

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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 E ₂ 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	

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

浅 岡 諒

愛知学院大学大学院歯学研究科 歯科臨床系 (歯科矯正学)

指導：後藤 滋巳 教授

愛知学院大学大学院歯学研究科博士 (歯学) 学位申請論文

Involvement of presynaptic TRPV1 channels in prostaglandin E₂-induced facilitation of
spontaneous synaptic transmission in the rat spinal trigeminal subnucleus caudalis

RYO ASAOKA

Graduate School of Dentistry, Aichi Gakuin University

Clinical Dentistry(Orthodontics)

Supervisor : Prof.Shigemi Goto

The thesis submitted to the Graduate School of Dentistry,
Aichi Gakuin University for Ph.D. degree

本論文の基盤論文は、次のような論文です。

タイトル : Involvement of presynaptic TRPV1 channels in prostaglandin E₂-induced facilitation of spontaneous synaptic transmission in the rat spinal trigeminal subnucleus caudalis

掲載誌名 : Brain Research Volume 1715,15 July 2019,Pages 115-125

著者 : RYO ASAOKA ^{1,2}, YOSHIAKI OHI ¹, KEN MIYAZAWA ², SHIGEMI GOTO ², and AKIRA HAJI ¹

所属 : ¹Laboratory of Neuropharmacology, School of Pharmacy, Aichi Gakuin University, 1-100 Kusumoto-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8650, Japan
²Department of Orthodontics, School of Dentistry, Aichi Gakuin University, 2-11 Suemoridori, Chikusa-ku, Nagoya 464-8651, Japan

目 次

I. 緒 言	1
II. 実験材料および方法	2
1. スライス作製	2
2. 膜電位固定法 (whole-cell patch clamp 法) による膜電流の記録	2
3. 記録電流の分類	4
4. 使用薬物	4
5. データ解析および統計処理	4
III. 結 果	5
1. 記録細胞の分布	5
2. sIPSC に対する Capsaicin の作用	5
3. sEPSC に対する Capsaicin の作用	6
4. Capsaicin のシナプス伝達作用に対する AMG9810 の拮抗作用	6
5. Capsaicin のシナプス後膜への作用	8
6. Capsaicin と PGE ₂ の相互作用	8
IV. 考 察	12
1. Capsaicin はシナプス前 TRPV1 チャンネルを介して興奮性および抑制性神経伝達物質の自然放出を増加させる	12
2. PGE ₂ はシナプス前 TRPV1 チャンネルを活性化または感作する	13
3. PGE ₂ はシナプス後膜の TRPV1 チャンネルと相互作用しない	14
V. ま と め	14
謝 辞	14
文 献	14

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。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る。主に触覚・圧覚は主感覚核に、痛覚・温度覚は三叉神経脊髄路核 (Vsp) に伝達される。その後、これらすべての感覚情報は間脳の視床後内側腹核に収束し、大脳の一次体性感覚野へ投射される¹⁾。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) とよばれる (図1)。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^{1,2)}。さらに、侵害受容シグナルの調節および統合において重要な役割を果たしている内因性神経伝達経路から興奮性および抑制性入力を受ける^{3,4)}。Vc領域において、薄層II (substantia gelatinosa; SG) に位置するニューロンは介在ニューロンであり、侵害情報の処理には重要であると考えられている。なぜなら、それらは神経の局所回路を構成している一次ニューロンであり、体性感覚に関連する視床に投射していないからである⁵⁾。

歯牙移動時の疼痛感覚は、矯正力の強度、局所的な虚血あるいは組織の炎症に由来している^{6,7)}。炎症あるいは疼痛に関与するシクロオキシゲナーゼ2 (COX-2) は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ることが報告されてい

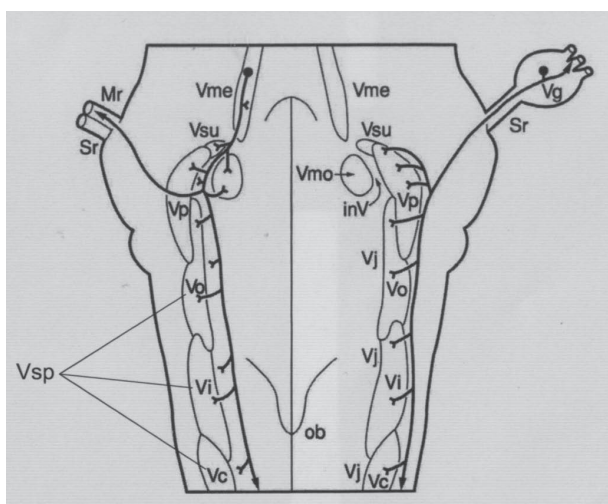


図1. 三叉神経一次求心線維の中枢内投射 (右側) 及び遠心性投射
略語: Ob: 門、Vme: 三叉神経中脳路核、Vsu: 三叉神経上核、Vg: 三叉神経節、Vj: 三叉神経傍核、Vp: 主感覚核、Vmo: 三叉神経運動核、Vsp: 三叉神経脊髄路核、Vo: 吻側亜核、Vi: 中間亜核、Vc: 尾側亜核、Mr: 三叉神経運動根、Sr: 三叉神経感覚根

る^{8,9)}。結果的に中枢のニューロンの PGE₂ は、有害な刺激に応答して中枢ニューロンおよびグリアにおいてシクロオキシゲナーゼによって合成され¹⁰⁾、様々な生理学的機能に影響する¹¹⁻¹⁴⁾。PGE₂ は、EP1-EP4 受容体サブタイプの G タンパク質共役受容体を刺激することによって作用する^{15,16)}。実際に、PGE₂ 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し、三叉神経誘発性興奮伝達に有意な効果はないことを我々は明らかにした¹⁷⁾。これらの結果から中枢で合成された PGE₂ は Vc ニューロンにおけるシナプス伝達を調節し、顎顔面領域からの侵害受容シグナルの中枢での処理過程を調節すると考えられる。

一方、組織学的分析から Vc に発現する transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) チャネルも顎口腔侵害受容伝達にも関与すると言われている。例えば、顎顔面領域を神経支配する TRPV1 陽性求心性神経細胞は、すべての三叉神経感覚核、主に Vc の SG 領域^{19,20)} に投射する。また実験的な歯の動きは、Vc における TRPV1 チャネルの発現を増加させる²¹⁾。さらに、シナプス前 TRPV1 チャネルの選択的活性化は Vc ニューロンにおける自発性興奮伝達を促進する^{21,22)}。一般に、TRPV1 チャネルは体性感覚線維に分布しており、それらの活性化は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^{23,24)}。TRPV1 チャネルは、プロトン、熱および生物活性物質を含む物理・化学的侵害受容刺激によって活性化され^{25,26)}、内因性プロテインキナーゼに

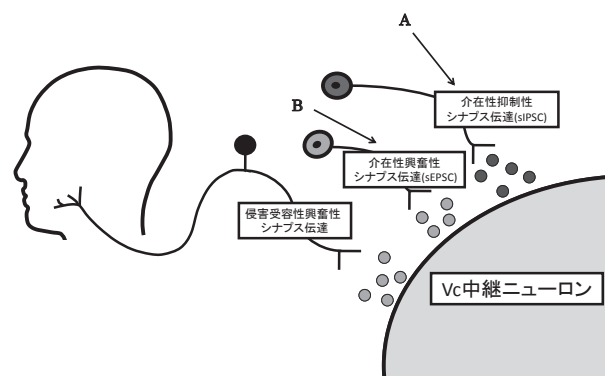


図2. Vc におけるシナプス伝達様式

侵害受容性興奮性シナプス伝達…末梢からの情報の直接入力
介在性興奮性シナプス伝達・介在性抑制性シナプス伝達…Vc 周囲からのシナプス伝達入力

よるリン酸化を受ける^{27,28)}。近年、シナプス伝達における PGE₂ と TRPV1 チャンネルとの相互作用を実証する報告が増えている。PGE₂ は、末梢侵害受容器末端¹¹⁾ および後根神経節ニューロンの EP1 受容体を活性化することによって TRPV1 チャンネルを感作する²⁹⁾。さらに、TRPV1 チャンネルは、一次感覚神経の PGE₂ 誘発活性化を媒介する^{30,31)}。これにより、PGE₂ は、Vc 領域において EP1 受容体を介してシナプス前 TRPV1 チャンネルを感作・活性化し、結果的に神経伝達物質の放出を増強すると考えられる。しかし、これについてはまだ明らかにされていない。

今研究では、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: 図2A および sIPSC: 図2B) 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

本実験は愛知学院大学の動物実験指針に順次、日本薬理学会によって承認された実験動物の指導原則に従って実施した。実験は動物の苦痛を最小限にし、使用する動物の数をできる限り少なくして行った。

