

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 23 日現在

機関番号：32527

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590719

研究課題名(和文) 三叉神経痛覚情報処理過程における神経ペプチドとGABAニューロンの関係

研究課題名(英文) GABAergic neurons and neuropeptide receptor in the mouse trigeminal subnucleus caudalis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経痛の慢性化や片頭痛の成因に脳幹の三叉神経脊髄路核(Sp5c)内におけるカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)の関与が考えられている。GAD67-GFPノックインマウスを用いることでSp5cのGABA性ニューロンを蛍光顕微鏡で見ることができる。同時にCGRPならびにCGRP受容体(CRLR)の分布を免疫組織化学的手法により検討した。その結果、CGRPはSp5cの背外側部に存在していたが、核内には存在していなかった。CRLRはSp5c内のGABA性および非GABA性ニューロンにおいて発現していた。Sp5c内のCRLRの活性化が三叉神経痛の慢性化や片頭痛を引き起こすものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Calcitonin gene related peptide (CGRP), which is expressed by trigeminal nociceptors, has considered as an important mediator in orofacial pain and migraine. We investigated the relationship between localization of CGRP, CGRP receptors (CRLR) and GABAergic neurons in the spinal trigeminal subnucleus caudalis (Sp5c) of GAD67-GFP knock-in mice. The CGRP-immunoreactive neurons were located in the dorsolateral surrounding layer of the Sp5c, but not in the inside of the Sp5c. The CRLR-immunoreactions appeared in about 30% of GFP-positive (GABAergic) neurons and many GFP-negative (non-GABAergic) neurons of the Sp5c, suggesting that the CRLR-immunoreactive neurons are second-order of nociceptive neurons in the Sp5c. We suggest that activation of CRLR result in the neural hyperexcitability, the so-called wind-up phenomenon or central sensitization in the Sp5c.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：疼痛の神経機構 三叉神経 神経ペプチド 三叉神経脊髄路核 GABA

1. 研究開始当初の背景

顔面の感覚は、三叉神経を介して脳幹内へ入り、橋から延髄尾側部へ伸びる三叉神経脊髄路核に伝えられる。三叉神経支配領域に出現する疼痛は、特発性三叉神経痛、頭蓋内腫瘍、带状疱疹後神経痛、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。また、最近では、片頭痛なども三叉神経系を介して引き起こされることが明らかになってきた。これらの慢性痛の原因として、痛みを受容する三叉神経尾側核 (Sp5c) の二次ニューロンの可塑性が考えられている。これらの可塑性には、グルタミン酸の N-メチル-D-アスパラギン酸 (NMDA) 受容体、サブスタンス P (SP) のニューロキニン (NK) 受容体あるいはカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) 受容体の関与が考えられている。

一方、三叉神経尾側核内にはグルタミン酸などの興奮性伝達物質を持つニューロンおよび GABA など抑制性伝達物質を持つニューロンが多数存在している。これまで我々は、GAD67 (GABA 合成酵素・グルタミン酸デカルボキシラーゼ) のかわりに green fluorescence protein (GFP) 遺伝子を組み込んだマウス (GAD67-GFP ノックインマウス) を用い三叉神経脊髄路核内の GABA ニューロンおよび非 GABA 性ニューロンの活動をスライスパッチ法により記録し、その結合様式を検討している。

2. 研究の目的

本研究では、GAD67-GFP ノックインマウスを用い、SP あるいは CGRP を含むニューロンあるいは受容体の分布を明らかにする。これにより、GABA ニューロンおよび非 GABA 性ニューロンと SP と CGRP との関係を検討する。具体的には、次の2点を目的とした。

1) 免疫組織化学的手法により SP あるいは CGRP ニューロンと三叉神経脊髄路核内の GABA 性あるいは非 GABA 性ニューロンとの関連を明らかにする。

