

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

水谷友香

論文題目

ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核における  
シナプス伝達に対するプロスタグランジン  $E_2$  の作用  
に関する神経薬理学的研究

## I. 緒言

矯正歯科治療は良好な咬合を得るために広く行われている。しかし、同時に矯正力は不快感や疼痛を引き起こす。疼痛や炎症に関与するシクロオキシゲナーゼ 2 (COX-2) が損傷を受けた末梢組織だけでなく、侵害情報伝達に関連した中枢部位においても誘導されていることがこれまでに報告されている。COX-2 により中枢のニューロンやグリア細胞からプロスタグランジン E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) が合成され、産生された PGE<sub>2</sub> は様々な生理的機能に影響を与える。

口腔顔面領域からの体性感覚情報は延髄に伝達される。痛覚・温度覚は主に三叉神経脊髄路核 (Vsp) に伝達され、その後これらの感覚情報は上位中枢へ投射される。Vsp には 3 つの亜核が存在し、それぞれ吻側亜核 (Vo)、中間亜核 (Vi)、尾側亜核 (Vc) とよばれ、Vc 領域には主に痛覚情報が伝達される。これらの亜核は、相互に興奮性または抑制性のシナプスを形成して神経結合している。これまでの報告で、実験的な歯の移動により Vc 領域において遺伝子の発現指標である *c-Fos* 蛋白の産生が報告されていることから、歯の移動による痛覚と Vc ニューロンの活性には強い相関関係があることが示唆されている。さらに、歯の移動によって Vc 領域に発現する *c-Fos* 蛋白が、モルヒネやアセトアミノフェンによって抑制されるという興味深い報告もある。矯正歯科治療時の COX-2 発現の中枢での制御は、疼痛を管理する上で重要な要因であると考えられるが、これまでに Vc 領域にお

ける  $\text{PGE}_2$  の生理的役割は明らかにされていない。

本研究では、矯正歯科治療時の疼痛発生機序を解明する為、矯正力負荷に伴い Vc 領域に産生される  $\text{PGE}_2$  の役割を検討することを目的とした。その為、ラット脳幹スライス標本を用い、Vc ニューロンにホールセルパッチクランプ法を用いて行った。Vc ニューロンへのシナプス入力には 3 種類、すなわち Vc 領域内中継ニューロンからの抑制性及び興奮性入力と末梢からの一次求心性入力があるため、これらのシナプス入力による Vc 二次中継ニューロンの電流変化をそれぞれ自発性抑制性シナプス後電流 (sIPSC)、自発性興奮性シナプス後電流 (sEPSC) 及び一次求心性誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSC) として記録した。これらの膜電流に対する  $\text{PGE}_2$  の作用を電気生理学的に解析すると同時に、関与する PG 受容体のサブタイプの同定を行った。

## II. 実験材料および方法

### 1. スライス作成

本実験では、Wistar 系雄性ラットを深麻酔下で断頭し、三叉神経脊髄路尾側亜核を含む延髄を摘出後、水平断スライスを 2~3 枚作成した。

### 2. 膜電位固定法 (whole-cell patch clamp 法) による膜電流記録

Vc 領域の神経細胞からの膜電流の記録は、細胞内環境とパッチ電極内を貫通させ、細胞膜を流れるイオン電流を記録した。

### 3. 記録電流の分類

#### 1) sIPSC

sIPSC の記録は、AMPA 受容体遮断薬である DNQX (10  $\mu$ M) の灌流下で行った。

#### 2) sEPSC

sEPSC の記録は、GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬である picrotoxin (100  $\mu$ M) 及びグリシン受容体遮断薬である strychnine (1  $\mu$ M) の灌流下で行った。

#### 3) eEPSC

eEPSC の記録は、GABA<sub>A</sub> 受容体遮断薬である picrotoxin (100  $\mu$ M) 及びグリシン受容体遮断薬である strychnine (1  $\mu$ M) の灌流下で行った。刺激電極は、記録する細胞と同側の三叉神経核 (trigeminal tract ; Tt) 上においた。

### 4. データ解析および統計処理

データ解析では sIPSC と sEPSC の記録は各測定時点において 1 分間行い、eEPSC は、5~10 回のデータの平均波形を用いた。有意差検定には、一元配置分散分析 (ANOVA) Bonferroni 補正多重 t-検定、Student' s t-test もしくは Kolomogorov-Smirnov 検定を用い、危険率  $p < 0.05$  で有意と判定した。

## III. 結果

### 1. 記録細胞の分布

それぞれの実験の終了時に、記録した細胞の位置を近赤外微分干渉顕微鏡で確認した。今回の実験で用いた細胞は、Vc領域の膠様質 (SG) 内あるいはその周辺から広範囲に採取し、測定した。

### 2. sIPSC に対する PGE<sub>2</sub> の作用

sIPSC の相対的变化では、頻度において低濃度 PGE<sub>2</sub> (1 μM) は増加作用を示したものの、その作用は有意ではなかった一方で、高濃度 PGE<sub>2</sub> (5 μM) は、頻度を有意に増加させた。振幅においては、PGE<sub>2</sub> 1 μM 及び 5 μM 適用において有意な変化はなかった。

