Pre- and postsynaptic effect of galanin on excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons

**Hai-Yuan Yue, Tsugumi Fujita, Tao Liu, Lian-Hua Piao, Chang-Yu Jiang
Kotaro Mizuta, Terumasa Nakatsuka, and Eiichi Kumamoto**

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Saga University

[Received 29 January 2009, Accepted 19 March 2009]

Abstract

Galanin, a 29/30 amino acid neuropeptide, and three types (GalR1–3) of receptors for this neuropeptide, which are expressed in rat dorsal root ganglion neurons and spinal dorsal horn neurons, play a pivotal role in regulating nociceptive transmission to the spinal dorsal horn from the periphery. Intrathecal administration of galanin in rats modulates nociceptive behavior in a biphasic manner such that galanin at low and high doses produces nociception and antinociception, respectively. In order to know cellular mechanisms for this effect, we investigated the effect of galanin on glutamatergic spontaneous excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons of adult rat spinal cord slices by use of the whole-cell patch-clamp technique. In 83% of the neurons examined ($n=29$), galanin ($0.03\text{ }\mu\text{M}$) superfused for 2 min increased the frequency of spontaneous excitatory postsynaptic current (sEPSC) recorded at -70 mV without a change in its amplitude and also in holding currents. The remaining neurons produced a small outward ($n=4$) or inward current ($n=1$). This pre-synaptic effect was dose-dependent with an EC_{50} value of $0.0029\text{ }\mu\text{M}$, and was mimicked by a selective GalR2/R3 agonist galanin (2–11) but not a selective GalR1 agonist M617. Superfusing galanin at a higher dose such as $0.1\text{ }\mu\text{M}$ for 2 min produced an outward current in 39% of SG neurons tested ($n=33$). Twelve % of the SG neurons had an inward current and the remaining neurons did not change holding currents. The outward current produced by galanin had an EC_{50} value of $0.042\text{ }\mu\text{M}$, and was mimicked by M617 but not galanin (2–11). The sEPSC frequency increase and outward current persisted in the presence of a Na^+ -channel blocker tetrodotoxin. It is concluded that galanin at lower doses enhances the spontaneous release of L-glutamate from nerve terminals by activating GalR2/R3 while galanin at higher doses produces a membrane hyperpolarization by activating GalR1 in the SG. This pre- and postsynaptic effects could contribute to at least a part of the behavioral effect of galanin.

Key words: Galanin; Excitatory transmission; Spinal dorsal horn; Rat;
Patch-clamp technique

ラット脊髄後角ニューロンの興奮性シナプス伝達に対する ガラニンのシナプス前性および後性作用

岳 海源／藤田 亜美／柳 涛／朴 蓮花／蔣 昌宇

水田 恒太郎／中塚 映政／熊本 栄一

佐賀大学医学部 生体構造機能学講座（神経生理学分野）

はじめに

ガラニンは 29/30 個のアミノ酸残基からなる神経ペプチドの 1 つで、摂食や痛みなどの様々な生理作用に重要な役割を果たしている^{15,19)}。ガラニン受容体は、現在、3 種類 (GalR1-3) がクローニングされており、いずれも G タンパク質共役型である¹⁵⁾。ガラニンが皮膚末梢から脊髄後角に至る痛み伝達の制御に関与することを示す多くの証拠がある。例えば、(1) 後根神経節や脊髄後角におけるガラニン様免疫活性とガラニン受容体 mRNA の存在^{2,20)}、(2) ガラニンの脊髄腔内投与により皮膚末梢に与えられた痛み刺激に対する応答が修飾されること^{3,13,16)}、(3) 足底へのカラゲニン投与による炎症で誘起される後根神経節や脊髄後角におけるガラニン mRNA 量の変化⁹⁾、(4) 後根神経節においてガラニンを過剰発現させたトランスジェニックマウスにおける痛み行動の変化⁷⁾である。

脊髄後角の膠様質 (Rexed の第 II 層) は、皮膚末梢からの痛み情報がグルタミン酸作動性の 1 次求心性線維により後根を通過して単シナプス性、あるいは興奮性や抑制性の介在ニューロンを介して多シナプス性に入力する部位である。この膠様質がオピオイドやアデノシンをはじめ多くの内因性鎮痛物質による痛み情報伝達の制御に重要な役割を果たすことは数多くの研究により明らかにされている^{5,6,12,22)}。若齢ラット

