

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

浅岡 諒

論文題目

ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核におけるプロスタグランジン E₂ 誘発性自発性シナプス伝達に対するシナプス前終末の TRPV1 チャンネルの関与

I. 緒言

歯科矯正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。口腔顔面領域からの体性感覚情報は、三叉神経求心路を通り延髄に伝達され、主に痛覚・温度覚は三叉神経脊髄路核 (Vsp) に伝達される。Vsp には吻側亜核 (Vo)、中間亜核 (Vi)、尾側亜核 (Vc) という3つが存在し、Vc は顎顔面領域からの侵害受容情報を伝達する三叉神経の一次求心性入力を受ける。Vc 領域において、薄層 II (substantia gelatinosa; SG) は侵害情報の処理には重要であると考えられている。

中枢のニューロンにおける PGE_2 は様々な生理学的機能に影響する。実際に、 PGE_2 は、シナプス前 EP1 受容体を活性化することによって SG 領域に位置する Vc ニューロンにおける自発性興奮性および抑制性シナプス伝達の促進効果を有することを我々は明らかにした。

一方、Vc に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャネルも活性化することで神経末端や中枢端からの神経伝達物質または化学物質の放出を引き起こし、侵害受容シグナル伝達の増強をもたらす。

PGE_2 は、Vc 領域において EP1 受容体を介してシナプス前 TRPV1 チャネルを活性化し、神経伝達物質の放出を増強することで相互作用を示すと考えられるが、これについてはまだ明らかにされていない。

今回の研究では、whole-cell patch clamp 法を用いて、ラット脳幹スライ

スの SG 領域に位置する Vc ニューロンから自発性興奮性および抑制性後シナプス電流 (sEPSC および sIPSC) を記録した。これら sEPSC および sIPSC に対する Capsaicin による TRPV1 チャンネル活性化の効果、および PGE₂ によるシナプス伝達の促進における TRPV1 チャンネルの関与を調べた。

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 (3~5 週齢、50~100g) を用いた。ラットを深麻酔し断頭、三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む脳幹部を摘出した。マイクロスライスカッターを用いて、三叉神経脊髄路核を含む、厚さ 400 μ m の水平断スライスを 2~3 枚作成した。脳幹スライスを人工脊髄液中に、34 $^{\circ}$ C で 30~40 分間保温した後、室温で約 1 時間保管した。

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

Vc 領域の神経細胞からの膜電流の記録は whole-cell patch clamp 法を用いた。細胞膜にケイ酸ガラス毛細管を密着させ、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。実験はすべて室温で行った。

1) 実験装置について

使用装置は以下のとおりである。

(1) 信号変換装置

記録された電流をコンピューター上に表示した。

(2) オシロスコープ

ギガオーム・シール完成時や whole-cell 完成時における電流応答を確認した。

(3) パッチクランプアンプ

電流-電圧変換装置で微小電流を記録した。

(4) 近赤外微分干渉顕微鏡

Vc ニューロンをモニター上に視覚化した。

(5) マイクロマニピュレーター

顕微鏡下で 1nm 程度の精度でパッチ電極を操作した。

(6) パッチ電極作製装置

2) 細胞の選定方法

作成した脳幹スライスを顕微鏡下に固定し、人工脳脊髄液で灌流した。

近赤外微分顕微鏡下で、モニター上に膠様質 (SG) 領域を写し、細胞を選択した。

3. 使用薬物

使用薬物は以下のとおりである。

- ・ AMG9810 (TRPV1 チャンネル遮断薬, 0.1 μ M)
- ・ Capsaicin (TRPV1 チャンネル作動薬, 0.1, 0.3, 1.0 μ M)
- ・ DNQX (non-NMDA 受容体遮断薬, 10 μ M)
- ・ PGE₂ (1.0, 5.0, 10.0 μ M)

- ・ picrotoxin (GABA_A 受容体遮断薬, 100 μ M)
- ・ strychnine (glycine 受容体遮断薬, 1.0 μ M)

4. データ解析および統計処理

データ解析には Chart5、Origin ソフトを用いた。sIPSC と sEPSC の記録は各測定時点において 1 分間行った。測定された数値は、平均 \pm 標準誤差 (n=例数) で表示した。有意差検定には一元配置分散分析 (ANOVA)

