

三叉神経脊髄路亜核内神経網におけるシナプス結合の解析 - GAD67-GFPノックイン新生マウスを用いた研究 -

桑名 俊一^[1] 植草学園大学保健医療学部

細川 幸希^[2] 慶應義塾大学医学部

角 友起^[3] 植草学園大学保健医療学部

齋藤 基一郎^[4] 植草学園大学保健医療学部

小池 和子^[5] 植草学園大学保健医療学部

Analysis of Neural Connections in the Trigeminal Spinal Tract Subnucleus Caudalis of GAD67-GFP Knock-in Neonatal Mice

Shun-ichi KUWANA Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Yuki HOSOKAWA School of Medicine, Keio Gijyuku University

Yuki KAKU Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kiichiro SAITO Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

Kazuko A. KOIKE Faculty of Health Sciences, Uekusa Gakuen University

三叉神経脊髄路尾側亜核は顔面の三叉神経支配領域に出現する疼痛の中継核だけでなく、偏頭痛の発生源とも考えられている。核内にはGABAなど抑制性伝達物質をもつニューロンが多数存在し、痛覚求心性神経情報の2次処理を行っており、その神経回路網構築と処理様式の解析は、慢性疼痛の予防・治療法を開発する上で必須である。本研究では、GAD67(GABA合成酵素・グルタミン酸デカルボキシラーゼ)のかわりに、発色同定の目的でgreen fluorescence protein(GFP)遺伝子を組み込んだ新生マウス(GAD67-GFPノックインマウス)の三叉神経付脳幹スライス標本を作成し、三叉神経根の電気刺激に対する尾側亜核内のGABA性および非GABA性ニューロンの応答をホールセルパッチクランプ法により解析した。GABA性ニューロンは、20

[1] 著者連絡先：桑名俊一

[2] 細川幸希

[3] 角友起

[4] 齋藤基一郎

[5] 小池和子

例中17例で興奮性入力のみを、3例で興奮性と抑制性の両入力を受けているものがあった。これに対し、非GABA性ニューロンは、興奮性入力を受けているものが31例中18例、興奮性入力と抑制性入力の両方を受けているものが11例、抑制性入力のみのも2例であった。以上の結果から、尾側亜核内のGABA性ニューロンは求心神経より興奮性入力を受け、非GABA性ニューロンの興奮を抑制していることが推定できる。

キーワード：三叉神経，三叉神経脊髄路尾側亜核，GABA性ニューロン，脳幹スライス標本，ノックインマウス

The neurons of the trigeminal spinal tract subnucleus caudalis (Sp5C) play an important role in the processing of pain and sensory information from the cranio-facial area. In the present study, we investigated the connections of GABAergic, non-GABAergic neurons, and the primary sensory afferents (C-fibers) in the Sp5C, using neonatal transgenic (GAD67-GFP knock-in) mice in which green fluorescent protein (GFP) is specifically expressed in GABAergic neurons. We recorded activities of GFP-positive (GABAergic) and GFP-negative (non-GABAergic) neurons using the whole-cell patch clamp technique in the sagittal slice of brainstem attaching the trigeminal nerve rootlet. Electrical stimulation of the trigeminal nerve rootlet evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in 20 GFP-positive and in 31 GFP-negative neurons. Inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) were evoked in 3GFP-positive and in 13 GFP-negative neurons. In morphological study, most GFP-positive neurons had multipolar-shaped somata (n=8/10) and GFP-negative neurons had bipolar (n=5/10) or triangular (n=5/10) somata. The size of each neuron is not significantly different. Therefore, we conclude that GABAergic neurons in the Sp5C receive exclusively excitatory postsynaptic inputs, and inhibit the activities of non-GABAergic neurons in the same nucleus.