(3~6 週齢) の膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達に及ぼすガラニン受容体の作動薬や阻害薬の作用はごく最近報告されているが¹⁾、ガラニン自身の作用はまだ調べられていない。我々は、脊髄の痛み伝達制御におけるガラニンの役割の詳細を知る目的で、成熟ラット脊髄横断スライスの膠様質ニューロンヘブラインド・ホールセル・パッチクランプ法を適用し、自発性興奮性シナプス伝達に及ぼすガラニンの効果を調べた。

方 法

本実験の計画は佐賀大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

1. 脊髄スライス標本の作製

脊髄横断スライスは、以前の報告と同様に^{23,24)}、Sprague-Dawley 系の成熟雄性ラット (6~7 週齢) から作製した。まず、ウレタン (1.2~1.5 g/kg を腹腔内投与) で深麻酔したラットを加温パッドの上で腹臥位とした。そして、腰仙部の椎弓切除を行い、1.5~2.0 cm の長さで切り出した L1~S3 レベルの脊髄を酸素飽和した人工脳脊髄液 (2~4℃) に浸した。実体顕微鏡下で硬膜を除去した後、後根および前根をすべて切除し、その後、クモ膜や軟膜を除去した。このような脊髄断片を寒天ブロックに設けた浅い溝の

上に置き、マイクロライザー（堂阪イーエムのDTK-1000）を用い約 650 μm の厚さの脊髓横断スライスを作製した。切り出したスライスを直ちに記録用チェンバー内のナイロンメッシュの上に置き、上から銀線に装置した EM グリッドで軽く固定した。そのスライスの両面を酸素負荷すると共に加温 ($36 \pm 1^\circ\text{C}$) した人工脳脊髄液により 15~20 ml/分の速度で灌流した。人工脳脊髄液（クレブス液）の組成 (mM) は、NaCl, 117; KCl, 3.6; CaCl_2 , 2.5; MgCl_2 , 1.2; NaH_2PO_4 , 1.2; glucose, 11; NaHCO_3 , 25 (pH = 7.4) であった。

2. 脊髓膠様質ニューロンからのパッチクランプ記録

実体顕微鏡下 (20~40 倍) において、脊髓スライスへ下方から透過光を当てると、膠様質は後角の灰白質部表層に位置する半透明なバンド状として視認可能である。以前の報告と同様に^{23, 24)}、パッチ電極を膠様質に刺入し、ギガオーム・シールを形成した後、膠様質ニューロンからホールセル記録を行った。パッチ電極は入力抵抗が 10~15 M Ω のものを用い、その内液組成 (mM) は、K-gluconate, 135; KCl, 5; CaCl_2 , 0.5; MgCl_2 , 2; EGTA, 5; HEPES, 5; Mg-ATP, 5 (pH = 7.2) であった。膜電位固定下の自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current: sEPSC) は、-70 mV (Cl^- チャンネル電流の逆転電位) の保持膜電位で記録した。この膜電流をパッチクランプ用増幅器 (HEKA 社製の EPC-7) により増幅し、A/D 変換 (Molecular Devices 製の Digidata 1200) 後、データ記録および解析用のソフトウェア (Molecular Devices 製の pCLAMP 9) を用いてコンピューターにより記録・解析した。sEPSC は non-NMDA 受容体阻害剤である CNQX (10 μM) 存在下で消失す

るので神経終末から放出されたグルタミン酸によるシナプス後細胞の non-NMDA 受容体活性化によることがわかる^{23,24)}。また、sEPSC は Na^+ チャンネル阻害剤であるテトロドトキシン (TTX; 0.5 μM) により影響を受けないので、その発生は膠様質ニューロンへシナプス入力する興奮性ニューロンの興奮によるものではない^{23, 24)}。実験結果は平均 $\pm$ 標準誤差 (S.E.M.) で表し、検定は Student の t-test で行い、危険率 5% 未満 ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。括弧内の n の値は記録したニューロンの数である。

使用した薬物について、ガラニン（ペプチド研究所（大阪）から、galanin (2-11) は Sigma-Aldrich から、TTX は和光純薬から購入し、M617 は U. Sollenberg 氏（スウェーデンのストックホルム大学）から供与された。無 Ca^{2+} 液は Mg^{2+} を 5 mM 含んでおり、浸透圧は Na^+ 濃度を下げることで調整した。

結 果

ガラニンの作用は、-55 mV より深い静止膜電位を持つ 180 個の膠様質ニューロンから -70 mV の保持膜電位で調べられた。すべてのニューロンは下向きに記録される時間経過の速い膜電流である sEPSC を示した。

1. ガラニンのシナプス前性作用

ガラニン (0.03 μM) を 2 分間灌流投与すると、**Fig.1-A** で示すように、調べたニューロン (n=29) の 83% で保持膜電流の変化なしに sEPSC の発生頻度が増加した。**Fig.1-B** は、sEPSC の発生頻度と振幅に及ぼすガラニン (0.03 μM) の作用の経時変化を示している。ガラニン投与開始後 2 分位から発生頻度が増加し始め、ガラニン

Fig.1 Galanin (Gal; 0.03 μ M) presynaptically enhances glutamatergic spontaneous excitatory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons.

