

論文の内容の要旨

氏名：村山翔太

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Depression of quantal size of GABAergic synaptic transmission in the insular cortex by the reduction of peripheral unmyelinated C-fibers

（末梢無髄神経線維の減少による島皮質 GABA 作動性抑制性シナプス伝達の素量サイズの減弱）

口腔・顔面領域における侵害情報は、A δ 線維および C 線維である一次求心性線維を介して主に三叉神経脊髄路核尾側亜核に投射する。さらに視床後内腹側核などを經由して、最終的に島皮質を含む大脳皮質へ入力する。中でも島皮質の嗅溝の背側と中大脳動脈の尾側に囲まれた領域（島皮質口腔領域）は、歯髄や歯根膜の電気刺激によって活性化されることが知られており、口腔内の侵害刺激に関する情報処理を行う主要な領域と考えられている。島皮質口腔領域のニューロンにおける歯髄の電気刺激によって記録される活動電位は、持続時間にばらつきがあることが全脳動物標本を用いた細胞外記録によって明らかにされている。したがって、A δ および C 線維由来の情報が島皮質口腔領域に収束していると考えられる。

島皮質はグルタミン酸作動性の興奮性錐体ニューロン（Pyr）と GABA 作動性抑制性ニューロンで構成されており、末梢神経障害により大脳皮質ニューロンに神経可塑的な変化が生じることが知られている。特に GABA 作動性シナプス伝達は神経可塑性の調整に重要な役割を果たしている。しかし、侵害性情報がどのように島皮質口腔領域内で処理されているのか不明な点が多い。島皮質口腔領域内での疼痛情報の処理機構を理解するためには、島皮質口腔領域内で A δ および C 線維由来の侵害入力がかどのように処理されるか明らかにする必要がある。

そこで著者は、生後 1-2 日のラットに transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) のアゴニストであるカプサイシン (100 mg/kg) を皮下投与し、末梢の C 線維を選択的に減少させることで、島皮質口腔領域への侵害入力がか主に A δ 線維由来である動物を作製し、島皮質口腔領域の局所回路がかどのように変化するか明らかにすることを目的として以下の実験を行った。すなわち、GABA 作動性ニューロンの中でも特に強方に近傍の細胞を抑制する高頻度発火型抑制性介在ニューロン (FS) から Pyr への抑制性シナプスに焦点を当て、カプサイシン処置群 (CAP) と対照群 (Sham) に分類し、そのシナプス特性を比較した。

実験 1 として、C 線維のカプサイシン処置による減少を評価した。三叉神経節において TRPV1 とともに C 線維に発現するカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の発現量を免疫組織化学染色法にて検討した。その結果、CAP では CGRP 陽性細胞の顕著な減少を認めた。さらに、0.01% カプサイシン溶液を点眼したところ、拭き動作の頻度は CAP で有意に減少した。以上により、CAP ではカプサイシン処置により C 線維が減少していることを確認した。

実験 2 では、光学計測法を用いて皮質における興奮伝播応答を観察し、島皮質口腔領域内の活性部位を検討した。全脳動物標本で上顎歯髄電気刺激への応答は CAP と Sham との間に刺激から応答までの潜時に差がなかったが、顕著な興奮伝播の拡大とその振幅の増大を CAP において認めた。

実験 3 では、実験 2 で観察された侵害刺激応答領域を含む急性脳スライスを作製し、Pyr からホールセル・パッチクランプ法を行い電気生理学的特性を記録した。なお、電気生理学的実験では VGAT-Venus 遺伝子組み換えラットを用いることで、抑制性ニューロンと Pyr を蛍光顕微鏡下で分別した。さらに、電流固定法で静止膜電位、閾値電位、発火パターンを参考に抑制性ニューロンのサブタイプを分類した。GABA を介したシナプス入力がかカプサイシン処置により変化しているかを検討するために、1 μ M TTX、25 μ M D-APV と 20 μ M DNQX を灌流投与し、Pyr と FS から微小抑制性シナプス後電流 (mIPSC) を記録した。Pyr では、CAP において mIPSC の振幅が減少したが、発生

頻度に変化はなかった。また、FS においても同様に mIPSC の振幅の減少が認められた。これらの結果から、CAP ではシナプス後膜に存在する受容体の GABA に対する感受性が低下している可能性が示された。

実験 4 ではカプサイシン処置が島皮質口腔領域の抑制性局所回路に及ぼす影響を評価するために、FS から Pyr へのシナプス結合をもつニューロンペアを記録し、シナプス前ニューロンの FS に対し脱分極パルス (80 mV, 2 ms) を 50 ms 間隔で注入することで活動電流を発生させ、単一抑制性シナプス後電流 (uIPSC) を測定した。その結果、uIPSC についても CAP で振幅の減少が認められ、一発目と二発目の uIPSC の振幅の比をとった paired-pulse ratio (PPR) に変化は認められなかった。したがって、uIPSC の記録からも CAP ではシナプス後膜に変化が生じていることが推察された。

実験 5 では、細胞外液中の Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換することで FS → Pyr 結合の FS のシナプス前終末から非同期性に GABA を放出させた。すなわち、非同期性の IPSC (aIPSC) の記録によってシナプス伝達の最小単位である素量サイズを評価した。その結果、CAP では有意に小さい aIPSC が記録された。なお、CAP と Sham の aIPSC の振幅は mIPSC の振幅と同等であった。

CAP において mIPSC の頻度や uIPSC の PPR の変化を伴わないこと、uIPSC と aIPSC の振幅が減少したことはシナプス前膜における変化ではなく、シナプス後膜における神経伝達物質に対する感受性が変化している可能性がある。その可能性を検証するために、実験 6 では、細胞外液中の Ca^{2+} 濃度を変化させることで記録される uIPSC の振幅から算出した分散-平均分析を行った。分散-平均分析から、素量サイズ (q)、シナプスサイトの数 (N) と放出確率 (Pr) を求めた結果、CAP では、シナプス前膜のパラメーターである N と Pr の値は変わらず、シナプス後膜のパラメーターである q の値が減少した。

以上の結果、CAP の島皮質口腔領域の抑制性局所回路において、

- ① 生後 1-2 日のカプサイシンの皮下投与により、無髄神経である C 線維が減少し、
- ② 島皮質口腔領域の抑制性シナプス伝達を減弱させ、
- ③ FS から Pyr のシナプスにおいてシナプス後膜の GABA_A 受容体を介した電流減少によって抑制性シナプス伝達の減弱がもたらされることが明らかになった。

したがって、カプサイシン処置による C 線維の減少は、島皮質口腔領域内の抑制性局所回路の作用を減弱させ、結果として Pyr の活動性を増強させる。これは、末梢から入力する侵害情報の減弱を皮質内で増幅するための神経可塑的变化と考えられた。