

氏 名 (本籍)	川原田 伸 也 (岐 阜 県)
学 位 の 種 類	博士 (獣医学)
学 位 記 番 号	獣医博甲第92号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年3月13日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	Studies on Mechanisms of the Antinociceptive Effect of Neurotensin: an Analysis of Neurotensin-induced Membrane Current in Guinea-pig Dorsal Root Ganglion Cells
審 査 委 員	主査 岐 阜 大 学 教 授 小 森 成 一 副査 帯広畜産大学 教 授 西 村 昌 数 副査 岩 手 大 学 教 授 小 林 晴 男 副査 東京農工大学 教 授 小久江 栄 一 副査 岐 阜 大 学 教 授 武 脇 義

論 文 の 内 容 の 要 旨

ニューロテンシンは13個のアミノ酸からなる脳腸ペプチドであり、神経伝達物質あるいは神経調節物質として様々な生理機能の調節に関与している。これまでの免疫組織化学的研究により、ニューロテンシン含有ニューロンが脊髄後角に分布していること、mRNA解析によりニューロテンシン受容体を持つニューロンが脊髄後根神経節に存在することが明らかにされている。また、行動薬理試験（ホット・プレート試験およびライジング反応試験）では、ニューロテンシンを脊髄内に直接投与すると、痛覚反応が抑制されることが見いだされている。これらの結果から、ニューロテンシンは脊髄レベルにおいて痛覚伝導を抑制的に調節していると考えられている。しかし、その調節作用の発現機序については明らかになっていない。

そこで、本研究ではこの問題を究明する一環として、神経細胞の興奮性を司る膜イオンチャネルに対するニューロテンシンの効果について検討した。標本には、モルモット脊髄から摘出した後根神経節をコラゲナーゼとパピンの併用処置によりばらばらにした後根神経節細胞を使用した。単離した細胞は実験に供するまで2～8時間、炭酸ガスインキュベーターに保存した。ニューロテンシンの適用により生ずる膜イオンチャネル電流は、ホールセル・パッチクランプ法を用いて記録し、薬理的に解析した。

1. 静止膜電位に近い -80 mV に電位固定した細胞にニューロテンシンを適用すると、細胞の外から内へ流れる膜電流（内向き I_{NT} ）が発生した。 I_{NT} の振幅はニューロテンシンの濃度（ $40\sim 4000\text{ nM}$ ）に依存して増大し、濃度反応曲線から算定した50%有効濃度（ EC_{50} ）は 396 nM であった。以下の実験では、 EC_{50} 値に近い 400 nM の濃度で I_{NT} を誘発した。また、必要に応じてGABA（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）を対照薬として使用した。GABAは後根神経節細胞において Cl^- チャネルの開口による内向き電流（ I_{GABA} ）を誘発することが知られている。

2. ニューロテンシン受容体の非ペプチド性アンタゴニストであるSR48692（ 100 nM ）は、 I_{NT} の発生を遮断したが、 I_{GABA} には無効であった。この結果から、 I_{NT} はニューロテンシンに特異的な受容体を介して発生することが示唆された。

3. 細胞外液のNaイオン（ Na^+ ）を膜非透過性の陽イオン（トリス）に置換しても、 I_{NT} はなお発生した。 I_{NT} の振幅は Na^+ 存在下の場合とほとんど同じであった。一方、細胞内の Cl^- イオン（ Cl^- ）を膜非透過性の陰イオン（グルタミン酸）に置換すると、 I_{NT} は発生しなくなった。膜電位を 0 mV に固定するとともにパッチ電極内の Cl^- 濃度を減らして Cl^- の駆動力を逆向きにすると、 I_{NT} は外向き電流に逆転した。同様な逆転は I_{GABA} においても観察された。さらに、 Cl^- の平衡電位を -50.0 mV あるいは -0.8 mV に設定した条件下で傾斜電圧パルスを用いて I_{NT} の逆転電位を測定した結果、その値は Cl^- 平衡電位に近い値（ -47.0 mV と 1.9 mV ）を示した。以上の結果から、 I_{NT} は Cl^- チャネルの開口により生じることが示唆された。