Bonferonni 補正多重 t-検定、対応のある・ない t-検定もしくは

Kolmogorov-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

水平断脳幹スライスの顕微鏡像をトレースし、細胞の位置をプロットした。結果、細胞は SG 領域の広範囲に分布していた。

2. sIPSC に対する Capsaicin の作用

Capsaicin の濃度を増やすと sIPSC の頻度に対する促進効果が有意に増加したが、振幅は有意な差はなかった。

3. sEPSC に対する Capsaicin の作用

Capsaicin は sEPSC の頻度を濃度依存的に有意に増加させたが、振幅は変化しなかった。

4. Capsaicin のシナプス伝達作用に対する AMG9810 の拮抗作用

AMG9810 は sIPSC の頻度に対する Capsaicin の促進効果に拮抗した。

そして sIPSC と同様に AMG9810 は sEPSC の頻度に対する Capsaicin の促進効果に拮抗した。

5. Capsaicin のシナプス後膜への作用

高濃度 (1.0 μ M) の Capsaicin は内向き電流を誘発したことから、Vc ニューロンの一部にシナプス後膜への影響を及ぼした。AMG9810 (0.1 μ M) の存在下でも Capsaicin がシナプス後膜への影響を及ぼした。Capsaicin 誘発性の内向き電流の平均振幅の大きさは、AMG9810 存在下では AMG9810 非存在下より小さいが統計的には差はなかった。

6. Capsaicin と PGE₂ の相互作用

PGE₂ (5.0 μ M) の適用は sIPSC と sEPSC の頻度を促進した。AMG9810 (0.1 μ M) の存在下では AMG 9810 非存在下よりも有意に小さかった。

さらにより高濃度 (10.0 μ M) PGE₂ でも内向き電流は誘発せず、それを繰り返し適用したところ、sIPSC と sEPSC とともに頻度を促進したことから PGE₂ は脱感作を誘発しなかった。

次に Capsaicin (0.3 μ M) を 2 回繰り返し適用すると 2 回目の Capsaicin の効果は 1 回目の Capsaicin の効果と比較して有意に減少し、脱感作作用を示した。脱感作ニューロンでは、PGE₂ 誘発性の促進効果は、正常なニューロンよりも有意に小さかった。

最後に PGE₂ と Capsaicin の低濃度 (PGE₂ : 1.0 μ M、Capsaicin : 0.1 μ M) での併用効果を調べた。この濃度の PGE₂ または Capsaicin 自体は、sIPSC

および sEPSC に対して効果がなかったが、これらを共適用することで頻度促進作用を示した。

IV. 考察

本研究は、Capsaicin が Vc ニューロンの振幅に有意な影響を及ぼさずに濃度依存的に sEPSC および sIPSC の頻度を増加させることを明らかにした。また、その Capsaicin の効果は AMG9810 によって完全に阻止された。これは、シナプス前終末に位置する TRPV1 チャンネルの活性化が、興奮性および抑制性伝達物質の放出を増強することを示唆する。

また本研究において、PGE₂ 誘導性の sIPSC および sEPSC の促進が AMG9810 によって有意に抑制されたことから、PGE₂ 誘導性のシナプス伝達の促進における TRPV1 チャンネルの関与が示唆される。これは、Capsaicin の反復適用によって脱感作されたニューロンにおいて PGE₂ の作用が減少し、低濃度の Capsaicin と PGE₂ の共適用が sEPSC および sIPSC の頻度を増加させたという結果からも支持される。

これらの結果は、PGE₂ が少なくとも一部においてシナプス前終末の TRPV1 チャンネルを感作し、顎顔面領域から Vc ニューロンへの侵害受容シグナルの修飾において PGE₂ と TRPV1 チャンネルとの相互作用することにより自発的シナプス伝達を促進することを示唆する。

V. まとめ

本研究は、SG 領域に位置する Vc ニューロンにおける自発的シナプス伝

達の調節における PGE_2 と TRPV1 チャンネルとの相互作用を明らかにした。
これは歯科矯正治療の疼痛管理への可能性を示唆するものと考えられた。