1. スライス作成

本実験では、Wistar 系雄性ラット (日本 SLC、3~5 週齢、50~100g) を用いた。脳幹スライスの水平断の作成方法は、以前に報告されている Han らの方法³⁾ を参考にして行った。ラットを 3 種混合麻酔で深麻酔し断頭した。三叉神経脊髄路核尾側亜核を含む脳幹部を摘出し、氷冷した低カルシウム人工脳脊髄液 (組成: sucrose, 260mM; KCl, 3.0mM; CaCl₂, 1.0mM; MgCl₂, 3.0mM; NaH₂PO₄, 1.25mM; D-glucose, 10mM; L-ascorbic acid, 0.4mM; NaHCO₃, 26mM; 95% O₂-5% CO₂ で通気し、pH を 7.4 に調節) に浸した。脳幹部から小脳を切除後、硬膜及び毛細血管を剥離し、延髄を摘出した。マイクロスライスカッター (Linear Slicer Pro 7, Dosaka, Kyoto, Japan、図3A) を用いて、脳幹の背側から約 1.2mm の深さに位置する三叉神経脊髄路核を含む、厚さ 400μm 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 (NaCl, 125mM; KCl, 2.5mM; CaCl₂, 2.0mM; MgCl₂, 1.3mM; NaH₂PO₄, 1.25mM; D-glucose, 12.5mM; L-ascorbic acid, 0.4mM; NaHCO₃, 25mM; 95% O₂-5%

CO₂ で通気し、pH を 7.4 に調節) 中に、34°C で 30~40 分間保温した (図3B) 後、室温 (25±2°C) 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 Hamill ら³²⁾ によって開発された whole-cell patch clamp 法を用いた。細胞膜にケイ酸ガラス毛細管 (Borosilicate Glass Capillaries, World Precision Instruments, Sarasota, Florida, USA) をギガオーム以上の高抵抗で密着させ、膜電位を -60mV に固定した後、電極内の細胞膜を破壊し、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 (25±2°C) で行った。

1) 実験装置について (図4, 5)

(1) 信号変換装置 (Power Lab 2/26, AD Instruments, 図4A)

記録された電流をデジタル化し、コンピューター上に表示するために使用した。

(2) オシロスコープ (SS-7804A, IWATHU、図4B)

ギガオーム・シール (1~10G Ω のシール抵抗) 完成時や whole-cell 完成時における電流応答を確認するために使用した。

(3) パッチクランプアンプ (AXOPATCH 200B, Axon Instruments, 図4C)

高感度の電流-電圧変換装置で演算増幅器と共に搭載されており、ピコもしくはナノオーダーの微小電流を記録するために使用した。

(4) 近赤外微分干渉顕微鏡 (BX-51WI, Olympus, Tokyo and C2741, Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan、図4D)

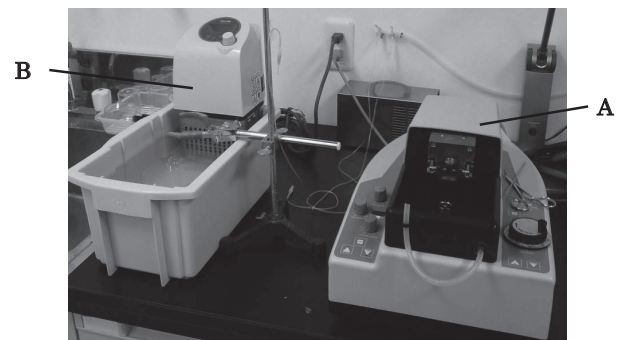


図3. スライス作製に必要な実験器具

A: マイクロスライスカッター、B: インキュベーター

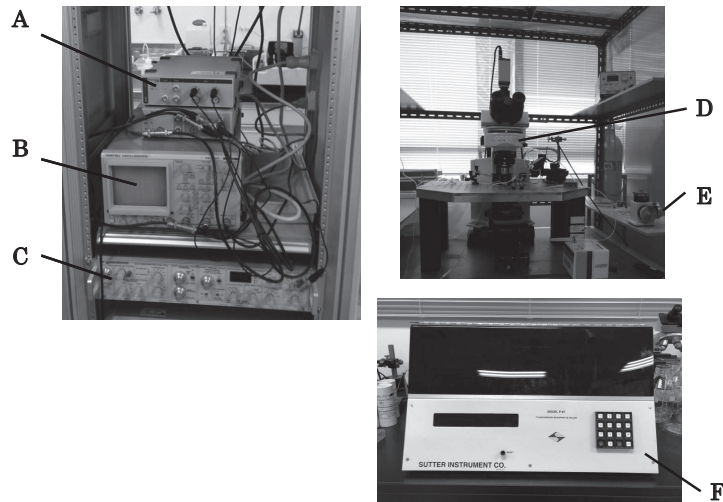


図4. パッチクランプ法に必要な実験器具

A; 信号変換装置、B; オシロスコープ、C; パッチクランプアンプ、D; 近赤外微分干渉顕微鏡、E; マイクロマニピュレーター、F; パッチ電極作製装置

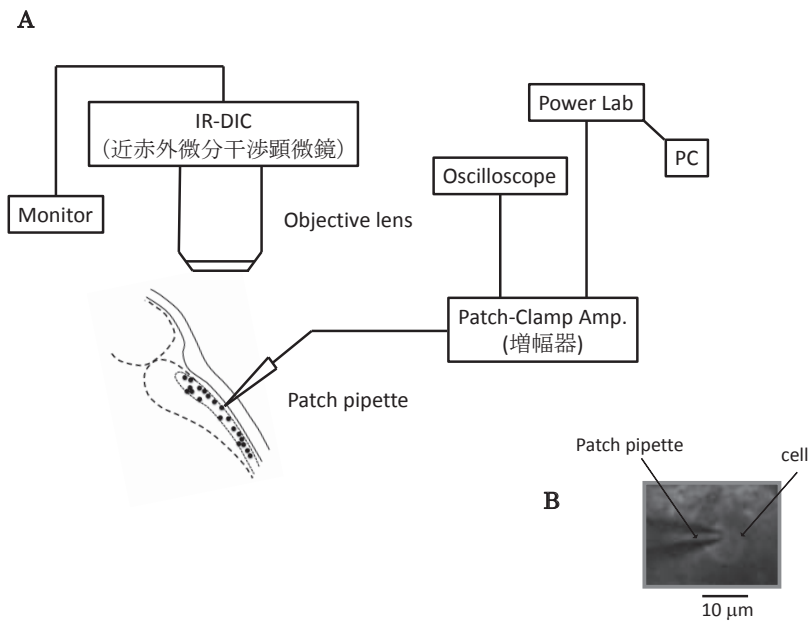


図5. パッチクランプ法の実験装置の略図 (A) と実際の顕微鏡像 (B)

Vcニューロンをモニター上に視覚化するために使用した。

(5) マイクロマニピュレーター (MHW-3, NARISHIGE、図4E)

顕微鏡下で1nm程度の精度でパッチ電極を操作するために用いた。

(6) パッチ電極作製装置 (FAMING/BROWN

MICROPIPETTE PULLER, P-97, Sutter Instruments、図4F)

以上の装置の略図と実際の顕微鏡像を図5に示す。

2) 実験手順について

3) 細胞の選定方法

作成した脳幹スライスを顕微鏡下の記録用チャンパーにナイロンメッシュを張ったステンレスのアンカーで固

定し、人工脳脊髄液 1~2ml/min 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:Substantia Gelatinosa、門から約 2mm 外側、長さ約 1mm、幅約 200μm) 領域を写し、直径約 10~15μm の細胞を選択した。

(1) whole-cell の確立手順

- ① パッチ電極内に電極内液 (組成: CsCl, 140mM; CaCl₂, 2mM; MgATP, 2mM; EGTA, 10mM; HEPES, 5mM; pH 7.3 CsOH で調整) を、ミリポアフィルター (Millex-LG, Merck Millipore, Billerica, MA, USA) を通して充填し、電極ホルダー (CV203BUHEDSTAGE, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) に装着した。
- ② Current-clamp モードにおいて、先端抵抗が 4~6MΩ のパッチ電極を陽圧にしながら細胞の膜に付着させた。
- ③ パッチ電極内を陰圧にしてギガオーム・シールを完成させた。
- ④ Voltage-clamp モードに切り替えて膜電位を -60mV に固定し、zapping (0.5~50ms の過分極パルス) により、パッチ膜を破り whole-cell を完成させた。

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 (6, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione, 10μM) の灌流下で行った。

2) sEPSC

sEPSC の記録は、GABA_A 受容体遮断薬である picrotoxin (100μM) 及びグリシン受容体遮断薬である strychnine (strychnine nitrate, 1.0μM) の灌流下で行った。

4. 使用薬物

使用薬物は以下のとおりである。それぞれの薬物は以前の報告に従って適切な濃度で用いた^{17, 21, 33, 34}。

- ・ AMG9810 ((2E)-N-(2, 3-Dihydro-1, 4-benzodioxin-6-yl)-3-[4-(1, 1-dimethylethyl)phenyl]-2-propenamide; TRPV1 チャンネル遮断薬, 0.1μM, Wako Pure Chemical, Osaka, Japan),
- ・ Capsaicin (a TRPV1 チャンネル作動薬, 0.1, 0.3, 1.0μM, Sigma, St. Louis, MO, USA),
- ・ DNQX (6, 7-dinitroquinoxaline-2, 3-dione; non-NMDA 受容体遮断薬, 10μM, R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA),

- ・ PGE₂ (1.0, 5.0, 10.0μM, R&D Systems Inc.),
- ・ picrotoxin (GABA_A 受容体遮断薬, 100μM, Wako Pure Chemical)
- ・ strychnine (strychnine nitrate; glycine 受容体遮断薬, 1.0μM, Wako Pure Chemical)