Keywords: Trigeminal nerve, Trigeminal subnucleus caudalis, GABAergic neuron, Whole cell patch clamp, Transgenic mouse

1. はじめに

三叉神経は顔面感覚の求心性神経線維を含み、その支配領域からの痛覚情報は、三叉神経半月神経節の小細胞体を介して脳幹内へ入り、橋から延髄尾側部へ伸びる三叉神経脊髄路核の主に尾側亜核 (Sp5C) において処理される。臨床的には、三叉神経系を介する疼痛は、特発性三叉神経痛、頭蓋内腫瘍、帯状疱疹後神経痛、歯科口腔外科疾患などであり、それらは慢性疼痛疾患に移行する頻度が高い。最近では、偏頭痛なども三叉神経系を介して惹き起こされることが示唆されている¹⁾。実験動物を用いた研究では、三叉神経を頻回刺激すると尾側亜核ニューロンの興奮性が増大 (wind-up 現象) し、興奮性シナプス後電位の長期増強 (LTP) と長期抑制 (LTD) が生ずることが報告されている^{2,3)}。これらの結果から、痛みを受容する中枢性二次ニューロン、すなわち三叉神経脊髄路尾側亜核の可塑性が疼痛慢性化の原因とも考えられている。

一方、三叉神経尾側亜核内には γ -アミノ酪酸

(γ -amino butyric acid, GABA) やグリシンなどの抑制性伝達物質を持つニューロンが多数存在している。三叉神経の頻回刺激により三叉神経核内のGABA濃度の上昇が報告⁴⁾されていることから慢性疼痛発症にGABA性ならびにグリシン性ニューロンの抑制性ニューロンの関与が示唆されるが、これらの抑制性ニューロンの機能と形態を詳細に調べた研究はない。我々は、これまでGAD67 (GABA合成酵素・グルタミン酸デカルボキシラーゼ) のかわりにgreen fluorescence protein (GFP) 遺伝子を組み込んだマウス (GAD67-GFPノックインマウス) を用いて、延髄内の呼吸神経系回路網におけるGABA性ニューロンの特性について解析してきた⁵⁾。

本研究では、GAD67-GFPノックインマウスの三叉神経付き脳幹単離標本を用い、三叉神経電気刺激に対する尾側亜核内のGABA性および非GABA性ニューロンの応答を記録し、尾側亜核内のニューロンの形態学上の特徴ならびにニューロン間シナプス結合様式の解明を目的とする。

2. 方法

2.1 GAD67-GFPノックインマウス

GABA合成酵素(グルタミン酸デオキシカルボキシラーゼ: GAD)には、分子量の異なるアイソフォームのGAD67とGAD65が知られている。本研究で用いたマウスは、GAD67遺伝子の代わりにgreen fluorescence protein (GFP) 遺伝子を組み込んだものである⁶⁾。GAD67遺伝子のホモ接合体をもつ(GAD67^{GFP/GFP})マウスおよびヘテロ接合体をもつ(GAD67^{GFP/+})マウスは、青色励起光を当てることにより、GABA性ニューロンからの緑色蛍光が観察される。しかしながら、GAD67^{GFP/GFP}は、口蓋裂および呼吸中枢の異常から、生後数時間で死亡する⁷⁾。このため、本研究ではGAD67^{GFP/+}(GAD67-GFPノックイン)マウスを用いた。三叉神経核におけるGFP陽性ニューロンの分布を調べるために、生後2日齢のGAD67-GFPノックイン新生マウスをエーテルで深麻酔し、尾のピンチ反応が消失したことを確認した後、脳幹を摘出した。摘出脳幹を4%パラホルムアルデヒドで固定した後、スクロース溶液に置換したのち、クリオスタットを用いて、脳幹長軸方向の矢状面に沿って厚さ20 μ mの切片を作成した。レーザー顕微鏡下で三叉神経核内GFP陽性ニューロンの分布とその形態学的特徴を観察同定し、写真撮影した。

2.2 ホールセルパッチクランプ法

生後2～6日齢のGAD67-GFPノックイン新生マウスをエーテルで深麻酔し、尾のピンチ反応が消失したことを確認した後、脳幹・脊髄を摘出した(図1a)。さらに、脳幹の長軸方向の矢状面に沿って切断した三叉神経付脳幹スライス標本(図1b)を作