(A) Recordings of sEPSCs in the absence and presence of Gal. In this and subsequent figures, duration of drug superfusion is shown by a horizontal bar above chart recording and consecutive traces of sEPSCs for a period indicated by a short bar below the chart recording are shown in an expanded time scale. (B) Time courses of changes in the frequency (●) and amplitude (○) of sEPSC under the action of Gal, relative to control; they were measured every 0.5 min. Holding potential (V_H) = -70 mV.

除去後、4分位でコントロールレベルに戻った。この増加は振幅の変化を伴っていなかった。ガラニン投与開始後2.5分における sEPSC の発生頻度と振幅は、それぞれコントロールの $166 \pm 13\%$ ($n=24$; $p<0.05$) と $101 \pm 1\%$ ($n=24$; $p>0.05$) であった。残りの5個のニューロンのうち4個のニューロンは 4.2 ± 0.3 pA ($n=4$) の振幅を持つ外向き膜電流を、1個のニューロンは2.4 pA の内向き膜電流を生じた。このように保持膜電流が変化したニューロンでは sEPSC の分析を行わなかった(後述)。

ガラニン (0.03 μ M) による sEPSC の発生頻度

Fig.2 The presynaptic effect of galanin is resistant to a voltage-gated Na^+ -channel blocker tetrodotoxin (TTX; 0.5 μ M) and sensitive to extracellular Ca^{2+} concentration.

Recordings of sEPSCs in the absence and presence of Gal in TTX-containing (A) or nominally- Ca^{2+} free Krebs solution (B). V_H = -70 mV.

増加は TTX (0.5 μ M) 存在下で影響を受けなかった (Fig.2-A)。ガラニン投与開始後2.5分において、調べたニューロン ($n=16$) の75%で保持膜電流の変化なしに sEPSC の発生頻度が $61 \pm 29\%$ ($n=12$; $p<0.05$) だけ増加し、この値は TTX なしの場合の値 ($66 \pm 13\%$; $n=24$) と比べて異なっていなかった ($p>0.05$)。残りのニューロンは sEPSC の発生頻度の増加を示さなかった。無 Ca^{2+} 液中でガラニン (0.03 μ M) の作用を調べたところ、Fig.2-B で示すように、調べたニューロン ($n=10$) のすべてにおいて、保持膜電流や自発性興奮性シナプス伝達の変化はみられず、ガラニン投与開始後2.5分における sEPSC の発生頻度と振幅は、それぞれコントロールの $103 \pm 3\%$ ($n=10$; $p>0.05$) と $100 \pm 1\%$ ($n=10$; $p>0.05$) であった。

ガラニンによる sEPSC の発生頻度増加は濃度依存性であり、0.001 μ M のような低濃度では作用はみられず、0.01 μ M、0.03 μ M と濃度の増加と共に作用は大きくなったが、0.3 μ M まで増

Fig.3 The presynaptic effect of galanin is dose-dependent.

(A) Recordings of sEPSCs in the absence and presence of Gal at 0.01 μM (upper) or 0.3 μM (lower). (B) Dose-response curves for the frequency (●) and amplitude (○) of sEPSC under the action of Gal, relative to control, in neurons which did not change holding currents. Here, were plotted data obtained from neurons which increased sEPSC frequency by > 5% in response to Gal. The proportions of neurons sensitive to Gal at 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1 and 0.3 μM were 0/8 (0%), 0/4 (0%), 5/11 (45%), 5/7 (71%), 20/24 (83%), 11/15 (73%) and 8/11 (73%), respectively. Remaining neurons did not change sEPSC frequency over 5%. In this and subsequent figures, each point with vertical bars represents the mean and S.E.M.; the S.E.M. of the values without a vertical bar was within the size of symbol. The solid line was drawn according to the Hill equation; the EC₅₀ value was 0.0029 μM (Hill coefficient: 2.4). V_H = -70 mV.

加すると逆に小さくなる傾向がみられた (Fig.3-A)。ガラニンの濃度が高くなると、外向き膜電流を誘起するニューロンの割合が増えたが (後

Fig.4 The presynaptic effect of galanin is mediated by GalR2/R3 but not GalR1.

