

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 松下 有美

題 目：

脊椎動物感覚ニューロンの興奮性調節に寄与するイオンチャネルと細胞膜受容体

論文要旨：

生体は体内外の情報を正確に把握し、内部環境の恒常性を維持して変化する環境に適応している。このような情報の受容には感覚機能が深く関わっており、感覚機能は生命の維持に必要不可欠である。本研究では脊椎動物の感覚受容器に着目し、哺乳類における侵害受容調節機構についての検討と鳥類において平衡感覚器と推定されている器官に発現する分子の検討を行った。

本学位論文は2章構成となっている。第1章ではラットをモデル動物とし、末梢感覚神経レベルでの疼痛調節機構とそのメカニズムの解明に取り組んだ。アドレナリン作動系は中枢神経系において疼痛調節に寄与しているが、末梢神経系での役割については明らかではない。そこで本研究では、行動学的実験、電気生理学的実験、生化学的実験、組織化学的実験により末梢神経レベルでのアドレナリン作動系と侵害受容分子の一つである **Transient Receptor Potential Vanilloid 1 (TRPV1)** の機能的関連性について検討した。まず初めに、疼痛関連行動解析によりアドレナリン作動系と **TRPV1** の相互作用を検討した。**TRPV1** 活性化剤であるカプサイシンをラットの後脚足底へ与えると疼痛関連行動が生じ、この反応は  $\alpha_2$  アドレナリン受容体作動薬であるクロニジンをカプサイシン適用部位へ前投与することにより抑制された。また、反対側の足にクロニジンを投与しても疼痛行動の抑制は見られなかった。**TRPV1** は侵害性の熱や化学物質によっても活性化されることが知られている。熱刺激または **formalin** によって誘発される疼痛関連行動は **TRPV1** 拮抗薬である **capsazepine** またはクロニジンの前投与により局所性に抑制された。この現象の基盤となる分子機構を解明するために、ラットから単離し、培養した背根神経節 (**DRG**) ニューロンを用いて電気生理学的手法により **TRPV1** とアドレナリン受容体の機能的関連性について検討した。**DRG** ニューロンにカプサイシンを適用すると内向き電流が生じ、その反応はノルアドレナリン (**NA**) により濃度依存性に抑制された。**NA** による **TRPV1** の抑制に関与する受容体サブタイプと細胞内メカニズムを薬理学的手法により解析したところ、**NA** は  $\alpha_2$  受容体を介して細胞内アデニル酸シクラーゼの抑制、**cAMP** の産生低下に続くプロテインキナーゼAの抑制をすることによって **TRPV1** 活性を抑制することが示唆された。リアルタイムPCRにより **DRG** での  $\alpha_2$  受容体サブタイプのmRNAの発現量を定量解析したところ、 $\alpha_{2c}$  受容体の発現レベルが最も高かった。また、免疫染色により **TRPV1** と  $\alpha_{2c}$  受容体が同一の **DRG** ニューロン細胞体に存在することも明らかとなった。以上の成績から、侵害刺激を受容する皮膚直下に伸長する末梢神経繊維終末に **TRPV1** と  $\alpha_2$  受容体が共発現しており、 $\alpha_2$  受容体を介して **TRPV1** 活性が抑制された結果、鎮痛作用が生じることが示唆された。

第2章ではニワトリをモデル動物とし、鳥類が二足歩行する際の歩行制御を担う平衡感覚器官と推測される **accessory lobes (AL)** に発現する電位依存性ナトリウムチャネル (**Voltage Gated Sodium Channel, VGSC**) のサブタイプの同定を行なった。鳥類の脊椎腰膨大側部にはALと呼ばれる鳥類特有の10対の結節上構造物が存在している。組織学的にはAL内には神経様細胞が存在することが示されており、行動学的には歩行制御を担う平衡感覚器官として働くことが示唆されている。ALから単離した細胞の中にVGSCを発現する興奮性細胞が存在することが明らかとなっているが、どのような形態の細胞にどのサブタイプのVGSCが発現しているのかは不明である。本研究ではこれらの点について生化学的手法と免疫組織化学的手法により検討した。RT-PCRにより、ALにおいてNav 1.1-1.7までのVGSCサブタイプのmRNAが発現すること、なかでも神経型VGSCであるNav 1.1と1.6のシグナル強度が他のサブタイプに比べて強いことがわかった。抗VGSC抗体とアストロサイトのマーカーである **glial fibrillary acidic protein (GFAP)** を認識する抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、AL領域において、VGSC陽性シグナルは神経様の大型の細胞で、GFAP陽性シグナルは神経様細胞の間を埋めるように存在する細いフィラメント状の構造で検出された。これら両シグナルは重ならず、GFAP陰性の細胞でのみVGSC陽性シグナルを確認した。これらの結果は主に神経型のVGSCがAL内の神経様細胞に発現していることを示している。

本研究成果は哺乳類には末梢神経局所でのアドレナリン作動系鎮痛機構が存在すること、鳥類においてALニューロンが歩行時の平衡感覚保持を担う器官であるという仮説と矛盾がないことを示唆した。これらの成果は脊椎動物の感覚受容機構の分子基盤解明に新たな知見を加えるものである。