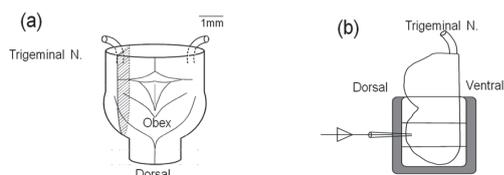


図1. 三叉神経付き脳幹スライス標本。脳幹を摘出し (a), 斜線で示す面で切断した。切断面を上にして (b) の三叉神経脊髄路尾側垂核のニューロンのホールセルパッチクランプを行った。

製し、酸素化人工脳脊髄液(aCSF)を満たしたチェンバー内で維持した。

蛍光顕微鏡下で、Sp5C内のGFP陽性(GABA性)およびGFP陰性(非GABA性)ニューロンを同定した後、ガラス電極(直径約2 μ m)を用いてホールセルパッチクランプ法により、その活動を記録した。電極内液にグラミシジン(100 μ g/ml)および色素(0.001% Sulforhodamine)を加え、穿孔パッチ法でイオン電流を記録した。三叉神経根をガラス電極によって吸引し電気刺激(強度0.5-1mA, 持続時間200 μ s)を与え、GABA性ニューロンおよび非GABA性ニューロンのシナプス電位を解析した。記録は、主に膜電位固定で行い、固定電位を-100mVから0mVまで、20mVごとに上げて行き、三叉神経根を電気刺激し電流方向の逆転により、興奮性シナプス電流(EPSC)と抑制性シナプス電流(IPSC)を区別した。記録終了後、緑色の励起光を当てることによって赤色のSulforhodamineの蛍光により、記録したニューロンの形態を観察同定し、撮影分析した。

3. 結果

3.1 三叉神経核内におけるGABA性ニューロンの分布

図2右はGAD67-GFPマウスの三叉神経核を含む矢状断面切片の模式図である。図2左に示す写真は蛍光顕微鏡画像であり、三叉神経中間核から尾側垂核Sp5Cにかけて、GFP陽性、すなわちGABA性ニューロンが多数存在しているのが良く分かる。

3.2 三叉神経電気刺激に対するGABA性および非GABA性ニューロンの応答

図3に示すように、Sp5Cのニューロンは、電気刺激(矢印)により興奮性シナプス入力(EPSC)だけを受けるもの(図3a)、抑制性シナプス入力(IPSC)だけを受けるもの(図3c)、両方の入力(EPSCとIPSC)を受けるもの(図3b)があった。

Sp5Cで記録した51個のニューロンを表1のようにシナプス入力によって分類した。GABA性ニューロンは、主に興奮性のみの入力を受けるものが多かった。これに対し、非GABA性ニューロンは抑