Capsaicin はまずエタノールに溶解し、さらにその溶解したもの PGE₂ はジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解した後、aCSF で希釈した。このときエタノールと DMSO の濃度は (0.1% 未満) は膜電流に影響しなかった。他の薬物は、直接 aCSF に溶解した。PGE₂ は全ての実験で 5 分間適用した。薬物灌流開始から、薬物がスライスに到達するまでの時間は約 1 分であった。

5. データ解析および統計処理

膜電流のシグナルはパッチクランプ増幅器 (Axopatch200B, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) を使い、4kHz で記録した (PowerLab, AD

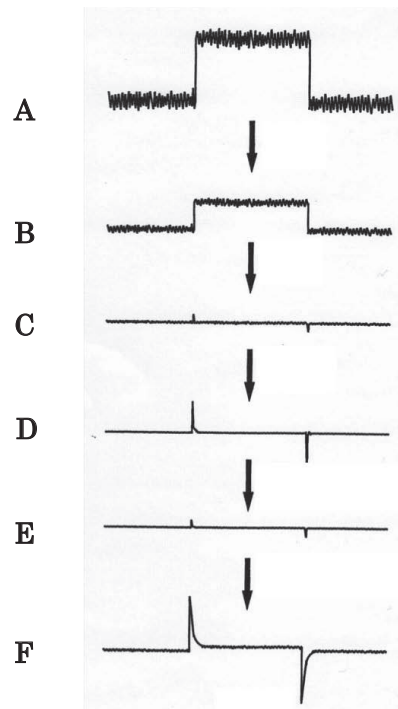


図 6. whole-cell patch clamp 完成までのオシロスコープ上での波形の変化

- (A) パッチ電極を灌流液に挿入し矩形波を通电した時の波形
- (B) 細胞表面にパッチ電極を付着させたときの波形
- (C) 陰圧をかけ、細胞膜とパッチ電極を密着させた時の波形
- (D) Voltage-Clamp モードに切り替えて膜電位を -60mV に固定した時の波形
- (E) zapping して whole-cell を完成させた時の波形
- (F) whole-cell 完成時の波形

Instruments, Cattle Hill, Australia)。データ解析には Chart5 (AD Instruments, Foster City, CA, USA)、Origin ソフト (Origin Lab, Northampton, MA, USA) を用いた。記録電流には 5pA の電流雑音が混在するので、sIPSC 及び sEPSC の解析にはこれを超える電流を計測に用いた。sIPSC と sEPSC の振幅および発射頻度の測定の記録は各測定時点において 1 分間行った。それぞれの波形は、薬物適用前 (control)、薬物適用後 4~5 分 (薬物適用中)、薬物適用終了後約 10 分 (washout) を計測した。又、波形の発生間隔 (Inter Event Interval:IEI) と振幅 (Amplitude) の累積曲線も算出した。測定された数値は、平均±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 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。図7A, B は実際に用いた水平断脳幹スライスとその顕微鏡像であり、図7C は図7B のトレース画面上に細胞の位置 (代表例、n=19) を

プロットしたものである。今回の実験で用いた細胞は Vc 領域の SG 内あるいはその周辺に広範囲に分布していた。

2. sIPSC に対する Capsaicin の作用

興奮性シナプス伝達を遮断する DNQX (10 μ M) の存在下で、24 個の Vc ニューロンで sIPSC に対する Capsaicin (0.1, 0.3, 1.0 μ M) の効果を調べた。保持電位を -60mV に固定すると、sIPSC は内向き電流として記録できた。この時の sIPSC の平均振幅および頻度は、それぞれ 38.2 ± 15.0 pA および 1.41 ± 0.13 Hz (n=24) であった。sIPSC は、picrotoxin (100 μ M) および strychnine (1.0 μ M) を同時に適用することで完全に消失した (図示せず)。

図8A は、ニューロン中の sIPSC に対する Capsaicin (0.3 μ M) の効果を示す。Capsaicin を適用することで sIPSC の頻度を増加させたが、振幅に影響を与えなかった。sIPSC の頻度は、washout 開始 10 分までにコントロールレベルまで戻った。図8B は図8A の同じニューロン内の sIPSC の Inter Event Interval (IEI) および振幅の累積曲線を示す。IEI の横軸は、発生間隔時間を示し、縦軸はその累積確率を示す。Capsaicin の適用によって確率曲線が有意に左にシフトした ($P < 0.01$ 、

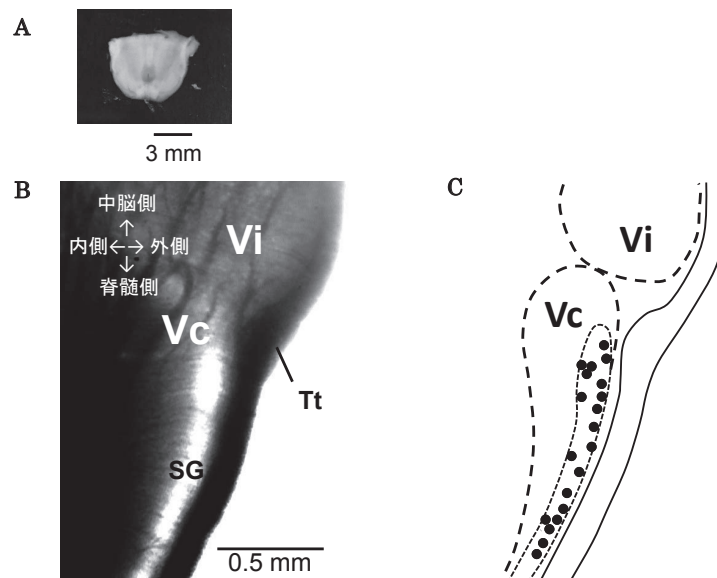


図7. 脳幹スライスの画像と細胞の分布

(A) 水平断脳幹スライス像

(B) 三叉神経脊髄路核の顕微鏡像

(C) 記録を行った細胞の位置の例 (n=19)

略語: Vi; 三叉神経脊髄路核中間亜核、Vc; 三叉神経脊髄路核尾側亜核、SG; 膠様質、Tt; 三叉神経核

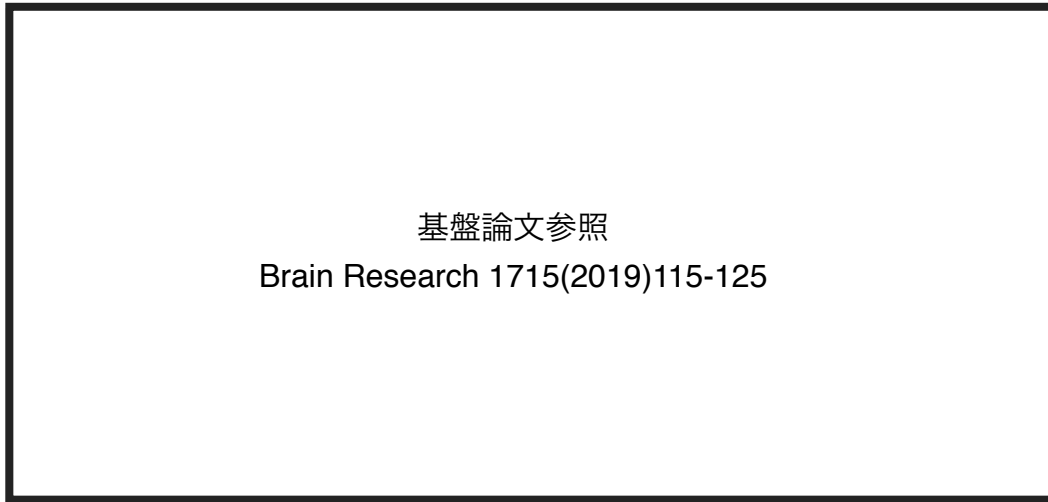


図 8. Vc ニューロンにおける sIPSC に対する Capsaicin の作用

- (A) コントロール時及び Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
(B) (A) におけるニューロンの inter-event interval (IEI) および振幅の累積確率 (C) Capsaicin 灌流時の sIPSC の頻度と振幅の相対変化
値は平均 \pm 標準誤差で示す (0.1 μ M: n=7, 0.3 μ M: n=7, 1.0 μ M: n=10)
** : P<0.01, * : P<0.05, n.s.; not significant vs. control (Bonferroni 多重比較)

Kolmogorov-Smirnov 検定)。振幅の累積曲線の横軸は波形の大きさを示し、縦軸はその累積確率を示している。Capsaicin の適用によって振幅の累積曲線は変わらなかった (P>0.05, Kolmogorov-Smirnov 検定)。Capsaicin の適用時における相対的变化を図8Cのグラフに示す。頻度において低濃度 (0.1 μ M) の Capsaicin は効果がなかったが、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。sIPSC の振幅は濃度を増やすと増加する傾向がみられたが有意な差はなかった。

