex to the anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. Journal of Neuroscience 31, 7631-7636, 2011. 査読有
4. Jiang R, Miyamoto A, Martz A, Specht A, Ishibashi H, Kueny-Stotz M, Brouillard R, de Carvalho LP, Goeldner M, Nabekura J, Nielsen M, Grutter T. Retrochalcone derivatives are positive allosteric modulators at synaptic and extrasynaptic GABA receptors in vitro. British Journal of Pharmacology 162,

1326-1339, 2011. 査読有

5. Inada H., Maejima T., Nakahata Y., Yamaguchi J, Nabekura J. & Ishibashi H. Endocannabinoids contribute to metabotropic glutamate receptor-mediated inhibition of GABA release onto hippocampal CA3 pyramidal neurons in an isolated neuron/bouton preparation. Neuroscience 165, 1377-1389, 2010. 査読有
6. Fujii M., Kanematsu T., Ishibashi H., Fukami K., Takenawa T., Nakayama K.I., Moss S.J., Nabekura J., Hirata M. Phospholipase C-related but catalytically inactive protein is required for insulin-induced cell surface expression of  $\gamma$ -aminobutyric acid type A receptors. Journal of Biological Chemistry 285, 4837-4846, 2010. 査読有
7. Mizokami A.,\* Tanaka H., \*Ishibashi H. (\*Equal contribution), Umebayashi H., Fukami K., Takenawa T., Nakayama K.I., Yokoyama T., Nabekura J., Kanematsu T., Hirata M. GABA<sub>A</sub> receptor subunit alteration-dependent diazepam insensitivity in the cerebellum phospholipase C-related inactive protein knockout mice. Journal of Neurochemistry 114, 302-310, 2010. 査読有
8. Nakahata Y., Miyamoto A., Watanabe M., Moorhouse A.J., Nabekura J., Ishibashi H. Depolarizing shift in the GABA-induced current reversal potential by lidocaine hydrochloride. Brain Research 1345, 19-27, 2010. 査読有

9. Ishibashi H., Nakahata Y., Eto K. & Nabekura J. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone. *Journal of Physiology* 587, 5709-5721, 2009. 査読有

[学会発表] (計 10 件)

1. 石橋 仁、山口純弥、中畑義久、鍋倉淳一 (ポスター発表) グリシンと GABA 共放出シナプスにおけるシナプス伝達制御機構. 第 89 回日本生理学会大会、2012 年 3 月 29 日、松本文化会館 (松本市)
2. 宮本愛喜子、Jiang R, Goeldner M, Nielsen M, Grutter T, 鍋倉淳一、石橋 仁. フラボノイド由来 Retrochalcone の GABA<sub>A</sub> 受容体における増強作用. 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会 合同大会震災により大会中止、2011 年 3 月 28-30 日、パシフィコ横浜 (横浜市) (震災により大会中止、誌上開催)
3. 平尾顕三、石橋 仁、鍋倉淳一. マウス外側上オリブ核ニューロンにおけるシナプス入力修飾の発達変化. 第 88 回日本生理学会大会、第 116 回日本解剖学会総会・全国学術集会合同大会. 震災により大会中止、2011 年 3 月 28-30 日、パシフィコ横浜 (横浜市) (震災により大会中止、誌上開催)
4. 石橋 仁、江藤 圭、金 善光、鍋倉淳一. 慢性疼痛における大脳皮質一次体性感覚野の神経活動とその役割. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22-24 日、パシフィコ横浜、(横浜市) (震災により大会中止、誌上開催)
5. 中畑義久、渡部美穂、Andrew Moorhouse、鍋倉淳一、石橋 仁. Functional suppression of K<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup>-cotransporter2 (KCC2) by lidocaine 第 33 回日本神経科学大会、2010 年 9 月 2-4 日、神戸国際会議場 (神戸市)
6. 石橋 仁、中畑義久、江藤圭、鍋倉淳一. ラット青斑核ノルアドレナリン神経細胞における TRH の興奮作用 第 83 回日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16-18 日、大阪国際会議場 (大阪市)
7. Ishibashi H., Nakahata Y., Eto K, Nabekura J. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone, 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Oct. 17-21, 2009. Chicago (USA).
8. Eto K, Wake H, Ishibashi H., Noda M, Nabekura J. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal activities in layer 2/3 primary somatosensory cortex in inflammatory chronic pain, 39th Annual Meeting of Society for Neuroscience, Oct. 17-21, 2009. Chicago (USA).
9. 中畑義久、江藤圭、鍋倉淳一、石橋 仁. Excitation of locus coeruleus noradrenergic neurons by thyrotropin-releasing hormone、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)
10. 江藤 圭、和氣弘明、石橋 仁、野田百美、鍋倉淳一. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal activities in primary somatosensory cortex in inflammatory chronic pain、第 32 回日本神経科学大会、2009 年 9 月 16-18 日、名古屋国際会議場 (名古屋市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石橋 仁 (ISHIBASHI HITOSHI )  
生理学研究所・発達生理学研究室・  
准教授  
研究者番号 : 50311874