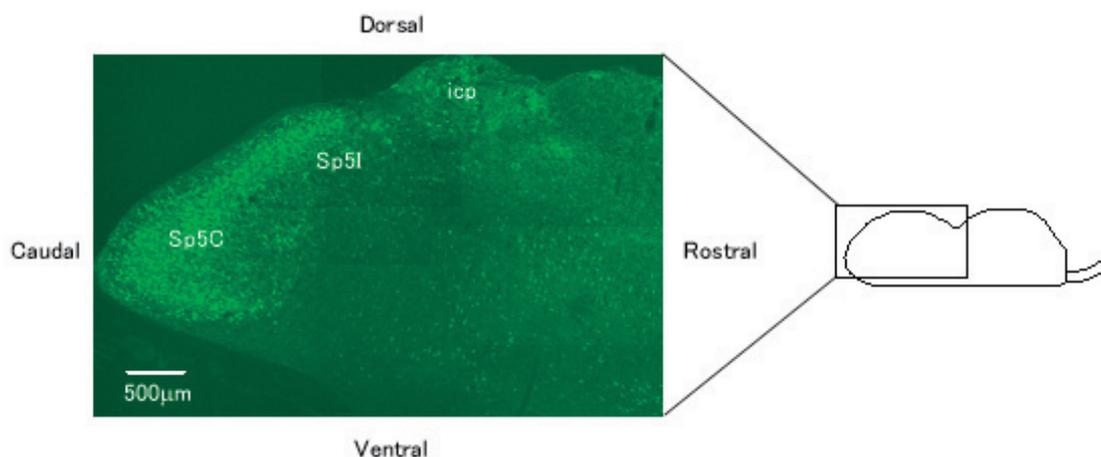


図2. GABA性ニューロンの分布

Sp5C：三叉神経脊髄路尾側亜核，Sp5l：三叉神経脊髄路中間核，icp：下小脳脚

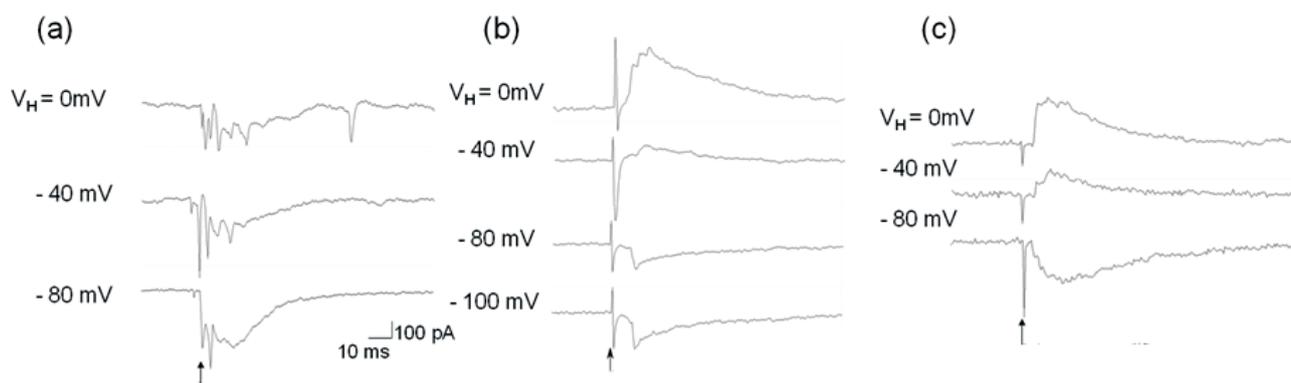


図3. 三叉神経電気刺激に対するニューロンの応答

電圧固定状態で電気刺激（↑）を行い，シナプス電流を測定した。下向き振れは興奮性シナプス電流（EPSC）を表わし，電位を0mVにした時に上向きに振れる電流は抑制性シナプス電流（IPSC）を表わす。

表1. シナプス入力の種類

Neuron type	Synaptic input	n
GABAergic (n=20)	EPSC	17
	EPSC+IPSC	3
Non-GABAergic (n=31)	EPSC	18
	EPSC+IPSC	11
	IPSC	2

表2. ニューロンの形態

Neuron type	Soma type	n
GABAergic (n=10)	Multipolar	8
	Fusiform	2
Non-GABAergic (n=10)	Fusiform	5
	Pyramidal	5

制性の入力を受けているものも多数存在していた。

3.3 GABA性ニューロンおよび非GABA性ニューロンの形態

ホールセル記録用の電極に色素を入れ、ニューロンの形態を観察した。表2に示すように、GABA性ニューロンは多極型細胞が多く、非GABA性ニューロンは双極型あるいは錐体型細胞であった。Sp5C内ニューロンの細胞体の大きさは約10 μ m×14 μ mの大きさであり、ニューロン間でそのサイズに差は見られなかった。

4. 考察

三叉神経脊髄路尾側亜核内のGABA性ニューロンが抑制性介在ニューロンとして、痛覚の情報処理に参与していることは薬理的に知られていた^{4,9)}。

実際に、生きた状態でGABA性ニューロンを確認記録し、その形態学的特徴を同定したのは本研究が初めてである。その結果、三叉神経脊髄路尾側亜核のGABA性ニューロンは多極型細胞を呈し、主に興奮性のみの入力を受けるものが多く存在していた。一方、非GABA性ニューロンは興奮性と抑制性の入力を受けているものが多数存在し、双極型か錐体型を呈していた。したがって、Sp5C内のGABA性ニューロンと非GABA性ニューロンの結合、すなわちSp5C内の神経回路は、図4のように接続しているものと考えられる。この中で、主な経路は非GABA性ニューロンを介する興奮性情報伝達であり、GABA性ニューロンの活動はこれらの情報の修飾を行うものと考えられる。