3. sEPSC に対する Capsaicin の作用

抑制性シナプス伝達を遮断する picrotoxin (100 μ M) および strychnine (1.0 μ M) の存在下で、18 個の Vc ニューロンで Capsaicin (0.1, 0.3, 1.0 μ M) の sEPSC への効果を調べた。コントロールとして、sEPSC の平均振幅は 33.6 \pm 8.5pA であり、周波数は -60mV の保持電位で 0.94 \pm 0.16Hz (n=18) であった。sEPSC は DNQX (10 μ M) によって遮断された (図示せず)。

sEPSC に対する Capsaicin の効果は、sIPSC に対するものと同様であった。代表例を図9Aに示す。Capsaicin (0.3 μ M) の適用は、振幅に影響を与えずに sEPSC の頻度を増加させた。sEPSC の頻度は、washout 開始 10 分までにコントロールレベルまで戻った。IEI の累積曲線は Capsaicin (P<0.01, Kolmogorov-Smirnov 検定) の適用で左にシフトしたが、振幅の累積

曲線は変化しなかった (P>0.05, Kolmogorov-Smirnov 検定、図9B)。Capsaicin の適用時における相対的变化を図9Cのグラフに示す。sEPSC の頻度は濃度依存的に増加したが、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

TRPV1 チャンネルの競合的拮抗薬である AMG9810 の Capsaicin 誘発性シナプス伝達の促進に対する効果を調べた。Capsaicin を繰り返し適用するとニューロンの反応が著しく低下することが報告されている^{22,27} (図15, 16も参照)。したがって、Capsaicin を各ニューロンに1回適用し、AMG9810の有効性を非存在下または存在下でそれぞれ異なるニューロン群間で評価した。図10Aは、AMG9810の非存在下または存在下でのsIPSCに対するCapsaicinの効果を示す。AMG9810はsIPSCの頻度に対するCapsaicinの促進効果に拮抗した (Capsaicin: 162.3 \pm 8.6% n=7, AMG9810+Capsaicin: 110.4 \pm 15.1% n=9, P<0.05 vs. Capsaicin、図10B)。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 (Capsaicin: 266.7 \pm 31.5% n=6 および AMG9810+Capsaicin: 155.2 \pm 27.7% n=6, P<0.05 vs. Capsaicin、図10C, D)。またAMG9810単独では、sEPSCs および sIPSCs に影響を及ぼさなかった。

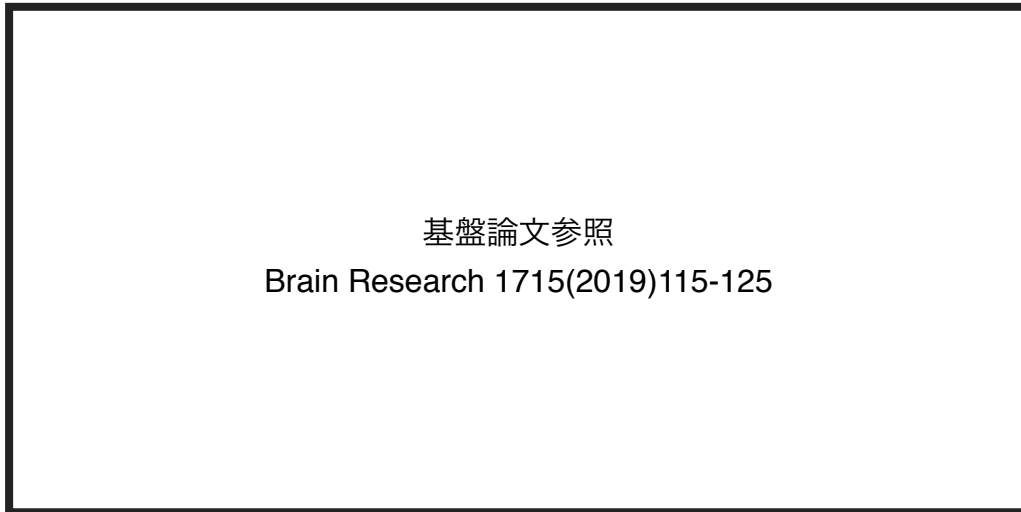


図 9. Vc ニューロンにおける sEPSC に対する Capsaicin の作用

- (A) コントロール時及び Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位:-60mV)
 (B) (A) におけるニューロンの inter-event interval (IEI) および振幅の累積確率 (C) Capsaicin 灌流時の sEPSC の頻度と振幅の
 相対変化
 値は平均 \pm 標準誤差で示す (0.1 μ M : n=6, 0.3 μ M : n=6, 1.0 μ M : n=6)
 ** : P<0.01、* : P<0.05、n.s.; not significant vs. control (Bonferroni 多重比較)

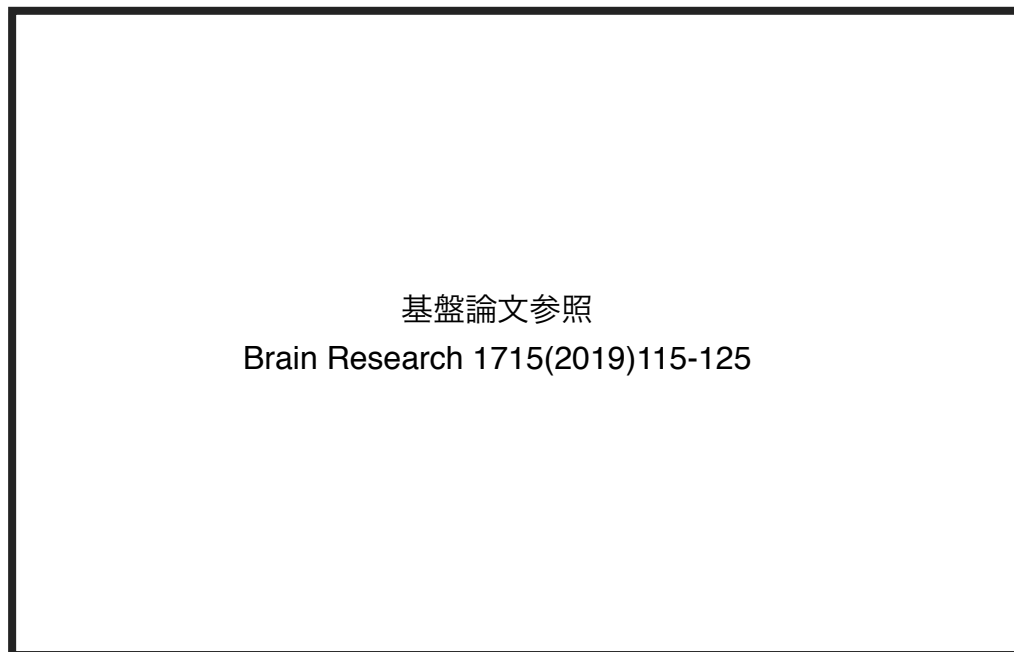


図 10. Capsaicin の促進作用に対する TRPV1 チャンネル遮断薬の作用

- (A) コントロール時、Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時と AMG9810n (0.1 μ M) 存在下でのコントロール時、Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時の
 sIPSC の記録 (保持電位:-60mV)
 (B) sIPSC の頻度と振幅の相対変化
 値は平均 \pm 標準誤差で示す (Cap : n=7, AMG+Cap : n=9) Capsaicin (0.3 μ M) のデータは、図7C のデータと同じ
 (C) コントロール時、Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時と AMG9810n (0.1 μ M) 存在下でのコントロール時、Capsaicin (0.3 μ M) 灌流時の
 sIPSC の記録 (保持電位:-60mV)
 (D) sEPSC の頻度と振幅の相対変化
 値は平均 \pm 標準誤差で示す (Cap : n=6, AMG+Cap : n=6) Capsaicin (0.3 μ M) のデータは、図8C のデータと同じ
 ** P<0.01 vs. control (paired t-test), # P<0.05 vs. control (unpaired t-test)

5. Capsaicin のシナプス後膜への作用

Vc ニューロンにおける自発的シナプス伝達に対する Capsaicin の促進効果に加えて、高濃度 (1.0 μ M) の Capsaicin は、Vc ニューロンの一部に (23 個のニューロンのうちの 12 個のニューロン) シナプス後膜への影響を及ぼした。全 25 個のニューロンの低濃度 (0.1 μ M では 12 個、0.3 μ M では 13 個) では内向き電流は誘発されなかった。図 11A に示すように、Capsaicin (1.0 μ M) の灌流は、適用開始後約 1~2 分でピークになる内向き電流を誘発した。AMG9810 (0.1 μ M) の存在下では、12 個のニューロンのうち 5 個に Capsaicin がシナプス後膜への影響を及ぼした。図 11B は、内向き電流の平均振幅をまとめたものである。Capsaicin 誘発性の内向き電流は、AMG9810 で 29.1 ± 6.2 pA (n=5) であり、AMG9810 非存在下 (49.2 ± 13.4 pA, n=12, P>0.05) 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

TRPV1 チャンネルが PGE₂ の作用に関与することを明らかにするために、TRPV1 チャンネル遮断薬が自発性シナプス伝達に対する PGE₂ の促進効果を抑制するかどうかを調べた。以前に示したように PGE₂ (5.0 μ M) の適用は sIPSC と sEPSC の両方を促進した¹⁷⁾ (図 12, 図 13)。sIPSC の頻度はコントロールの $200.0 \pm 17.3\%$ (n=8, P<0.01 vs.control) に、sEPSC の頻度は $215.8 \pm 34.2\%$ (n=8, P<0.01 vs.control) に増加した。いずれの場合も、振幅およびベースライン電流は変化しなかった。AMG9810 (0.1 μ M) の存在下では、PGE₂ (5.0 μ M) は依然として sIPSC の頻度 ($135.4 \pm 9.5\%$ n=8, P<0.01

vs.control) および sEPSC の頻度 ($133.5 \pm 15.4\%$ n=8, P<0.01 vs.control) は増加した。しかし、その大きさは AMG 9810 非存在下よりも有意に小さかった (図 12B, 図 13B)。