4. Cl^- チャネルは、細胞内Caイオン（ Ca^{2+} ）によって活性化されるタイプ（ Ca^{2+} 活性化タイプ）と活性化されないタイプ（ Ca^{2+} 非依存性タイプ）に大別されている。EGTAあるいはBAPTA（ 20 mM ）を細胞内に適用して、細胞内 Ca^{2+} をほとんど完全にキレートしても、 I_{NT} は対照と同様の大きさで発生した。また、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャネルの遮断薬であるDIDS（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）によってもほとんど影響を受けなかった。したがって、ニューロテンシンで活性化される Cl^- チャネルは、 Ca^{2+} 非依存性タイプであると考えられた。

5. I_{GABA} について行った上記4.のような解析は、GABA活性化 Cl^- チャネルも Ca^{2+} 非依存性タイプであることを示した。そこで、両アゴニストで活性化される Cl^- チャネルが同じか否かを決定するために、 I_{NT} と I_{GABA} をさらに比較した。(1) I_{NT} はピークに達するまでの時間経過とその後の減衰経過が I_{GABA} に比べて緩徐であった。(2) 洗浄除去してから5分後に再びニューロテンシンを適用しても、 I_{NT} は発生しなかった。一方、GABAの場合は初回と同じような I_{GABA} が発生した。(3) GABA活性化 Cl^- チャネルの遮断薬であるピクロトキシン（ $100\text{ }\mu\text{M}$ ）は I_{GABA} の発生をブロックしたが、 I_{NT} には無効であった。(4) I_{NT} がピークに達したときにGABAを適用すると、ニューロテンシン非存在下と同様な I_{GABA} が発生した。これらの結果から、ニューロテンシンはGABA活性化 Cl^- チャネルとは異なる Cl^- チャネルを活性化することが示唆された。

6. ニューロテンシンの Cl^- チャネル活性化作用に係わる細胞内情報伝達機構について検討した。GTP結合蛋白質（G蛋白質）の活性化を阻害することが知られてい

る GDPβS (2 mM) を前処置すると、 I_{NT} は有意に抑制された。G 蛋白質を直接活性化することが知られている GTPγS (0.5 mM) を細胞内に適用すると、ニューロテンシンを適用しなくても I_{NT} に振幅および形状が類似した内向き電流が発生した。この GTPγS 誘発電流の発生中にニューロテンシンを適用しても、 I_{NT} は発生しなかった。ある種の G 蛋白質を ADP リボシル化することが知られている百日咳毒素 (2 μg/ml) を前処置しても、 I_{NT} は対照と同様な大きさで発生した。これらの結果は、 I_{NT} の発生に百日咳毒素非感受性の G 蛋白質が関与していることを示唆している。

以上の結果から、ニューロテンシンはモルモット後根神経節細胞において、GABA 活性化 Cl^- チャンネルとは異なる Cl^- チャンネルを活性化すること、この効果は SR48692 感受性のニューロテンシン受容体とリンクしている百日咳毒素非感受性 G 蛋白質を介して生じることが明らかとなった。細胞膜の Cl^- コンダクタンスの増大は膜の安定化 (膜興奮性の抑制) を引き起こすので、本研究で明らかとなったニューロテンシンの Cl^- チャンネル活性化作用は、*in vivo* 実験で認められている同ペプチドの抗侵害効果の発生要因のひとつと考えられる。さらに、ニューロテンシン誘発 Cl^- 電流は GABA 誘発 Cl^- 電流と発生および減衰経過、脱感作様式などの諸点で異なっていたことから、後根神経節レベルにおいて、ニューロテンシンと GABA による調節機構は連携によって精緻な痛覚制御を可能にしていると想像される。

審 査 結 果 の 要 旨

川原田伸也君の博士 (獣医学) の学位請求論文は、ニューロテンシンの疼痛抑制作用の発現機序を解明する一環として、痛覚伝導を担っている後根神経節細胞の膜イオンチャンネルに対する同ペプチドの効果をホールセル・パッチクランプ法を用いて薬理学的に検討したものである。標本には、モルモットの摘出後根神経節から酵素処理によって得た単離細胞を用いている。論文内容は、以下のようにまとめられる。