HambaとOnimaru(1998)は、新生ラットの三叉

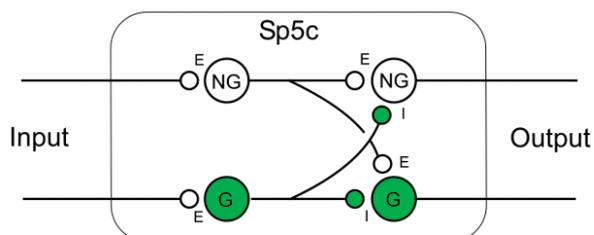


図4. 三叉神経脊髄路核尾側亜核内における神経回路
G: GABAニューロン, NG: 非GABA性ニューロン,
E: 興奮性シナプス, I: 抑制性シナプス

神経-脳幹ブロック標本を作製し、ブラインドパッチ法によって三叉神経脊髄路尾側亜核の記録を行った¹⁰⁾。その結果、三叉神経の電気刺激によって興奮と抑制を受けるニューロンをタイプE、抑制だけを受けるニューロンをタイプIとして分類した。本研究の結果と比較すると、タイプEはGABA性と非GABA性ニューロンを、Iは非GABA性ニューロンを記録したものに相当すると思われる。

一方、Sedlacekら(2007)は、幼若ラットのスライス標本を用い、三叉神経脊髄路尾側亜核のニューロンをパッチクランプ法で記録し、脱分極性の矩形波通電刺激に対する応答様式とニューロンの形態との関係を調べた¹⁰⁾。その結果、tonic firingを示すニューロンは双極型、tonicまたはphasic firingを示すニューロンは錐体型であり、delayed onset またはsingle spike 発火を示すニューロンは多極型であった。

本研究ではGABA性ニューロンは多極型が多くdelayed onset またはsingle spike 発火型、非GABA性ニューロンは双極型と錐体型でありtonic firing型と考えられる。このことは、三叉神経脊髄路尾側亜核内では非GABA性ニューロンは順応し難く、GABA性ニューロンは順応し易いタイプの可能性があり、核内の情報処理を行う上で重要な生理学的特徴と考えられる。

三叉神経を繰り返し電気刺激すると三叉神経脊髄路尾側亜核のニューロン群の興奮が長期間持続する状態はcentral sensitization(中枢神経における痛覚増強)^{12,13)}と呼ばれている。Hambaら(2000)は幼若ラットの三叉神経付き脳幹スライス標本を用い、尾側亜核内の約80%のニューロンで長期増強(long term potentiation, LTP)が惹起されること、このLTPにはグルタミン酸に対するNMDA受容体が関与することを明らかにしている²⁾。本研究では、LTPを生ずるニューロンとGABA性ニューロンとの関係については検討しなかったが、Liangら(2005)は、尾側亜核ニューロンには、NMDA受容体の他、サブスタンスPのニューロキニン(NK)受容体あるいはカルシトニン遺伝子関連ペプチド(CGRP)受容体が存在し、頻回刺激によりこれらの受容体が活性化されることを報告している¹⁴⁾。今後、GABA性ニューロンとLTPとの関係、GABA性ニューロ

ンと種々の神経ペプチド受容体との関係を検討する必要がある。

最近、Oshimaら(2006)は、5-HTが三叉神経痛の鎮痛効果を示し、尾側亜核においてGABAの分泌量を増加させることを報告している¹⁵⁾。本研究で組み立てられた神経回路網内では、5-HTはGABA性ニューロンの活動を刺激し、非GABA性ニューロンの活動を抑制することによって鎮痛効果が発揮されるものと考えられる。临床上、三叉神経慢性痛や片頭痛の治療には、鎮痛剤として癲癇治療薬のカルバマゼピンが使われているが、副作用の観点から十分な鎮痛効果が得られていない状態である。以上のことから、本研究は、これらの疼痛に対する新薬開発の手掛かりを与えるもので臨床的にも重要と考えられる。