さらに高濃度 (10.0 μ M) の PGE₂ がシナプス後膜への影響を及ぼすか、繰り返し適用することで脱感作用を示すかどうかを調べた。結果、PGE₂ はすべての細胞で内向き電流は誘発しなかった (n=7)。さらに約 10 分間隔で繰り返し PGE₂ を適用したところ、sIPSC と sEPSC とともに頻度を促進した (図 14)。sIPSC の頻度の平均値は、1 回目の適用についてはコントロールの $267.0 \pm 49.0\%$ で、2 回目の適用についてはコントロールの $262.5 \pm 56.8\%$ であった (n=4, 図 14B)。sEPSC の頻度は、1 回目の適用は $267.7 \pm 48.8\%$ および 2 回目の適用はコントロールの $289.0 \pm 51.4\%$ であった (n=3, 図 14D)。したがって PGE₂ は脱感作を誘発しないと考えられる。

次に 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、自発性シナプス伝達に対する PGE₂ の効果を調べた (図 15, 図 16)。Capsaicin (0.3 μ M) を各ニューロンに 10-12 分間の間隔で 2 回適用するとシナプス伝達に対する 2 回目の Capsaicin の効果は、9 個のニューロンにおける 1 回目の Capsaicin の効果と比較して有意に減少した (sIPSC:n=4, 図 15A, 15B および sEPSC:n=5, 図 16A, 16B)。脱感作ニューロンでは、PGE₂ (5.0 μ M) は sIPSC の頻度をコントロール (n=4, 図 15C, 図 15D) の $130.0 \pm 11.3\%$ に、sEPSC の頻度をコントロールの $130.1 \pm 10.2\%$ (n=5, 図 16C, 図 16D) に増加した。この PGE₂ 誘発性の促進効果は、コントロー



図 11. Capsaicin のシナプス後膜への作用

(A) Capsaicin (1.0 μ M) 灌流時と AMG9810n (0.1 μ M) 存在下での Capsaicin (1.0 μ M) 灌流時の記録 (保持電位 :-60mV)
(B) Capsaicin 誘発内向き電流のピーク振幅の相対変化

値は平均 \pm 標準誤差で示す (Cap : n=12, AMG+Cap : n=5)

** : P<0.01, n.s.; not significant vs. control (unpaired t-test)



図 12. PGE₂ の促進作用に対する sIPSC における TRPV1 チャンネル遮断薬の作用

- (A) コントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時と AMG9810n (0.1μM) 存在下でのコントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) sIPSC における頻度の相対変化
- (C) sIPSC における振幅の相対変化
値は平均±標準誤差 (n=8) で示す ** P<0.01 vs. control (paired *t*-test), ## P<0.01, n.s.; not significant (unpaired *t*-test)

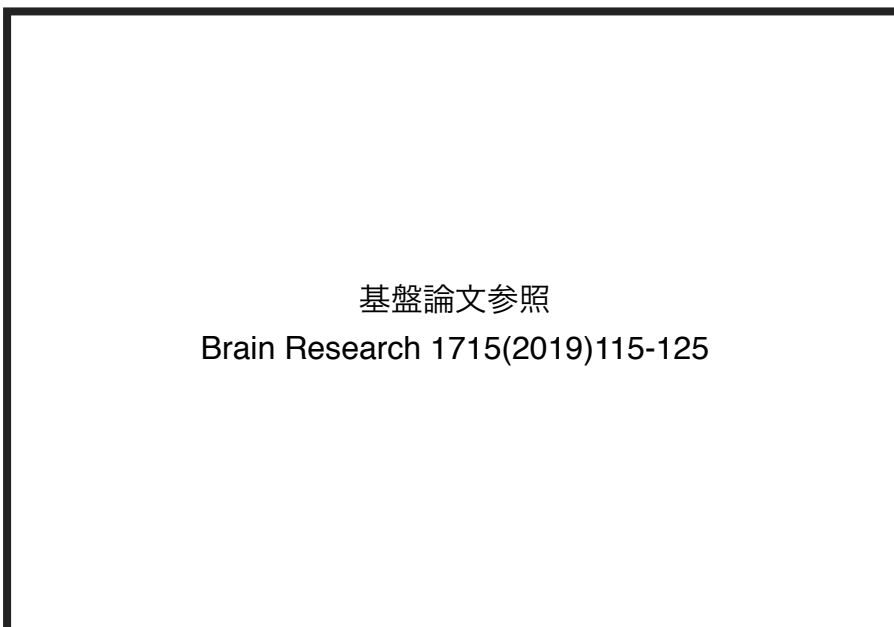


図 13. PGE₂ の促進作用に対する sEPSC における TRPV1 チャンネル遮断薬の作用

- (A) コントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時と AMG9810n (0.1μM) 存在下でのコントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) sEPSC における頻度の相対変化
- (C) sEPSC における振幅の相対変化
値は平均±標準誤差 (n=8) で示す ** P<0.01 vs. control (paired *t*-test), # P<0.05, n.s.; not significant (unpaired *t*-test)

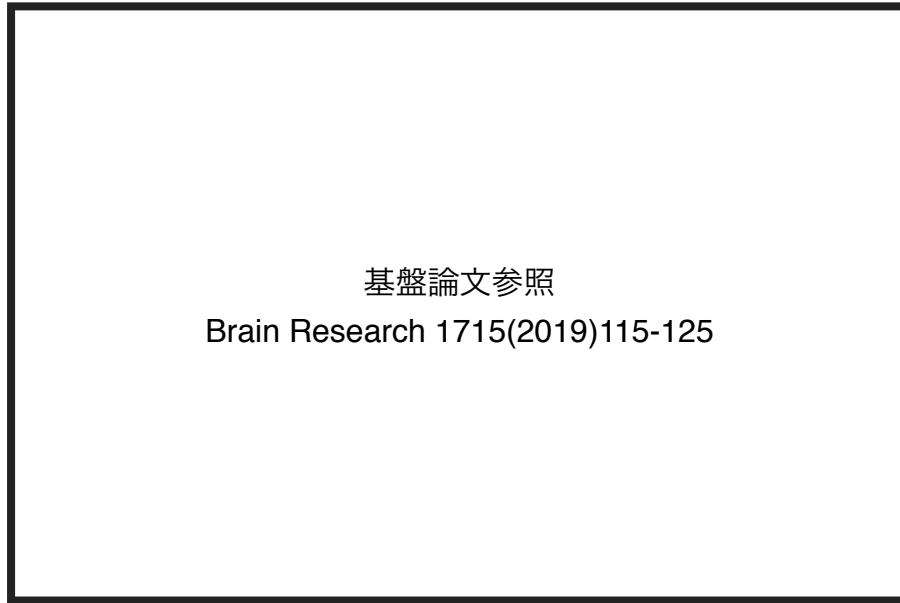


図 14. Vc ニューロンにおける高濃度の PGE₂ の反復適用の影響

- (A) コントロール時、1 回目の PGE₂ (1st PGE₂ 10.0μM) 灌流時と 2 回目の PGE₂ (2nd PGE₂ 10.0μM) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) 1 回目および 2 回目の PGE₂ (n=4) による sIPSC における頻度の相対的变化。
- (C) コントロール時、1 回目の PGE₂ (1st PGE₂ 10.0μM) 灌流時と 2 回目の PGE₂ (2nd PGE₂ 10.0μM) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (D) 1 回目および 2 回目の PGE₂ (n=3) による sEPSC における頻度の相対的变化。
値は平均±標準誤差で示す ** P<0.01 vs. control (paired *t*-test), n.s.; not significant (unpaired *t*-test)

