

Title	P2Y12 and bradykinin B2 receptor activation attenuates cAMP-mediated inhibitory effects on intracellular Ca ²⁺ release via ryanodine receptor channels in trigeminal ganglion neurons
Author(s)	川口, 綾
Journal	, (): -
URL	http://hdl.handle.net/10130/3635
Right	

氏名	川口 綾
学位	博士 (歯学)
学位記番号	第 2 0 8 3 号 (甲 第 1296 号)
学位授与年月日	平成 2 7 年 3 月 3 1 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項
論文審査委員	主査 山本 仁 教授 副査 一戸 達也 教授 副査 柴原 孝彦 教授 副査 田崎 雅和 教授 副査 笠原 正貴 教授
学位論文名	P2Y ₁₂ and bradykinin B ₂ receptor activation attenuates cAMP-mediated inhibitory effects on intracellular Ca ²⁺ release via ryanodine receptor channels in trigeminal ganglion neurons

学位論文内容の要旨

1. 研究目的

疼痛発生メカニズムの一つとして細胞外ヌクレオチドを agonist とする P2 受容体の関与が知られている。P2 受容体はイオンチャネル型 P2X 受容体 (subtype: P2X1-7) と GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) 共役型 P2Y 受容体 (subtype: P2Y1, 2, 4, 6, 11-14) に大別される。脊髄や三叉神経節(TG)を用いた一連の研究により、グリア細胞に発現する Gi α タンパク質共役型 P2Y₁₂ 受容体 (P2Y₁₂) が神経障害性疼痛に関与していることが明らかとなった。また TG におけるサテライトグリア細胞上の P2Y 受容体の活性化をブラジキニン(BK)が助長するなど炎症性物質との関連性も報告されている。しかし、neuron に発現する P2Y₁₂ の知見は少なく、また BK との関連性も不明である。本研究は TG neuron における P2Y₁₂ の発現と機能を明らかにし、BK との相互関係について明らかにすることを目的とした。

2. 研究方法

新生仔 Wistar/ST ラット (7 日齢) より急性単離した TG を初代培養し、免疫組織化学染色および Ca²⁺蛍光色素である fura-2 を用いた細胞内遊離 Ca²⁺濃度 ([Ca²⁺]_i) 計測を行った。

3. 研究成績および考察

P2Y₁₂ は TG neuron の細胞体・軸索に存在し、NF-H (A neuron marker)、SP (peptidergic C neuron marker)、IB4 (non-peptidergic C neuron marker) と共局在した。BK 受容体 subtype の B₂ 受容体は細胞体、軸索に

局在したが B1 受容体は細胞体に局在した。細胞外 Ca²⁺存在下に P2Y₁₂ agonist である 2-MeS-ADP を投与すると [Ca²⁺]_i は増加し、P2Y₁₂ antagonist である AR-C66096、PSB0739 により抑制された。この増加は細胞外 Ca²⁺非存在下においても確認され sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase inhibitor である cyclopiazonic acid、ryanodine 受容体 (RyR) の inhibitor である dantrolene によって有意に抑制された。細胞外 Ca²⁺存在下に BK を投与すると [Ca²⁺]_i は増加した。この増加は細胞外 Ca²⁺非存在下でも確認されたが、細胞外 Ca²⁺存在下での BK 誘発性 [Ca²⁺]_i 増加の振幅と比較すると有意に減少していた。細胞外 Ca²⁺非存在下における BK 誘発性 [Ca²⁺]_i 増加は B2 受容体 antagonist (HOE140) により抑制されたが、B1 受容体 antagonist (R715) では抑制されなかった。細胞外 Ca²⁺存在下で、2-MeS-ADP と BK を同時に投与すると、BK 単独投与の [Ca²⁺]_i 増加と比較してその振幅は有意に増大した。細胞外 Ca²⁺存在下で、BK による [Ca²⁺]_i 増加は P2Y₁₂ antagonist により抑制された。2-MeS-ADP による [Ca²⁺]_i 増加は B2 受容体 antagonist で抑制されたものの、B1 受容体 antagonist では変化を認めなかった。細胞外 Ca²⁺存在下に adenylyl cyclase inhibitor (SQ22536) を投与すると [Ca²⁺]_i は増加し phosphodiesterase inhibitor (IBMX) により 2-MeS-ADP、BK による [Ca²⁺]_i 増加は有意に抑制された。これらの結果より、P2Y₁₂、B1/B2 受容体の TG neuron における発現が明らかとなった。また P2Y₁₂ は RyR を介する細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出を活性化させることが明らかとなった。BK は B2 受容体を活性化させ、細胞内 Ca²⁺ストアからの Ca²⁺放出と細胞外からの Ca²⁺流入を誘発した。P2Y₁₂ と B2 受容体双方の活性化は細胞内 cAMP 濃度を減少させることで、[Ca²⁺]_i の増加を誘発する共通シグナル経路を有することが明らかとなった。