5. 倫理的配慮

実験動物の取り扱いに関しては、「生理学領域による動物実験に関する基本的指針」(日本生理学会平成15年改訂)に従った。また、本研究は、植草学園大学保健医療学部動物実験委員会の承認(URAC08-01)を得たものである。

6. 謝辞

本研究は、文部科学省の科学研究費(平成19～21年度19603015)および植草学園大学共同研究費(平成21～22年度)の助成を得たものである。

7. 文献

- 1) Goadsby PJ. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trend in Molecular Medicine*. 2007; 13: 39-44.
- 2) Hamba M, Onodera K, Takahashi T. Long-term potentiation of primary afferent neurotransmission at trigeminal synapses of juvenile rats. *Eur J Neurosci*. 2000; 12: 1128-34.
- 3) Onodera K, Hamba M, Takahashi T. Primary afferent synaptic responses recorded from trigeminal caudal neurons in a mandibular nerve-brainstem preparation of neonatal rats. *J Physiol*. 2000; 524: 503-512.
- 4) Viggiano A, Monda M, Viggiano A, Chiefari M, Aurilio C, and De Luca B. Evidence that GABAergic neurons in the spinal trigeminal nucleus are involved in the transmission of inflammatory pain in the rat: a microdialysis and pharmacological study. *Eur J Pharmacol*. 2004; 496: 87-92.
- 5) Kuwana S, Tsunekawa N, Yanagawa Y, Okada Y, Kuribayashi J, Obata K. Electrophysiological and morphological characteristics of GABAergic respiratory neurons in the mouse pre-Bötzing complex. *Eur J Neurosci*. 2006; 23: 667-674.
- 6) Tamamaki N, Yanagawa Y, Tomioka R, Miyazaki J, Obata K, Kaneko T. Green fluorescent protein expression and colocalization with calretinin, parvalbumin, and somatostatin in the GAD67-GFP knock-in mouse. *J Comp Neurol*. 2003; 467: 60-79.
- 7) Takuma S. Effect of neonatal capsaicin treatment on neural activity in the medullary dorsal horn of neonatal rats evoked by electrical stimulation to the trigeminal afferents: an optical, electrophysiological, and quantitative study. *Brain Research*. 2001; 906: 1-12.
- 8) Kuwana S, Okada Y, Sugawara Y, Tsunekawa N, Obata K. Disturbance of neural respiratory control in neonatal mice lacking GABA synthesizing enzyme 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Neuroscience*. 2003; 120: 861-870.
- 9) Takemura M, Sugiyo S, Moritani M, Kobayashi M, Yonehara N. Mechanisms of orofacial pain control in the central nervous system. *Arch Histol Cytol*. 2006; 69(2): 79-100.
- 10) Hamba M, Onimaru H. Newborn brainstem preparation with the trigeminal nerve attached for pain study. *Brain Research Protocols*. 1998; 3: 7-13.
- 11) Sedlacek M, Horak M, Vyklicky Jr L. Morphology and physiology of lamina I neurons of the caudal part of the trigeminal nucleus. *Neuroscience*. 2007; 147: 325-333.
- 12) Dubner R, Ruda MA. Activity-dependent neuronal plasticity following tissue injury and inflammation. *Trends Neurosci*. 1992; 15(3): 96-103.
- 13) Woolf CJ, Thompson SW. The induction and maintenance of central sensitization is dependent on N-methyl-D-

- aspartic acid receptor activation; implications for the treatment of post-injury pain hypersensitivity states. *Pain*. 1991; 44(3): 293-9.
- 14) Liang YC, Huang CC, Hsu KS. Characterization of long-term potentiation of primary afferent transmission at trigeminal synapses of juvenile rats: essential role of subtype 5 metabotropic glutamate receptors. *Pain*. 2005; 114(3): 417-428.
- 15) Oshima K, Takeda M, Tanimoto T, Katsuumi I, Matsumoto S. Tooth-pulp-evoked rostral spinal trigeminal excitation is attenuated by the activation of 5-HT₃ receptors via GABAergic interneurons in the rat. *Brain Research*. 2006; 1109: 70-73.