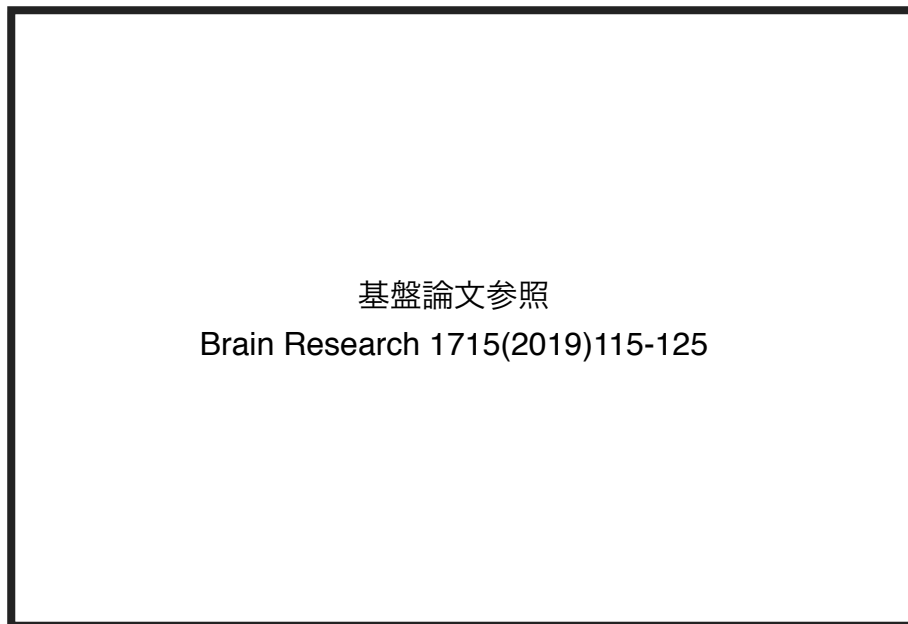


図 15. Capsaicin の反復適用によって脱感作された Vc ニューロンにおける sIPSC に対する PGE₂ の効果

- (A) コントロール時、1 回目の Capsaicin (1st Cap 0.3μM) 灌流時と 2 回目の Capsaicin (2nd Cap 0.3μM) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) 1 回目および 2 回目の Capsaicin (n=4) による sIPSC における頻度の相対的变化。
- (C) コントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時と脱感作状態でのコントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (D) PGE₂ による sIPSC の頻度の相対的变化 (正常ニューロン: n=8, 脱感作ニューロン: n=4)
値は平均±標準誤差で示す * P<0.05, ** P<0.01 vs. control (paired *t*-test), # P<0.05, ## P<0.01 (unpaired *t*-test)

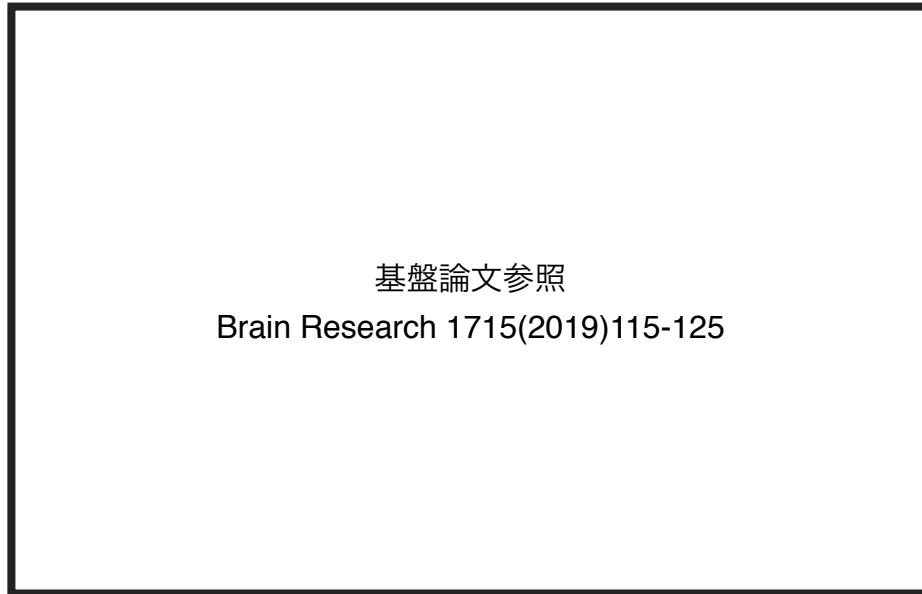


図 16. Capsaicin の反復適用によって脱感作された Vc ニューロンにおける sEPSC に対する PGE₂ の効果

- (A) コントロール時、1 回目の Capsaicin (1st Cap 0.3μM) 灌流時と 2 回目の Capsaicin (2nd Cap 0.3μM) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) 1 回目および 2 回目の Capsaicin (n=4) による sEPSC における頻度の相対的变化。
- (C) コントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時と脱感作状態でのコントロール時、PGE₂ (5.0μM) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (D) PGE₂ による sEPSC の頻度の相対的变化 (正常ニューロン: n=8、脱感作ニューロン: n=5)
 値は平均±標準誤差で示す ** P<0.01 vs. control (paired t-test), # P<0.05, ## P<0.01 (unpaired t-test)

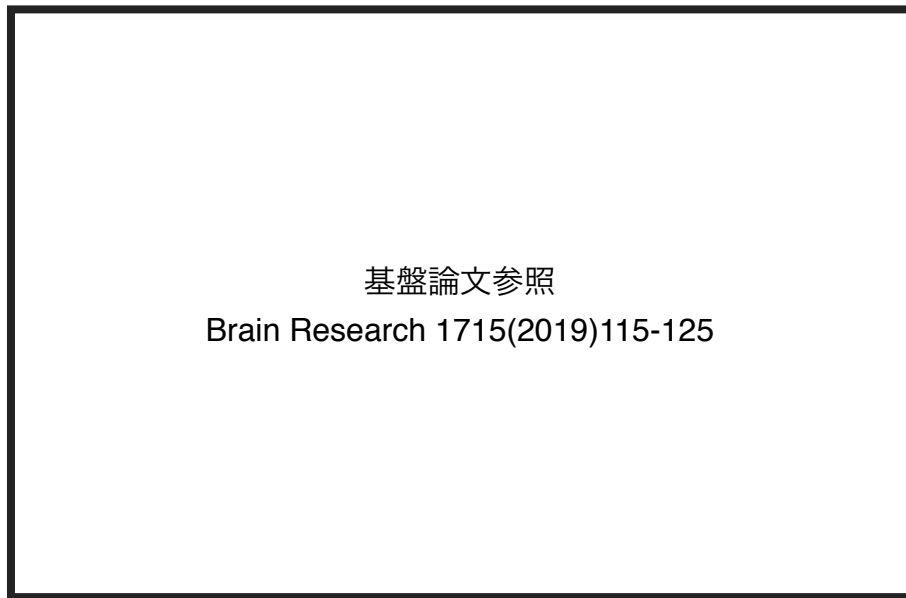


図 17. Vc ニューロンにおける PGE₂ および Capsaicin の共通適用の効果

- (A) コントロール時、PGE₂ (PGE₂ 1.0μM) 灌流時、Capsaicin (Cap0.1μM) 灌流時、PGE₂+Capsaicin (PGE₂ 1.0μM+Cap0.1μM) 灌流時の sIPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (B) コントロール時、PGE₂ (PGE₂ 1.0μM) 灌流時、Capsaicin (Cap0.1μM) 灌流時、PGE₂+Capsaicin (PGE₂ 1.0μM+Cap0.1μM) 灌流時の sEPSC の記録 (保持電位: -60mV)
- (C) sIPSC の頻度の相対的变化 (n = 4)
- (D) sEPSC の頻度の相対的变化 (n = 3)
 値は平均±標準誤差で示す。# P<0.05, n.s.; not significant (Bonferroni 多重比較)

ルと比較して有意であったが、正常なニューロンよりも有意に小さかった。

最後に自発性シナプス伝達に対する PGE₂ と Capsaicin の低濃度での併用効果を調べた (図17)。薬剤は、PGE₂ (1.0μM)、Capsaicin (0.1μM)、および PGE₂ (1.0μM) + Capsaicin (0.1μM) の順に同一細胞に適用した。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。これらの薬物の共適用は、sEPSC の 10 個のうち 4 個のニューロンおよび sIPSC の 6 個のニューロンのうち 3 個で頻度促進作用を示した。7 個の応答ニューロンにおいて、sIPSC の頻度はコントロールの 240.5 ± 27.0% (n=4 P < 0.05、図17C) および sEPSC 頻度はコントロールの 215.3 ± 30.0% に有意に増加した (n=3 P < 0.05、図17D)。その程度は sIPSC と sEPSC で類似していた。残りの 9 個のニューロン (sIPSC は 6 個、sEPSC は 3 個) は、PGE₂ と Capsaicin の共適用に反応しなかった。

IV. 考 察

プロスタノイドは、シクロオキシゲナーゼ経路を介したアラキドン酸代謝物の産物である。その中で、PGE₂ は疼痛シグナルの伝達過程に最も大きな影響を与える¹⁵⁾。TRPV1 チャンネルは、元々、感覚ニューロン上の Capsaicin に対する受容体として知られており、疼痛を誘発する化学的および物理的刺激のポリモーダル受容器として機能する²⁴⁾。最近では、それらは有害な刺激の分子輸送器として機能すると報告されている。

本研究の主な結果は以下のとおりである。(1)

Capsaicin による TRPV1 チャンネルの活性化は、SG 領域に位置する Vc ニューロンにおける sEPSC および sIPSC の頻度を増加させた。(2) 自発的シナプス伝達に対する PGE₂ の促進効果は、TRPV1 チャンネルブロッカーまたは Capsaicin による脱感受ニューロンによって減少した。(3) Capsaicin および PGE₂ のいずれの薬物も効果を及ぼさない低濃度の共適用で自発性伝達を促進した。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。

1. Capsaicin は、シナプス前 TRPV1 チャンネルを介して興奮性および抑制性神経伝達物質の自然放出を増加させる

TRPV1 陽性ニューロンは、ラットにおいて三叉神経節および Vc に分布していることが実証されている¹⁸⁾。TRPV1 チャンネルの染色は、Vc の末端および神経繊維でも見られる¹⁹⁾。したがって、Vc 領域で発現される TRPV1 チャンネルが口腔侵害受容伝達の調節において何らかの役割を果たす可能性がある。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