4. 結論

初代培養ラット TG neuron において P2Y₁₂ は A⁻、ペプチド性 C⁻、非ペプチド性 C neuron に、また TG neuron における B₁/B₂ 受容体の発現性の相違を確認した。P2Y₁₂ と B₂ 受容体活性は相互に cAMP に仲介される RyR 抑制効果を減衰させることで TG neuron における Ca²⁺放出を活性化する可能性が示唆された。

最終試験の結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第1296号	氏名	川口 綾
最終試験担当者	主 査	山本 仁	教 授
	副 査	一戸 達也	教 授
		柴原 孝彦	教 授
		田崎 雅和	教 授
		笠原 正貴	教 授
最終試験施行日	平成26年 9月18日		
試験科目	歯科麻酔学		
試験方法	口頭試問		
試験問題	主題ならびに関連問題		
<p><u>結果の要旨</u></p> <p>本審査委員会は主題ならびに関連問題について最終試験を行った結果、十分な学識を有することを認め、合格と判定した。</p>			

学位論文審査の要旨

TG においてプリン作動性受容体の一つである P2Y₁₂ の知見はサテライトグリア細胞に集中しており、neuron における知見は少ない。本研究は TG neuron における P2Y₁₂ の発現と機能、さらに代表的な発痛物質である BK との相互関係について明らかにすることを目的とした。新生仔 Wistar/ST ラットの初代培養 TG 細胞を材料とし、P2Y₁₂ と B1/B2 受容体の局在を免疫蛍光染色で、機能と BK との関連性については fura-2 を用いた [Ca²⁺]_i 測定により検索した。その結果、TG neuron における P2Y₁₂、B1/B2 受容体の局在の相違が明らかになるとともに、P2Y₁₂ と B2 受容体活性は相互に cAMP に仲介される RyR 抑制効果を減衰させることで TG neuron における Ca²⁺放出を活性化する可能性が示唆された。

本審査委員会では 1.P2Y 受容体の subtype の違い、2.P2Y₁₂ に注目した理由、3.TG からの neuron 単離方法、4.本実験に 7 日齢のラットを用いた理由などについて質問があった。これらの質問に対して 1.P2Y 受容体の subtype はこれまでに 8 種類が報告されているが、その分類は cDNA クローニング等で行われている。各サブタイプでは受容体が結合するタンパクやヌクレオチドの種類や濃度、発現部位が異なっており、各々現在研究が進められている、2. TG neuron に発現する P2X については以前より検索がなされてきたが P2Y については不明な点が多いこと、更に近年 P2Y₁₂ と疼痛発生との関連について示唆する報告があったことから P2Y₁₂ について検索した、3.本研究では neuron の単離は KCl 溶液による細胞応答の相違で行った。細胞増殖を抑制する試薬の使用を試みたが、neuron の維持に働くグリア細胞の増殖抑制により、培養下での neuron の発育や細胞応答に影響があった。またより生態環境に近い状況下での生理的応答の評価を目的としたため上記の方法で単離を行った、4.TG を急速単離する際の操作性の問題と、培養下での neuron の観察に適しているのが生後 7 日齢から得たものであったこと、先行研究においても同時期のラットの TG を用いていたため、との回答があった。この他 BK 以外の発痛物質と P2Y との関連性、*in vivo* と *in vitro* での neuron とグリア細胞の細胞比率、Transient Receptor Potential チャンネルと疼痛の関係などについても質問がされたが適切な回答が得られた。また英文表記や図表についての指摘があり、修正がなされた。

本研究で得られた結果は、今後の歯学の進歩、発展に寄与するところ大であり、学位授与に値するものと判定した。