- 1) 静止膜電位に近い -80 mV に電位固定した細胞にニューロテンシンを適用すると、細胞の外から内へ流れる膜電流 (I_{NT}) が発生した。 I_{NT} の振幅はニューロテンシンの濃度 (40~4000 nM) に依存して増大し、50%有効濃度は 396 nM であった。
- 2) ニューロテンシン受容体の非ペプチド性アンタゴニストである SR48692 (100 nM) の前処置によって I_{NT} は発生しなくなった。このことから、 I_{NT} の発生はニューロテンシン受容体を介していることが確認された。
- 3) I_{NT} は細胞外液の Na^+ を膜非透過性の陽イオンに置換しても発生したが、細胞内の Cl^- を膜非透過性の陰イオンに置換すると発生しなくなった。細胞内外の Cl^- の電気化学的勾配を逆にすると、 I_{NT} の電流方向も逆転した。さらに、傾斜電圧パルスを用いて測定した I_{NT} の逆転電位は Cl^- 平衡電位に一致した。これらの結果から、ニューロテンシンは Cl^- チャンネルを開口することが示唆された。
- 4) I_{NT} は、 Ca^{2+} が細胞内に存在しなくても発生した。また、 Ca^{2+} 活性化 Cl^- チャンネルの遮断薬である DIDS (100 μM) の投与下でも発生した。したがって、ニューロテンシンで活性化される Cl^- チャンネルは、 Ca^{2+} 非依存性タイプであると考えられた。

5) I_{NT} を GABA で生じる Cl^- チャネル電流 (I_{GABA}) と比較した。(1) I_{NT} はピークに達するまでの時間経過とその後の減衰経過が緩徐であった。(2) 初回のニューロテンシンを洗浄除去してから 5 分後に再びニューロテンシンを適用しても、 I_{NT} は発生しなかった。一方、 I_{GABA} は繰り返し発生した。(3) I_{NT} は I_{GABA} をブロックするピクロトキシン (100 μM) に耐性であった。(4) I_{NT} は I_{GABA} と相加的であった。これらの結果から、ニューロテンシンが開く Cl^- チャネルは GABA 活性化 Cl^- チャネルとは異なることが示唆された。

6) G 蛋白質を抑制する GDP β S (2 mM) を前処置すると、 I_{NT} は有意に抑制された。一方、G 蛋白質を直接活性化する GTP γ S (0.5 mM) を適用すると、ニューロテンシンを適用しなくても I_{NT} と反応形状が類似した内向き電流が発生した。この GTP γ S 誘発電流の発生中にニューロテンシンを適用しても、 I_{NT} は発生しなかった。 I_{NT} は百日咳毒素 (2 $\mu g/ml$) の影響を受けなかった。

以上の結果から、ニューロテンシンはモルモット後根神経節細胞において、GABA 活性化 Cl^- チャネルとは異なる Cl^- チャネルを活性化すること、この効果はニューロテンシン受容体とリンクしている百日咳毒素非感受性 G 蛋白質を介して生じることが明らかとなった。 Cl^- チャネルの開閉は、細胞膜の安定化（興奮性の抑制）を引き起こすので、*in vivo* 実験で認められているニューロテンシンの抗侵害効果の発生要因のひとつと考えられる。さらに、ニューロテンシン誘発 Cl^- 電流は GABA 誘発 Cl^- 電流と発生および減衰経過、脱感作様式などの諸点で異なっていた。本結果は、後根神経節レベルにおいて、ニューロテンシンが GABA との連携によって精緻な痛覚調節にかかわっている可能性を示唆する。これらの研究成果は、ニューロテンシンの痛覚制御機構を明らかにする研究の進展に寄与すると思われる。

審査委員は、全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値あるものと認めた。

基礎となる学術論文

1. Kawarada, S., Unno, T., Ohashi, H., Komori, S. (2000). Neurotensin-induced Cl^- current in guinea-pig dorsal root ganglion cells. *Eur. J. Pharmacol.* 404, 69-78.

既発表学術論文

1. Shimizu, Y., Kawarada, S., Suzuki, M., Tanaka, T. (1991) Interstrain differences in red cell enzyme activities in mice and rats. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B, 687-690.