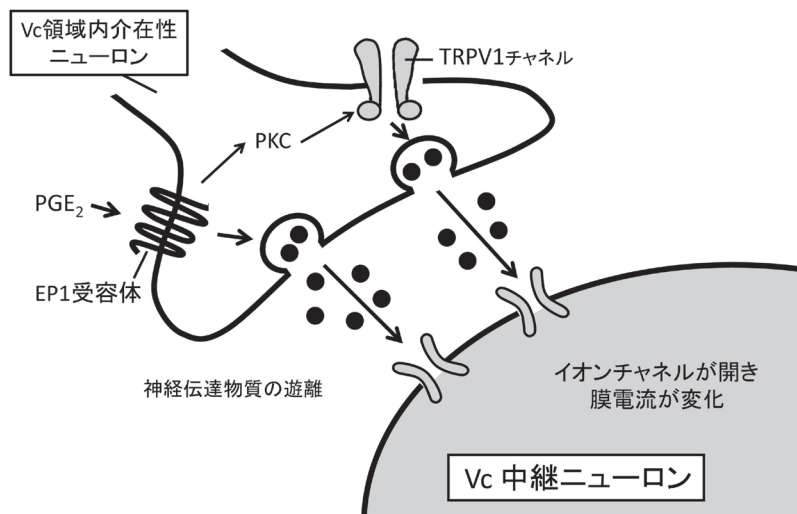


図 18. Vc ニューロンにおける PGE₂ および TRPV1 チャンネルの相互作用の模式図

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。我々の結果は、Vcニューロン^{21,22)}および孤束核 (NTS)^{33,35-37)} および脊髄³⁸⁾の他のニューロンにおいて以前報告されたものと一致する。さらに、TRPV1チャンネルの活性化による神経伝達物質の放出の促進は、テトロドトキシンまたはカドミウムの存在下で起こることが実証されている^{21,33,35)}。これは、TRPV1チャンネルを介したカルシウムの比較的高い透過性が、シナプス前カルシウム濃度を上昇させ、自発的なシナプス伝達を誘発・促進することを示している^{39,40)}。

DavisとNorth²¹⁾は、マウスVcニューロンにおいてTRPV1チャンネルが活性化されたときのEPSCの振幅の増加を報告した。この結果は、シナプス前TRPV1チャンネルの活性化が、ラットのNTSニューロンにおけるシナプス前P2X受容体の活性化と同様に、単一放出部位に結合した複数の易放出性の小胞に同期したエキソサイトーシスを誘発するメカニズムによって説明された⁴¹⁾。一方、本研究では振幅の有意な増加は観察されなかった。この不一致の理由は不明である。1つの可能性は、記録条件の違いである。DavisとNorth²¹⁾は、Na⁺またはCa²⁺チャンネルの遮断薬の存在下でEPSCを記録したが、我々は遮断薬なしで記録した。神経伝達物質の同期多尖状放出は、彼らの記録条件と比較して、我々の記録条件において確率的に高い可能性がある。これは、CapsaicinがsEPSCおよびsIPSCの振幅を増加させることができなかったという本実験の結果をもたらす得る。しかし、Capsaicinは、sEPSCおよびsIPSC(図8および図9)の振幅を増加させる傾向を有し、内向き電流を低濃度(0.1および0.3 μ M)では観察されなかったが高濃度(1.0 μ M)では誘発した(図11)。これらの結果は、Capsaicinが恐らく高濃度でシナプス後膜への作用を有し、sEPSCおよびsIPSCの振幅に影響を及ぼす可能性があることを示唆している。シナプス後膜上のCapsaicinの有効濃度はシナプス前終末のそれよりも高かった、あるいはシナプス後膜のTRPV1チャンネルは、シナプス前終末に比べて希薄または不均一に分布していた可能性がある。

さらに、TRPV1チャンネルの活性化が抑制性伝達を促進するということが強調されるべきである。Vcニューロンにおいて、興奮性伝達は、主にグルタミン酸により、また抑制性伝達はGABA/グリシンによって媒介される^{3,17)}。本研究は、TRPV1チャンネルが、グルタミン酸作動性の興奮性末端だけでなく、Vcニューロン中のGABA作動性/グリシン作動性の抑制性末端にも存在し、ニューロ

ンの基礎活性を調整してシナプス伝達を修飾することを示唆している。

2. PGE₂は、シナプス前TRPV1チャンネルを活性化または感作する

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。Gqタンパク質共役型のEP1受容体はPGE₂の促進作用と相関することが示されている⁴²⁾。我々は、シナプス前EP1受容体が、SG領域のVcニューロンにおける軸索末端からの興奮性および抑制性伝達物質の両方の自発的放出におけるPGE₂による増強に寄与することを実証した¹⁷⁾。ATPおよびブラジキニンのような炎症性メディエーターは、プロテインキナーゼC(PKC)依存性でTRPV1チャンネルの活性化を増強する^{43,44)}。したがって、PGE₂はシナプス前EP1受容体を活性化し、下流のPKC活性化を介してVcニューロンのTRPV1チャンネルを感作すると仮定されている。TRPV1チャンネルのPKC誘発の活性化は、後根神経節ニューロン²⁹⁾および侵害受容器終末¹¹⁾においても報告されている。一方、PGE₂は、TRPV1チャンネル遮断薬の存在下またはCapsaicinによる脱感作ニューロンでは、依然として小さいが有意な興奮作用を示した。まとめると、本研究はPGE₂の作用機序として(1)PGE₂は、以前に提案されているように、EP1受容体によって活性化されたCa²⁺流入によって神経伝達物質の放出を直接促進すること¹⁷⁾、(2)PGE₂は、EP1受容体-PKC経路を介したTRPV1チャンネルの活性化によって伝達物質の放出を間接的に増加させることという2つの可能性が考えられた。

さらに、約半数のニューロンでは、低濃度のPGE₂およびCapsaicinの共適用により自発的なシナプス伝達が促進したが、残りのニューロンは反応しなかった。これは、シナプス前ニューロンが機能的に同一ではないため、またはVcニューロンにシナプス前終末におけるTRPV1チャンネルおよびEP1受容体の不均一な分布による可能性がある^{3,19)}。

孤束核管求心路に発現するTRPV1チャンネルの活性化は孤束核のシナプス伝達に影響を及ぼす。低濃度のカプ

サイシンを適用した場合、弧束核誘発性グルタミン酸の放出を促進するが高濃度では逆に抑制することが実証されている^{33,45)}。

Vcにおける三叉神経求心性末端は TRPV1 チャンネルを発現していることが示されているので^{18,19)}、それらの活性化が興奮性神経伝達物質の三叉神経誘発性の同期放出に影響すると推定される。しかし、本研究では、PGE₂が三叉神経誘発性 EPSC に効果がないという結果が既に得られているので PGE₂と TRPV1 チャンネルの間の相互作用をこのような同期放出で調べなかった¹⁷⁾。

3. PGE₂ はシナプス後膜の TRPV1 チャンネルと相互作用しない

高濃度の Capsaicin は、一部の Vc ニューロンにおいて内向き電流を誘導した。この結果は TRPV1 チャンネルのシナプス後膜の発現を示唆する。Capsaicin 誘発性内向き電流は、NTS⁴⁵⁾、Vc²²⁾ および脊髄³⁸⁾のニューロンにおいて以前に報告されている。PGE₂ は我々の以前の研究¹⁷⁾ および今回の研究で Vc ニューロンの sEPSC および sIPSC の基礎電流を変化させず、また振幅も変化させなかった。これにより PGE₂ に反応する受容体がシナプス後膜に分布している可能性は低いと考えられる。したがって、PGE₂ とシナプス後膜の TRPV1 チャンネルとの相互作用はないと考えられる。

V. まとめ

Vc が顔面領域から来る侵害受容性求心性シグナルの最も重要な中継部位であることは、一般的に知られている^{1,2)}。この領域におけるシナプス伝達の調節は、疼痛感覚を管理するための重要な因子の 1 つである。生理活性物質およびイオンチャンネルの関与を明らかにすることは、それらによる侵害受容伝達の調節を理解するために重要である。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 PGE₂ と TRPV1 チャンネルとの相互作用を明らかにした。これは顎顔面領域の疼痛治療への可能性を示唆するものと考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤な御指導と御校閲を賜りました歯科矯正学講座、恩師後藤滋巳教授ならびに宮澤健特殊診療科教授に深く感謝の意を示すと共に、日頃から御指導と御校閲を賜りました本学薬学部応用薬理学講座、恩師樋彰教授に深謝いたします。また、本研究

に際し御指導、御協力頂きました本学薬理学講座、大井義明准教授に謹んで感謝の意を表します。加えて、本研究にあたり御協力を頂きました本学薬学部応用薬理学講座の皆様、ならびに歯科矯正学講座の皆様に御礼を申し上げます。

文 献

- 1) Olszewski, J., 1950. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 92, 401-413.
- 2) Woda, A., 2003. Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. *J. Dent. Res.* 82, 764-768.
- 3) Han, S.-M., Ahn, D.-K., Youn, D.-H., 2008. Pharmacological analysis of excitatory and inhibitory synaptic transmission in horizontal brainstem slices preserving three subnuclei of spinal trigeminal nucleus. *J. Neurosci. Meth.* 167, 221-228.
- 4) Takemura, M., Sugiyo, S., Moritani, M., Kobayashi, M., Yonehara, N., 2006. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch. Histol. Cytol.* 29, 79-100.
- 5) Guy, N., Chalus, M., Dallel, R., Voisin, D.L., 2005. Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 21, 741-754.
- 6) Krishnan, V.: Orthodontic pain : from causes to management-a review. *Eur. J. Orthod.* 29: 170-179.2007
- 7) Sessle, B.J.: Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 11: 57-91.2000
- 8) Furstman, L., Bernick, S.: Clinical considerations of the periodontium. *Am. J. Orthod.* 61: 138-155.1972
- 9) Giannopoulou, C., Dudic, A., Kiliaridis, S.: Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children. *J. Pain* 7: 367-376.2006
- 10) Bishai, I., Coceani, F., 1992. Eicosanoid formation in the rat cerebral cortex. Contribution of neurons and glia. *Mol. Chem. Neuropathol.* 17, 219-238.