2) 免疫組織化学的手法により NK 受容体および CGRP 受容体が、GABA 性あるいは非 GABA 性ニューロンにどのように発現しているか検討する。

3. 研究の方法

(1) 標本

新生 GAD67-GFP ノックインマウス (1~2 週齢) を使用した。エーテルの深麻酔でマウスを安楽死させた後、解剖双眼顕微鏡の下で、脳幹および三叉神経節を取り出した。

(2) 免疫組織化学的染色方法

取り出したマウスの脳幹および三叉神経節を 4% パラホルムアルデヒド液 (4% PFA/0.1M PBS) で 2~8 時間固定した。その

後、その試料を 30% スクロース液 (0.01M PBS/30% Sucrose) に置換した。クライオスタットあるいはピプラトームによって 10~30µm の厚さの切片を作成した。切片を、PLL コートスライドガラスに張り付け、0.1M PBST (0.1% Triton-X) で 5 分洗浄した。ブロッキング反応 (PBA001 A Serum タイプ) を湿潤箱内で室温で 10 分行った後、0.1M PBST で 5 分洗浄した。その後、一次抗体中に 1 時間放置した後、0.1M PBS で 5 分間、洗浄した。次に、二次抗体で一時間染色した後、0.1M PBS で 5 分間洗浄し、封入した。本研究で使用した一次抗体と二次抗体の組み合わせは表 1 の通りである。封入後は、蛍光顕微鏡 (Olympus DX51) で観察し、画像をデジタルカメラ (Olympus DP73) および専用のソフトウェア (Cell Sens) を用いてコンピュータに取り込み、保存した。

表 1. 本研究で用いた一次抗体と二次抗体の組み合わせ

	一次抗体	2次抗体
CGRP	anti-CGRP raised in Rabbit (Chemicon International)	Cy-3 donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch)
CRLR	Anti-CRLR (H-42) : sc-30028 (Santa Cruz Biotechnology)	Cy-3 donkey anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch)
substance P	Anti-Substance P, pain, clone NC1 (Chemicon International)	Goat anti-Rat IgG, FITC conjugate (Chemicon International)
NK-1 Receptor	Anti-Substance P Receptor, pain (Chemicon International)	Goat anti-Rat IgG Antibody, Cy3 conjugate (Chemicon International)

4. 研究成果

(1) 三叉神経節における CGRP と SP の蛍光二重染色の結果

三叉神経節細胞は、グルタミン酸作動性の神経であるが、CGRP と SP を産生していることが報告されている。本研究では、免疫組織化学的染色法を確立するために、三叉神経節細胞に対して CGRP と SP の二重染色を行った。その結果、CGRP だけが存在する細胞体はほとんどみられないが、CGRP と SP の両方を有する細胞体がほとんどであった。すなわち、三叉神経節内の一つの細胞体においては、CGRP と SP の両方が存在していることが確認された。

(2) 三叉神経脊髄路核における CGRP と GABA 性ニューロンとの関係

GAD67-GFP ノックインマウスをの三叉神経脊髄路核を蛍光顕微鏡を用いて観察すると GABA 性ニューロンには GFP が発現しているため図 1 A に示すように緑色の蛍光が認められる。この標本において CGRP の染色を行なった。赤色の蛍光を発するのが CGRP である (図 1 B)。この 2 つの画像を重ね合わせたものが図 1 C である。GABA 性ニュー

ロンが密に存在している部位が三叉神経脊髄路核であり、CGRP ニューロンは三叉神経脊髄路核内にはほとんど存在していなかったが、背外側の核周囲を取り囲むように CGRP ニューロンが存在していた。また、背外側層の CGRP は非 GABA 性ニューロンに発現していた。