Recordings of sEPSCs in the absence and presence of a GalR1 agonist M617 (0.03 μM; A) or a GalR2/R3 agonist galanin (2-11) (Gal 2-11; 0.03 μM; B). V_H = -70 mV.

述), この電流存在下では短絡効果により sEPSC の振幅を正確に見積もることができないので保持膜電流の変化がないニューロンにおいてのみ sEPSC の定量的な解析を行った。Fig.3-B は, 保持膜電流の変化のないニューロンにおける sEPSC の振幅と発生頻度に対するガラニンの作用の濃度依存性を示している。0.003 μM から 0.3 μM の範囲で振幅は変化せずに発生頻度のみが濃度の増加と共に増加した。Hill プロットに従って解析すると, 最大効果の半分を示す濃度である EC₅₀ は 0.0029 μM (Hill 係数 = 2.4) であった。

Fig.4 はガラニン受容体作動薬が自発性興奮性シナプス伝達に及ぼす作用を示している。GalR1 の作動薬である M617 (0.03 μM) は, Fig.4-A で示すように, その発生頻度に影響を及ぼさず, 投与開始後 2.5 分でコントロールの $101 \pm 2\%$ (n=4; p>0.05) であった。一方, GalR2/R3 の作動薬である galanin (2-11) (0.03 μM) は発生頻度を増加させ (Fig.4-B), 投与開始後 2.5 分でコントロールの $180 \pm 18\%$ (n=4; p<0.05) であった。これらのいずれの作動薬も sEPSC の振幅には影響しなかった。

Fig.5 Two types of changes in holding currents following galanin (0.1 μ M) superfusion in SG neurons. Thirty-nine % of the neurons examined ($n=33$) showed an outward current, as seen in (A), while 12% of them had an inward current (B). Remaining neurons (49%) did not postsynaptically respond to Gal. $V_H = -70$ mV.

Fig.6 Galanin produces an outward current in a dose-dependent manner.

(A) Chart recording showing an outward current produced by Gal at 0.03 or 1 μ M. (B) Peak amplitudes of outward currents elicited by Gal at various concentrations, which were plotted against the logarithm of Gal concentration. The proportions of neurons which produced outward currents in response to Gal at 0.0003, 0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μ M were 0/8 (0%), 0/4 (0%), 0/11 (0%), 1/9 (11%), 4/29 (14%), 13/33 (39%), 11/24 (46%) and 4/6 (67%), respectively. Gal at 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μ M produced inward currents in 11%, 3%, 12%, 4% and 13% of the neurons tested, respectively, while the remaining neurons did not respond to Gal. The solid line was drawn according to the Hill equation; the EC_{50} value was 0.044 μ M (Hill coefficient: 1.0). $V_H = -70$ mV.

Fig.7 Galanin-induced outward current is mediated by GalR1 but not GalR2/R3 in SG neurons. Chart recording in the absence and presence of M617 (1 μ M; A) or Gal 2-11 (1 μ M; B). $V_H = -70$ mV.

2. ガラニンのシナプス後性作用

0.1 μ M のような高い濃度のガラニンを2分間灌流投与すると、**Fig.5-A**で示すように、調べたニューロン ($n=33$) の39%で外向き膜電流が誘起された。その振幅の大きさは 8.0 ± 0.9 pA ($n=13$)であった。残りのニューロンのうち12%は 5.3 ± 1.8 pA ($n=4$)の振幅を持つ内向き膜電流を(**Fig.5-B**), 49% ($n=16$)は保持膜電流の変化を示さなかった。

Fig.6-Aはガラニンの外向き膜電流誘起作用の濃度依存性を示している。0.03 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M と、その濃度の増加と共に外向き膜電流の振幅の大きさ、また、外向き膜電流を誘起するニューロンの割合が増加した。**Fig.6-B**は多くのニューロンから得られた結果をまとめたもので、外向き膜電流の振幅をガラニン濃度に対してプロットした濃度-応答曲線を示している。Hill プロットに従って解析したところ、 EC_{50} 値は 0.044 μ M (Hill 係数は 1.0)であった。このようなガラニン作用は、sEPSC の発生頻度の増加と同様、TTX (0.5 μ M) 存在下でもみられた ($n=4$)。