- 11) Kawabata, A., 2011. Prostaglandin E2 and Pain - An update. *Biol. Pharm. Bull.* 34, 1170-1173.
- 12) Hata, A.N., Breyer, R.M., 2004. Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation. *Pharmacol. Ther.* 103, 147-166.
- 13) McCullough, L., Wu, L., Haughey, N., Liang, X., Hand, T., Wang, Q., Breyer, R.M., Andreasson, K., 2004. Neuroprotective function of the PGE2 EP2 receptor in cerebral ischemia. *J. Neurosci.* 24, 257-268.
- 14) Wolfe, L.S., Coceani, F., 1979. The role of prostaglandins in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 41, 669-684.
- 15) Narumiya, S., Sugimoto, Y., Ushikubi, F., 1999. Prostanoid receptors: Structures, properties, and functions. *Physiol. Rev.* 79, 1193-1226.
- 16) Sugimoto, Y., Narumiya, S., 2007. Prostaglandin E receptors. *J. Biol. Chem.* 282, 11613-11617.
- 17) Mizutani, Y., Ohi, Y., Kimura, S., Miyazawa, K., Goto, S., Haji, A., 2015. Effects of prostaglandin E₂ on synaptic transmission in the rat spinal trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res.* 1625, 29-38.
- 18) Bae, Y.C., Oh, J.M., Hwang, S.J., Shigenaga, Y., Valtschanoff, J.G., 2004. Expression of vanilloid receptor TRPV1 in the rat trigeminal sensory nuclei. *J. Comp. Neurol.* 478, 62-71.
- 19) Yeo, E.J., Cho, Y.S., Paik, S.K., Yoshida, A., Park, M.J., Ahn, D.K., Moon, C., Kim, Y.S., Bae, Y.C., 2010. Ultrastructural analysis of the synaptic connectivity of TRPV1-expressing primary afferent terminals in the rat trigeminal caudal nucleus. *J. Comp. Neurol.* 518, 4134-4146.
- 20) Qiao, H., Gao, Y., Zhang, C., Zhou, H., 2015. Increased expression of TRPV1 in the trigeminal ganglion is involved in orofacial pain during experimental tooth movement in rats. *Eur. J. Oral Sci.* 123, 17-23.
- 21) Davies, A.J., North, R.A., 2009. Electrophysiological and morphological properties of neurons in the substantia gelatinosa of the mouse trigeminal subnucleus caudalis. *Pain* 146, 214-221.
- 22) Evans, M.S., Cheng, X., Jeffery, J.A., Disney, K.E., Premkumar, L.S., 2012. Sumatriptan inhibits TRPV1 channels in trigeminal neurons. *Headache* 52, 773-784.
- 23) Caterina, M.J., Leffler, A., Malmberg, A.B., Martin, W.J., Trafton, J., Petersen-Zeitz, K.R., Koltzenburg, M., Basbaum, A.I., Julius, D., 2000. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor. *Science* 288, 306-313.
- 24) Szallasi, A., Blumberg, P.M., 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol. Rev.* 51, 159-212.
- 25) Benham, C.D., Davis, J.B., Randall, A.D., 2002. Vanilloid and TRP channels: a family of lipid-gated cation channels. *Neuropharmacology* 42, 873-888.
- 26) Cortright, D.N., Szallasi, A., 2004. Biochemical pharmacology of the vanilloid receptor TRPV1. An update. *Eur. J. Biochem.* 271, 1814-1819.
- 27) Mandadi, S., Numazaki, M., Tominaga, M., Bhat, M.B., Armati, P.J., Roufogalis, B.D., 2004. Activation of protein kinase C reverses capsaicin-induced calcium-dependent desensitization of TRPV1 ion channels. *Cell Calcium* 35, 471-478.
- 28) Ross, R.A., 2003. Anandamide and vanilloid TRPV1 receptor. *Br. J. Pharmacol.* 140, 790-801.
- 29) Moriyama, T., Higashi, T., Togashi, K., Iida, T., Segi, E., Sugimoto, Y., Tominaga, T., Narumiya, S., Tominaga, M., 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol. Pain* 1:3.
- 30) Grace, M., Birrell, M.A., Dubuis, E., Maher, S.A., Belvisi, M.G., 2012. Transient receptor potential channels mediate the tussive response to prostaglandin E2 and bradykinin. *Thorax* 67, 891-900.
- 31) Kwong K., Lee L.Y., 2002. PGE2 sensitizes cultured pulmonary vagal sensory neurons to chemical and electrical stimuli. *J. Appl. Physiol.* 93, 1419-1428.
- 32) Hamill O.P., Marty A., Neher E., Sakmann B., Sigworth F.J.: Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells

- and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85-100.1981
- 33) Hofmann M.E., Andresen M.C., 2016. Vanilloids selectively sensitize thermal glutamate release from TRPV1 expressing solitary tract afferents. *Neuropharmacology* 101, 401-411.
- 34) Gavva, N.R., Tamir, R., Qu, Y., Klionsky, L., Zhang, T.J., Immke, D., Wang, J., Zhu, D., Vanderah, T.W., Porreca, F., Doherty, E.M., Norman, M.H., Wild, K.D., Bannon, A.W., Louis, J.C., Treanor, J.J., 2005. AMG 9810 [(E)-3-(4-t-Butylphenyl)-N-(2,3-dihydrobenzo[b][1,4]dioxin-6-yl)acrylamide], a novel vanilloid receptor 1 (TRPV1) antagonist with antihyperalgesic properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313, 474-484.
- 35) Jin, Y.H., Bailey, T.W., Li, B.Y., Schild, J.H., Andresen, M.C., 2004. Purinergic and vanilloid receptor activation releases glutamate from separate cranial afferent terminals in nucleus tractus solitarius. *J. Neurosci.* 24, 4709-4717.
- 36) Fawley J.A., Hofmann M.E., Andresen M.C., 2014. Cannabinoid 1 and transient receptor potential vanilloid 1 receptors discretely modulate evoked glutamate separately from spontaneous glutamate transmission. *J. Neurosci.* 34, 8324-8332.
- 37) Fenwick A.J., Wu S.-W., Reters J.H., 2014. Isolation of TRPV1 independent mechanisms of spontaneous and asynchronous glutamate release at primary afferent to NTS synapses. *Front. Neurosci.* Doi: 10.3389/fnins.2014.00006.
- 38) Yang, K., Kumamoto, E., Furue, H., Yoshimura, M., 1998. Capsaicin facilitates excitatory but not inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa of the rat spinal cord. *Neurosci. Lett.* 255, 135-138.
- 39) Eglen, R.M., Hunter, J.C., Dray, A., 1999. Ions in the fire: recent ion-channel research and approaches to pain therapy. *Trends. Pharmacol. Sci.* 20, 337-342.
- 40) Medvedeva, Y.V., Kim, M.S., Usachev, Y.M., 2008. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. *J. Neurosci.* 28, 5295-5311.
- 41) Shigetomi, E., Kato, F., 2004. Action potential-independent release of glutamate by Ca²⁺ entry through presynaptic P2X receptors elicits postsynaptic firing in the brainstem autonomic network. *J. Neurosci.* 24, 3125-3135.
- 42) Nakayama, Y., Omote, K., Kawamata, T., Namiki, A., 2004. Role of prostaglandin receptor subtype EP1 in prostaglandin E₂-induced nociceptive transmission in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res.* 1010, 62-68.
- 43) Sugiura, T., Tominaga, M., Katsuya, H., Mizumura, K., 2002. Bradykinin lowers the threshold temperature for heat activation of vanilloid receptor 1. *J. Neurophysiol.* 88, 544-548.
- 44) Tominaga, M., Wada, M., Masu, M., 2001. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98, 6951-6956.
- 45) Doyle M.W., Bailey T.W., Jin Y.-H., Andersen M.C., 2002. Vanilloid receptors presynaptically modulate visceral afferent synaptic transmission in nucleus tractus solitarius. *J. Neurosci.* 22, 8222-8229.

論文提出先：愛知学院大学大学院歯学研究科委員会
(名古屋市千種区楠元町 1-100)