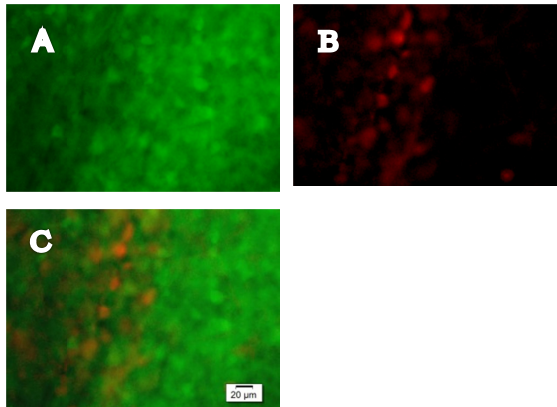


図 1 A: GFP 陽性(GABA 性)ニューロン(緑) B: CGRP 陽性ニューロン(赤) C: 写真 A と写真 B の重ね合わせ画像

(3) 三叉神経脊髄路核における CGRP 受容体 (CRLR) と GABA 性ニューロンとの関係  
GAD67-GFP ノックインマウスを用いて三叉神経脊髄路核における CGRP 受容体 (CRLR) の発現を免疫組織化学的に染色した(図 2 B)。図 2 C は、GABA 性ニューロン(図 2 A)と CRLR を重ね合わせたものである。矢印で示したように約 30% の GABA 性ニューロンにおいて CRLR を発現していた。非 GABA 性ニューロンにおいても CRLR が発現しているものが存在していた。

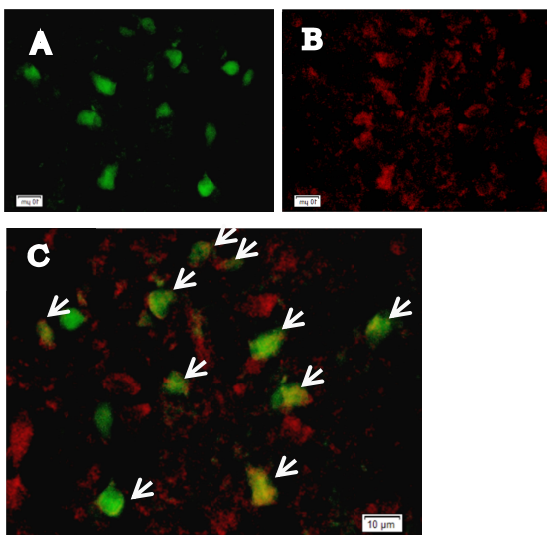


図 2 A: GFP 陽性(GABA 性)ニューロン(緑) B: CRLR 陽性ニューロン(赤) C: 写真 A と写真 B の重ね合わせ画像

(4) 三叉神経脊髄路核におけるサブスタンス P 受容体 (NK-1) と GABA 性ニューロンとの関係

サブスタンス P 受容体 (NK-1) の染色を行ったが、はっきりとした結果は得られなかった。今後、染色条件、抗体の種類等の検討が必要と思われた。

(5) まとめ

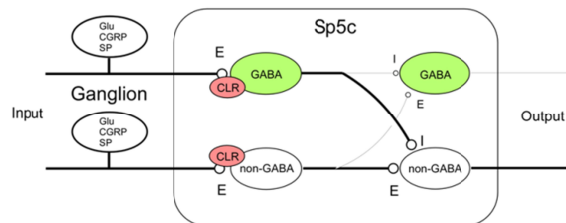


図 3 . 三叉神経節 (Ganglion) および三叉神経脊髄路尾側亜核 (Sp5c) におけるニューロン間結合様式

図 3 は、我々がこれまでに行った電気生理学的研究と本研究から得られた結果を基に三叉神経脊髄路尾側亜核 (Sp5c) 内のニューロンの結合様式をまとめたものである。三叉神経節細胞の伝達物質はグルタミン酸 (Glu) であり、Sp5c 内の GABA 性ならびに非 GABA 性ニューロンにシナプスを介し興奮を伝えている。GABA 性ニューロンの興奮は Sp5c 内の非 GABA 性ニューロンを抑制する。本研究では三叉神経節細胞は CGRP と SP を含んでいることを確認した。一方、Sp5c 内の GABA 性ならびに非 GABA 性ニューロンの細胞体には CRLR が発現しており、神経節細胞の軸索末端から分泌される CGRP を受容すると考えられた。三叉神経の頻回刺激により神経節軸索末端から CGRP が放出される。その結果、Sp5c 内の GABA 性および非 GABA 性ニューロンの CRLR が活性化され、細胞内 Ca 濃度の上昇、セカンドメッセンジャーの産生、プロテインキナーゼ (PKA, PKC) の活性化、膜タンパクのリン酸化という細胞内カスケード反応が引き起こされ、興奮が長期に増強持続すること、すなわち、細胞内伝達系の活性化とその変化により慢性疼痛に移行すると思われた。

