

学 位 論 文 要 旨

氏名 萱野 智彦

題 目 : NGF 処置したラット背根神経節ニューロンの興奮性亢進

論文要旨 :

神経因性疼痛とは神経組織の損傷や圧迫などにより出現する痛みで、組織の損傷が治癒した後も持続するのが特徴である。神経因性疼痛の病態発生機構は複雑で、様々な生体内メディエーターが関わっていると考えられている。神経傷害に伴って、背根神経節 (Dorsal Root Ganglion, DRG) 内や脊髄腔で濃度上昇が確認されている神経成長因子 (Nerve Growth Factor, NGF) もその一つである。NGF は胎生期の感覚ニューロンの生存を支え、一次侵害受容ニューロンの特徴を司る表現型の発現に寄与する。しかし、成熟個体においては、末梢神経傷害後や炎症による痛覚過敏や、侵害受容ニューロンの感作に関わっていると考えられている。我々は、これまでに健康な成熟ラットから分離した背根神経節 (Dorsal Root Ganglion, DRG) ニューロンを NGF (100 ng/ml) 存在下で培養すると、一部のニューロンにおいて自発性活動電位や自発性の細胞内 Ca^{2+} 濃度 ($[Ca^{2+}]_i$) 変動の振動 ($[Ca^{2+}]_i$ fluctuation) が見られることを報告した。この自発性活動電位が $[Ca^{2+}]_i$ fluctuation を引き起こしていると考えられる。しかし、NGF 処置 DRG ニューロンにおいて NGF がどのようなメカニズムで細胞の興奮性を亢進させているか、また何が自発性活動電位を引き起こしているかは明らかではない。そこで、パッチクランプ法を用いて、この自発性活動電位の発生機構の解明を試みた。さらに、NGF が培養 DRG ニューロンに作用して自発性活動電位を生じさせていることは明らかであるが、形態的、機能的に多種多様な細胞体の集まりである DRG ニューロンのうち、どのタイプの DRG ニューロンに作用しているかは明らかではない。TRP チャネルは、様々な化学的、物理的刺激により活性化し、感覚受容機能に重要な役割を果たしている。TRP チャネルのサブタイプのうち、熱刺激や capsaicin に応答する TRPV1、冷刺激や icilin に応答する TRPA1/TRPM8 が発現している DRG ニューロンは侵害受容ニューロンだと考えられている。そこで TRP チャネルの発現様式を指標として、capsaicin と icilin を用いて DRG ニューロンのタイプ分けを試みた。

オンセルモードで自発性活動電位の有無を確認後、パッチ膜を破りホールセルモードに移行した。オンセルモードで自発性活動電位の発生が確認されたニューロンのうち 75% のニューロンで、-50 mV に膜電位したホールセル膜電位固定モードにおいても繰り返しの一過性内向き電流 (I_{sp}) が記録された。一方で、オンセルモードで自発性活動電位の発生がなかったニューロンでは、4.3% のニューロンでのみ I_{sp} を記録した。 I_{sp} は、電位依存性 Na^+ チャネル抑制薬である TTX (1 μ M) やリドカイン (1 mM)、また細胞外 Na^+ 濃度を減少 (154 mM から 100 mM) させることによって、全か無かの法則に従って可逆的に消失した。これらの結果から、膜電位固定下であることを考慮すると、 I_{sp} は完全に膜電位固定できていない領域で発生する電位依存性 Na^+ チャネルの活性化を介した局所的な放電を捉えていると考えられる。この局所的な放電が、膜電位固定して

(別紙様式第 3 号)

