

論文の内容の要旨

氏名：松 村 幸 恵

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Substance P-induced activation of presynaptic NK1 receptors suppresses EPSCs via nitric oxide synthesis in the rat insular cortex

（サブスタンス P によるシナプス前 NK1 受容体の活性化はラット島皮質における一酸化窒素合成を介して EPSC を抑制する）

サブスタンス P (SP) はタキキニンペプチドに属する神経ペプチドで、SP 陽性ニューロンの多くが GABA 作動性であり、大脳皮質の広範囲に分布する。SP はタキキニン受容体のひとつであるニューロキニン 1 (NK1) 受容体と高い親和性があり、大脳皮質において NK1 受容体は神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS)、ニューロペプチド Y、およびソマトスタチン陽性 GABA 作動性ニューロンに発現している。

島皮質 (IC) は口腔顔面領域からの侵害情報を処理すると考えられている。IC には NK1 受容体と SP を発現する GABA 作動性ニューロンが豊富に存在していることから、SP が IC での侵害情報処理に関与していることが示唆される。SP は大脳皮質にて GABA_A 受容体を介して抑制性シナプス伝達を調節することが明らかとなっているが、興奮性シナプス伝達への修飾作用はいまだ不明である。そこで本研究は、IC の興奮性錐体細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行い、SP がグルタミン酸作動性シナプス伝達をどのように変化させるか、そして SP によって誘発される EPSC の抑制に一酸化窒素 (NO) 合成が関与するかを解明することを目的とした。

まず、IC での NK1 受容体の発現様式を確認するために免疫組織学的解析を行った。その結果、NK1 受容体が主に GABA 作動性ニューロンの細胞体およびそれらの神経突起に発現していることを確認した。

次に蛍光顕微鏡観察下で GABA 作動性抑制性ニューロンと興奮性錐体細胞を同定できる VGAT-Venus トランスジェニックラットから IC を含む冠状断の急性脳スライス標本 (厚さ 350 μm) を作製し、興奮性錐体細胞からホールセル・パッチクランプ記録を行った。単極同心円電極を記録細胞の近傍に設置し、failure を含むシナプス応答を示す刺激強度にて誘発される興奮性シナプス後電流 (eEPSC) に対する SP の修飾作用について検討した。シナプス前ニューロンの神経伝達物質の放出確率の変化を明らかにするため、刺激は間隔 50 ms に設定した 2 連刺激で行い、2 発目の 1 発目に対する振幅比 (paired-pulse ratio; PPR) を算出した。SP (250 nM) の灌流投与により eEPSC の振幅は有意に減少し、PPR と failure rate は増加した。この SP による eEPSC の振幅減少は用量依存的であった。

さらに、SP によって誘発される eEPSC の抑制に関与するタキキニン受容体を同定するため、NK1 受容体拮抗薬の SR140333 (1 μM) を前投与し、eEPSC に対する SP の影響を調べたところ、SP の eEPSC に対する抑制効果は SR140333 によって拮抗されることが明らかになった。また、NK1 受容体選択的作用薬である [Sar⁹,Met(O₂)¹¹]-substance P (Sar-Met; 250 nM) を灌流投与したところ、SP と同様に eEPSC の振幅は有意に減少し、PPR と failure rate は増加した。これらの結果より、SP がシナプス前細胞の NK1 受容体を活性化して eEPSC を抑制することが示唆された。

この仮説を別の角度から検証するために、錐体細胞から miniature EPSC (mEPSC) と miniature IPSC (mIPSC) を記録し、それぞれにおける Sar-Met の修飾作用を調べた。その結果、Sar-Met 灌流投与により mEPSC と mIPSC の振幅に変化はなかったが発生頻度は減少した。したがって、GABA 作動性ニューロンであるシナプス前ニューロンの NK1 受容体の活性化により、錐体細胞へのグルタミン酸作動性ニューロンからのグルタミン酸放出を減少させるとともに、GABA 作動性ニューロンからの GABA 放出も減少させると考えられる。

嗅内皮質の錐体細胞において SP が発火特性を変化させることが報告されている。IC の錐体細胞でも同様の作用を示すか検証するために電流固定下で静止膜電位と発火特性を記録した。Sar-Met (250 nM) は静止膜電位にほとんど影響を与えず、発火頻度にも有意な差は認められなかった。これらの結果より、NK1 受容体の活性化は錐体細胞の内在的およびスパイク発火特性にほとんど影響しないと考

えられる。

大脳皮質の大部分の NK1 受容体は、nNOS 陽性 GABA 作動性ニューロンに発現している。したがって、SP による錐体細胞へのグルタミン酸放出の抑制には、NO が関与している可能性が考えられる。そこで SP による NO 合成について NO 検出蛍光プローブである DAX-J2Red (10 μ M) による NO イメージングを行って検証した。SP (1 μ M) の灌流投与によって GABA 作動性ニューロンの軸索終末ならびに樹状突起で DAX-J2Red の蛍光強度が増加した。そのため、SP が主に GABA 作動性ニューロンの軸索終末、樹状突起にて NO 合成を促進していると考えられた。

最後に、スライス中に含まれる NO の量を減少させた場合に SP の EPSC に対する効果が消失するかどうかを検討した。NO 合成酵素阻害薬である L-NAME (200 μ M) を前投与すると SP による eEPSC の振幅の変化はみられず、PPR と failure rate も変化しなかった。また、NO を NO₂ に酸化する PTIO (100 μ M) を SP 投与前に灌流投与したところ、SP による eEPSC の振幅の変化はみられず、PPR と failure rate も変化しなかった。これらの結果により、SP によって誘発される EPSC の抑制は NO によって媒介されることが明らかになった。

以上の結果、SP は GABA 作動性ニューロンのシナプス前膜に存在する NK1 受容体を活性化してその NO 合成経路を活性化することにより NO を産生し、その NO がグルタミン酸作動性ニューロンの軸索終末から放出されるグルタミン酸の放出確率を減少させることによって eEPSC の抑制に寄与すると考えられた。IC におけるこのようなメカニズムは口腔領域における疼痛の制御機構に重要な役割を果たしている可能性がある。