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	松下 有美
審査委員	主査： 鳥取大学 准教授 北村 直樹
	副査： 鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査： 山口大学 教授 佐藤 晃一
	副査： 鹿児島大学 教授 白石 光也
	副査： 鹿児島大学 准教授 内藤 清惟
題目	脊椎動物感覚ニューロンの興奮性調節に寄与するイオンチャンネルと細胞膜受容体
審査結果の要旨：	
<p>本学位論文は2章構成となっている。第1章ではラットをモデル動物とし、末梢感覚神経レベルでの疼痛調節機構とそのメカニズムの解明に取り組んでいる。アドレナリン作動系は中枢神経系において疼痛調節に寄与しているが、末梢神経系での役割については明らかではない。本研究では、行動学的実験、電気生理学的実験、生化学的実験、組織化学的実験により末梢神経レベルでのアドレナリン作動系と侵害受容分子の一つである Transient Receptor Potential vanilloid type 1 (TRPV1)の機能的関連性について検討している。疼痛関連行動解析でアドレナリン作動系とTRPV1の相互作用を検討したところ、TRPV1活性化薬であるカプサイシンをラットの後脚足底へ与えると疼痛関連行動が生じ、この反応は<math>\alpha_2</math>アドレナリン受容体作動薬であるクロニジンをカプサイシン適用部位へ前投与することにより抑制されたが、反対側の足にクロニジンを投与しても疼痛行動の抑制は見られなかった。TRPV1は侵害性の熱や化学物質によっても活性化されることが知られているので、熱刺激またはホルマリンによって誘発される疼痛関連行動についても検討したところ、TRPV1拮抗薬であるカプサゼピンまたはクロニジンの前投与により局所性に抑制された。この生体応答の基盤となる分子機構を解明するために、ラットから単離し、培養した体性感覚ニューロンニューロンを用いて電気生理学的手法によりTRPV1とアドレナリン受容体の機能的関連性について検討している。感覚ニューロンにカプサイシンを適用すると内向き電流が生じ、その反応はノルアドレナリン (NA)により濃度依存性に抑制された。NAによるTRPV1の抑制に関与する受容体サブタイプと細胞内メカニズムを薬理的に解析したところ、NAは<math>\alpha_2</math>受容体を介して細胞内アデニル酸シクラーゼを抑制すること、cAMPの産生低下に続</p>	

2,000字以内

くプロテインキナーゼ A を抑制することによって TRPV1 活性を抑制する可能性が示唆された。リアルタイム PCR により背根神経節での  $\alpha_2$  受容体サブタイプの mRNA の発現量を定量解析したところ、 $\alpha_2$  受容体の発現レベルが最も高いことが、免疫染色により TRPV1 と  $\alpha_2$  受容体が同一のニューロン細胞体に存在することも明らかとなった。

以上の成績から申請者は、侵害刺激を受容する皮膚直下に伸長する末梢神経繊維終末に TRPV1 と  $\alpha_2$  受容体が共発現しており、 $\alpha_2$  受容体を介して TRPV1 活性が抑制された結果、鎮痛作用が生じるという説を提唱している。この機構は、これまでに論じてこられなかった、末梢感覚神経終末の局所におけるアドレナリン作動性受容体と TRPV1 の機能的関連性を証明した新しい知見であり、感覚生理学に新しい解釈を加えるだけでなく、臨床的な疼痛コントロールの理解にも寄与できるものである。

第 2 章では鳥類が二足歩行する際の歩行制御を担う平衡感覚器官と推測される accessory lobes (AL) に発現する電位依存性ナトリウムチャネル (VGSC) のサブタイプの同定を行なっている。鳥類の脊椎腰膨大側部には AL と呼ばれる鳥類特有の 10 対の結節上構造物が存在している。組織学的には AL 内には神経様細胞が存在することが示されており、行動学的には歩行制御を担う平衡感覚器官として働くことが示唆されている。AL から単離した細胞の中に VGSC を発現する興奮性細胞が存在することが明らかとなっているが、どのような形態の細胞にどのサブタイプの VGSC が発現しているのかは不明であった。本研究ではこれらの点を生化学的手法と免疫組織化学的手法により検討している。RT-PCR により、AL には Nav 1.1 から 1.7 までの VGSC サブタイプの mRNA が発現すること、なかでも神経型 VGSC である Nav 1.1 と 1.6 の発現が他のサブタイプに比べて強いことを明らかにしている。抗 VGSC 抗体と glial fibrillary acidic protein (GFAP) を認識する抗体を用いて免疫蛍光染色を行ったところ、AL 領域において、VGSC 陽性シグナルは神経様の大型の細胞で、GFAP 陽性シグナルは神経様細胞の間を埋めるように存在する細いフィラメント状の構造で検出されている。これら両シグナルは重ならず、GFAP 陰性の細胞でのみ VGSC 陽性シグナルが確認されている。これらの結果から主に神経型の VGSC が AL 内の神経様細胞に発現していることが明らかになった。

これらの知見は鳥類において AL ニューロンが歩行時の平衡感覚保持を担う器官であるという仮説と矛盾がないものであり、全容が解明されていない鳥類の特殊平衡感覚器官の生理的機能の分子基盤についての新たな知見を加えるものである。

第 1 章と第 2 章を通して、脊椎動物の体性感覚（痛み）と平衡感覚の生理学に興味深い新たな知見が加えられている。

以上により本論文は、博士（獣医学）を授与するに値するものであると判断する。