いない intact なニューロンでは、細胞体全体の活動電位のトリガーとなっていると考えられる。さらに、膜電位固定法のままパッチ電極を持ち上げ、パッチ膜を切り出したアウトサイドアウト法においても I_{sp} は記録された。この I_{sp} は、膜電位固定下での I_{sp} と kinetics、TTX やリドカインへの感受性において同一の特徴を示した。自発性の活動電位は膜電流固定下でも記録された。膜電流固定下において、活動電位の閾値直下で繰り返しおこる小さな脱分極が閾値に到達した時、活動電位が発生した。また、TRPV1 抑制薬である capsazepine (10 μ M)、BCTC (1 μ M) は膜の過分極を起こし、オンセルモードで記録される自発性活動電位を可逆的に抑制した。このことから、TRPV1 を介して細胞内に流入する Na^+ が膜を脱分極させ、活動電位を誘発していることが示唆された。

次に、NGF が作用する DRG ニューロンのタイプの特徴を明らかにするため、顕微蛍光イメージング法により $[Ca^{2+}]_i$ 測定を行なった。NGF を添加して DRG ニューロンを培養した群 (NGF 群)、非添加で培養した群 (対照群) の両群の DRG ニューロンの中には icilin (10 μ M) と capsaicin (1 μ M) 適用に反応して $[Ca^{2+}]_i$ が一過性に上昇するものが存在した。また、約半数のニューロンが capsaicin に反応し、10 % が icilin に反応した。さらに、icilin に反応したニューロンのほとんどが capsaicin に反応した。131 個の NGF 群のニューロンのうち 12 個で大きな振幅の $[Ca^{2+}]_i$ fluctuation が記録された。この 12 個のうち、10 個のニューロンが capsaicin と icilin の両者に反応した。この $[Ca^{2+}]_i$ fluctuation の振幅の大きさは、他のニューロンの振幅より有意に大きかった。これらの結果から、capsaicin と icilin に反応する DRG ニューロン、つまり TRPV1 と TRPM8/TRPA1 の両者を発現しているニューロンに作用して興奮性の変化を起こすことが示唆された。そのようなニューロンは、熱刺激にも冷刺激にも反応するため、単なる温度受容ニューロンではなく、侵害受容を担う DRG ニューロンだと考えられる。

本研究は、NGF が侵害受容を担うと考えられる DRG ニューロンに慢性的に作用し、自発性活動電位の発生や、それに伴う $[Ca^{2+}]_i$ fluctuation が生じるように、膜の興奮性を亢進させていることを明らかにした。この自発性活動電位は、細胞膜の局所での TRPV1 を介した細胞外からの Na^+ の流入により膜が脱分極し、引き起こされていると考えられる。侵害受容ニューロンにおける自発性の活動電位は、それ自身が痛みの信号になる。そのため本研究で明らかになった NGF による侵害受容ニューロンの興奮性亢進作用により、痛覚過敏や異痛症のような異常な痛みが引き起こされると考えられる。DRG ニューロンで観察された NGF による自発性活動電位は、神経因性疼痛発症メカニズムの一端を担うと考えられる。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	萱野 智彦
審査委員	主査： 鳥取大学 教授 澁谷 泉
	副査： 鹿児島大学 教授 川崎 安亮
	副査： 鳥取大学 教授 太田 利男
	副査： 鳥取大学 准教授 高橋 賢次
	副査： 鳥取大学 准教授 北村 直樹
題目	Chronic NGF treatment induces somatic hyperexcitability in cultured dorsal root ganglion neurons of the rat (NGF 処置したラット背根神経節ニューロンの興奮性亢進)

審査結果の要旨：

萱野智彦氏の博士課程における研究は、組織損傷が治癒した後などに生じる神経因性疼痛のメカニズム解明を目的として、神経成長因子 (NGF) 投与後に生じるラット背根神経節ニューロンの自発性興奮発生機序を電気生理学的手法ならびに細胞内 Ca^{2+} 濃度画像解析法を用いて詳細に解析したものである。