## 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 5 件)

Sugita T, Sakuraba S, Kaku Y, Yoshida K, Arisaka H, Kuwana S. Orexin induces excitation of respiratory neuronal network in isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat. *Respiratory Physiology & Neurobiology* (in press) 査読有

田中勇治, 宮坂智哉, 小池和子, 桑名俊一,

齋藤基一郎, 佐藤将朗, 阿部勉, 村上仁之, 荒金房子. 姿勢安定度評価指標を用いた健康中高年者の立位姿勢の安定性および足趾屈筋筋力の関連性. 植草学園大学紀要 4: 145-150, 2012. 査読有

横隔神経運動ニューロンにおける TASK-1 チャンネルの発現. 桑名俊二, 原田尚子, 角友起, 齋藤基一郎, 小池和子, 本田岳夫, 仲嶋一範. 植草学園大学紀要 4: 139-143, 2012. 査読有

宮坂智哉, 桑名俊二, 渡邊章, 田中勇治, 村上仁之. 障害(児)者を対象とした生体信号入力デバイスの適応の可能性について. 植草学園大学紀要 3: 121-12, 2011, 査読有

桑名俊二, 細川幸希, 角友起, 齋藤基一郎, 小池和子. 三叉神経脊髄路亜核内神経網におけるシナプス結合の解析 - GAD67-GFP ノックイン新生マウスを用いた研究 - 植草学園大学紀要 3: 113-119, 2011, 査読有

〔学会発表〕(計7件)

Kuwana S, Hosokawa Y, Sugita T, Umezawa N, Matsumoto A, Arisaka H, Yoshida K, Sakuraba S. Electrophysiological characteristics of GABAergic neurons and localization of calcitonin receptor-like receptor in the mouse trigeminal subnucleus caudalis. International Congress of Physiological Sciences (IUPS) 2013, Birmingham, UK, July 25, 2013

Sugita T, Kuwana S, Arisaka H, Imaizumi U, Itakura S, Furuya M, Yosida K. The effect of orexin on respiratory neuronal network in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat. The 5th Annual Meeting of the Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies (FADAS) Xi'an, People's Republic of China, September 14, 2012

Kuwana S, Kaku Y. Inhibitory effects of remifentanyl on activities of respiratory neural network in the brainstem-spinal cord of neonatal rats. XII<sup>th</sup> Oxford Conference. Breathing, Emotion and Evolution. Almelo, Netherland, August 18, 2012.

Sugita T, Kuwana S, Arisaka H, Imaizumi U, Itakura S, Furuya M, Yoshida K. The effect of orexin on respiratory neuronal network in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat. International Federation of Dental Anesthesia Societies, Kona Hawaii, March 2012.

杉田 武士, 桑名 俊二, 有坂 博史, 今泉 うの, 板倉 紹子, 古屋 宗孝, 吉田 和子. オレキシンは新生ラットの単離脳幹-脊髄で呼吸ニューロン・ネットワークの興奮を誘発する. 歯科麻酔学会 神戸市 2011年10月

Kuwana S, Sugita T, Kaku Y, Arisaka H, Sakuraba S. Orexin induces excitation of respiratory neural network in the isolated brainstem-spinal cord of neonatal rat. 8<sup>th</sup> IBRO World Congress of Neuroscience, Florence, Italy. July 2011.

Kuwana S. Role of GABAergic neurons in respiratory control studied using GAD67-GFP knock-in mice. J Physiol Sci vol 61 pp.s49. April 2011.

## 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

角 友起 (KAKU YUKI)  
植草学園大学・保健医療学部・講師  
研究者番号: 50551363