### 3. sEPSC に対する PGE<sub>2</sub> の作用

sIPSC の結果と同様に、PGE<sub>2</sub> は sEPSC の頻度のみを用量依存的に増加させた。

### 4. sIPSC 及び sEPSC に対する PGE<sub>2</sub> の頻度促進作用に関与する EP 受容体の同定

PGE<sub>2</sub> による sIPSC と sEPSC の頻度増加作用に関与する PG 受容体サブタイプの同定を検討した。sIPSC・sEPSC 共に SC19220 (EP1 受容体遮断薬) により PGE<sub>2</sub> による頻度増加作用が抑制された。

### 5. eEPSC に対する PGE<sub>2</sub> の作用

eEPSC の記録では、刺激電極から記録細胞に侵害刺激を行い、eEPSC を誘発した。全てのニューロンにおいて、PGE<sub>2</sub> は、eEPSC の潜時あるいは

は振幅に影響を及ぼさなかった。

#### IV. 考察

PGE<sub>2</sub>は、様々な刺激に対する反応としてアラキドン酸に代表される不飽和脂肪酸より産生される主要な代謝物の一つである。産生された PGE<sub>2</sub>は直ちに放出され、局所の恒常性維持や生理的機能に影響を与えている。

PGE<sub>2</sub>は、 $\mu\text{M}$  レンジの濃度で様々な作用を示すことが報告されている。今回の研究においても、PGE<sub>2</sub>は、Vcニューロンにおいて自発性の興奮性及び抑制性シナプス伝達をシナプス前膜の EP1 受容体を活性化して用量依存的に促進させた。この結果は、口腔顔面領域からの侵害刺激後に中枢内で産生される PGE<sub>2</sub>が Vc 領域での神経ネットワークの内因性の基礎的活動性を制御し、侵害受容伝達の調節を行う可能性があることを示唆するものである。

##### 1. Vcニューロンにおけるシナプス伝達

本実験において、SG の Vcニューロンから記録された sIPSC、sEPSC 及び eEPSC の電気生理学的または薬理的な特徴から、これらのニューロンの興奮性伝達はグルタミン酸 AMPA 受容体あるいは非 NMDA 受容体を介していること、又、抑制性伝達は GABA<sub>A</sub> 受容体あるいはグリシン受容体を介していることが明らかとなった。

##### 2. Vcニューロンにおける PGE<sub>2</sub>によるシナプス伝達調節

Vc領域の二次ニューロンから疼痛関連上位中枢への上行性連絡は口腔顔面領域からの侵害情報伝達に重要な役割であり、亜核間では相互の上行性及び下行性のシナプス伝達の存在が報告されている。これらのことから、Vc領域は単に求心性情報を伝達する中継核だけではなく、亜核間でのシグナル伝達調節も行っていると考えられる。PGE<sub>2</sub>はVcニューロンのsIPSC及びsEPSCの振幅に影響することなく頻度のみを増加させたという今回の結果は、亜核間の神経ネットワーク内において、PGE<sub>2</sub>が自発的な興奮性及び抑制性のシナプス伝達をシナプス前性に促進させることを示唆している。一方で、PGE<sub>2</sub>は三叉神経脊髄路を介した興奮性シナプス伝達には影響しなかった。よって今回の結果から、中枢で産生されたPGE<sub>2</sub>は三叉神経の求心性入力に直接影響することなくVcニューロンの神経ネットワークの基盤活性を調節することにより、侵害受容伝達を修飾すると考えられる。

### 3. 自発性シナプス伝達の促進をもたらすPGE<sub>2</sub>のメカニズム

PGE<sub>2</sub>に関連する4種類の受容体は、EP1～EP4が同定されている。今回、SC19220 (EP1受容体遮断薬) がPGE<sub>2</sub>によるsIPSC及びsEPSCの促進作用を遮断した。この結果から、PGE<sub>2</sub>は、神経終末においてEP1受容体を活性化することにより細胞質Ca<sup>2+</sup>の動員を行い、興奮性及び抑制性の神経伝達物質の自発的な遊離を増強すると考えられる。

### 4. 自発性及び誘発性神経伝達物質遊離におけるPGE<sub>2</sub>の異なる調節

今回の研究では、PGE<sub>2</sub>は自発性のシナプス伝達には促進効果を示すが、

誘発性のシナプス伝達には効果を示さないことが明らかになった。以前の報告によると、孤束核ニューロンでは、同一神経終末内に別々に制御されるシナプス小胞が共存し、それぞれの小胞から伝達物質が独立して放出されることが示されている。今回の結果と合わせて考えると、Vc領域においても同様な PGE<sub>2</sub> による自発性と誘発性の神経伝達物質遊離の異なる調節メカニズムの存在が考えられる。

## V. 結論

以前の報告により、実験的な歯の移動による口腔顔面領域の疼痛には末梢組織よりVc領域でのCOX-2産生が主に関与していることが示唆されている。PGE<sub>2</sub>がVcニューロンにおいて自発的な興奮性及び抑制性伝達のいずれも促進するという今回の実験結果は、これを支持するものである。三叉神経脊髄路の亜核間神経ネットワークの基盤活性の変化は、末梢受容器からの求心性入力を受容や統合に影響を与え、侵害情報伝達を修飾すると考えられる。脊髄ではPGE<sub>2</sub>による中枢での感覚活性化が脊髄からの感覚情報を増幅させる働きを持つことが示唆される。同様のPGE<sub>2</sub>の機序がVc領域の情報伝達系においても考えられる。さらに今回の結果は、COX-2と同様に、Vc領域においてEP1受容体もしくはPGE<sub>2</sub>の中枢での制御が矯正歯科治療による疼痛のコントロールに有効である可能性を示した。