第一に、パッチクランプ法・オンセルモードで自発性活動電位の有無を確認後、パッチ膜を破りホールセルモードに移行して膜電流解析を行った。オンセルモードで自発性活動電位の発生が確認されたニューロンのうち 75% のニューロンで、-50 mV に膜電位したホールセル膜電位固定モードにおいても繰り返しの一過性内向き電流 (I_{sp}) が記録された。一方で、オンセルモードで自発性活動電位の発生がなかったニューロンでは、4.3% のニューロンでのみ I_{sp} を記録した。 I_{sp} は、電位依存性 Na^+ チャンネル抑制薬である TTX ($1 \mu M$) やリドカイン ($1 mM$)、また細胞外 Na^+ 濃度を減少 ($154 mM$ から $100 mM$) させることによって、全か無かの法則に従って可逆的に消失した。これらの結果から、膜電位固定下であることを考慮すると、 I_{sp} は完全に膜電位固定できていない領域で発生する電位依存性 Na^+ チャンネルの活性化を介した局所的な放電を捉えていると考えられた。この局所的な放電が、膜電位固定していない intact なニューロンでは、細胞体全体の活動電位のトリガーとなっていると考えられた。さらに、膜電位固定法のままパッチ電極を持ち上げ、パッチ膜を切り出したアウトサイドアウト法においても I_{sp} は記録された。この I_{sp} は、膜電位固定下での I_{sp} と kinetics、TTX やリドカインへの感受性において同一の特徴を示した。さらに、膜電流固定下において自発性の活動電位が記録された。活動電位の閾値直下で繰り返しおこる小さな脱分極が閾値に到達した時、活動電位が発生した。また、TRPV1 抑制薬である capsazepine (10

μM) および BCTC ($1 \mu\text{M}$) は膜の過分極を起こし、オンセルモードで記録される自発性活動電位を可逆的に抑制した。このことから、TRPV1 を介して細胞内に流入する Na^+ が膜を脱分極させ、活動電位を誘発していることが示唆された。

次に、NGF が作用する DRG ニューロンのタイプの特徴を明らかにするため、顕微蛍光イメージング法により $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 測定を行なった。NGF を添加して DRG ニューロンを培養した群 (NGF 群)、非添加で培養した群 (対照群) の両群の DRG ニューロンの中には TRPM8/TRPA1 アゴニストである icilin ($10 \mu\text{M}$) と TRPV1 アゴニストである capsaicin ($1 \mu\text{M}$) 適用に反応して $[\text{Ca}^{2+}]_i$ が一過性に上昇するものが存在した。また、約半数のニューロンが capsaicin に反応し、10 % が icilin に反応した。さらに、icilin に反応したニューロンのほとんどが capsaicin に反応した。NGF 群のニューロンの中に、無刺激状態で生じる自発性の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ の増減 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluctuation) を示すものがあり、131 個の NGF 群のニューロンのうち 12 個で大きな振幅の $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluctuation が記録された。この 12 個のうち、10 個のニューロンが capsaicin と icilin の両者に反応した。この $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluctuation の振幅の大きさは、他のニューロンの振幅より有意に大きかった。これらの結果から、capsaicin と icilin に反応する DRG ニューロン、つまり TRPV1 と TRPM8/TRPA1 の両者を発現しているニューロンに作用して興奮性の変化を起こすことが示唆された。そのようなニューロンは、熱刺激にも冷刺激にも反応するため、単なる温度受容ニューロンではなく、侵害受容を担う DRG ニューロンだと考えられた。

以上の結果より、NGF が侵害受容を担うと考えられる DRG ニューロンに慢性的に作用し、自発性活動電位の発生や、それに伴う $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fluctuation が生じるように、膜の興奮性を亢進させていることが明らかとなった。この自発性活動電位は、細胞膜の局所での TRPV1 を介した細胞外からの Na^+ の流入により膜が脱分極し、引き起こされていると考えられる。侵害受容ニューロンにおける自発性の活動電位は、それ自身が痛みの信号になることから、本研究で明らかになった NGF による侵害受容ニューロンの興奮性亢進作用により、痛覚過敏や異痛症のような異常な痛みが引き起こされると考えられる。DRG ニューロンで観察された NGF による自発性活動電位は、神経因性疼痛発症メカニズムの一端を担うと考えられる。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位論文にふさわしい価値があると認める。