ガラニン受容体の作動薬が保持膜電流に及ぼす作用を調べたところ、M617 (1 μ M) は調べたニューロン (n=10) の 70% で 9.1 ± 2.2 pA (n=7) の振幅を持つ外向き膜電流を誘起し (**Fig.7-A**), 残りのニューロンでは保持膜電流を変化させなかった。一方, galanin (2-11) (1 μ M) は調べたすべてのニューロン (n=10) で保持膜電流を変化させなかった (**Fig.7-B**)。

考 察

本研究は、脊髓膠様質ニューロンにおいて、ガラニンが sEPSC の振幅を変えずにその発生頻度を増加させること、つまり、シナプス後細胞の non-NMDA 受容体のグルタミン酸感受性を変えずに神経終末からのグルタミン酸放出を促進することを明らかにした。また、ガラニンは -70 mV において、多くのニューロンで外向き膜電流、いくつかのニューロンで内向き膜電流を誘起することを明らかにしたが、この保持電位は静止膜電位付近であるので、それぞれ、膜の過分極と脱分極に対応している。グルタミン酸放出促進と膜過分極のいずれも TTX により影響を受けなかったのでガラニンの直接作用であることがわかる。グルタミン酸放出促進作用は膜過分極作用よりも低い濃度でみられ、前者の作用の EC₅₀ 値は後者の作用のものよりも約 15 倍だけ小さかった。

グルタミン酸放出促進は GalR2/R3 の作動薬である galanin (2-11) でみられることより GalR2/R3 の活性化を介することが示唆される。この結果と一致して、脊髓や後根神経節で GalR2 と GalR3 の mRNA の存在が示されている²⁰⁾。また、膜過分極は GalR1 の作動薬である M617 でみられることより GalR1 の活性化を

介することが示唆される。この考えを支持することには、脊髓後角のニューロンに GalR1 蛋白が発現していることが報告されている¹⁴⁾。以上の結果は、低濃度のガラニンは GalR2/R3 を活性化する一方、高濃度のガラニンは GalR1 を活性化することを示しているが、これは結合実験による GalR1, GalR2, GalR3 に対するガラニンの親和性とは逆の結果であった。すなわち、ガラニンの結合親和性は GalR1, GalR2, GalR3 の順に小さくなった⁴⁾。これはガラニンがその受容体に結合した後に起こるグルタミン酸放出促進と膜過分極のそれぞれに至る細胞内機序の違いに起因する可能性があるが、今後、この点を検討する必要がある。ガラニンそれ自身は用いられなかったが、若齢ラットの膠様質ニューロンの興奮性シナプス伝達において我々のものと似たような結果が薬理学的手法により得られている¹⁾。すなわち、神経終末では GalR2 の活性化がグルタミン酸放出を促進する一方、シナプス後細胞では GalR1 活性化による内向き整流性の伝導度の増加や GalR2 活性化による外向き整流性の伝導度の増加および減少が起こることが明らかにされている。小腸の筋層間ニューロンや脳弓下器官ニューロンではガラニンにより膜過分極が誘起されること^{10,18)}、また、前脳基底部のコリン作動性ニューロンではガラニンにより様々な種類の K⁺チャネルが抑制されることが報告されている⁸⁾。ガラニンによる脊髓膠様質ニューロンの膜電位の変化にどんな種類のイオンチャネルの開閉が関与しているかは今後調べる必要がある。

脊髓膠様質ニューロンは痛み伝達の制御に重要な役割を果たす部位であり、オピオイドやアデノシンのような内因性鎮痛物質により膜過分極やグルタミン酸放出抑制が誘起される^{5,12)}。

Fig.8 Schematic diagram showing the effect of galanin on glutamatergic excitatory synaptic transmission in SG neurons.

Gal at low doses activates GalR2/R3 in nerve terminals to increase the release of L-glutamate to SG neurons while Gal at high doses acts on GalR1 in postsynaptic neurons to produce a membrane hyperpolarization. The former action increases the excitability of SG neurons and the latter one decreases its excitability; they could contribute to nociception and antinociception, respectively.

本研究により明らかにされた低濃度のガラニンによる GalR2/R3 活性化を介したグルタミン酸放出促進と高濃度のガラニンによる GalR1 活性化を介した膜過分極は、それぞれ痛み伝達の促進と抑制に関与することが示唆される (**Fig.8**)。この結果と一致して、行動生理学の実験により、脊髄腔内に投与されたガラニンは、低濃度では疼痛、高濃度では鎮痛を起こすことが明らかにされている²¹⁾、前者の作用には GalR2、後者の作用には GalR1 が関与していることが示されている¹⁶⁾。

結 語

ガラニンは低濃度で GalR2/R3 を活性化して膠様質ニューロンへのグルタミン酸放出を促進

し、高濃度で GalR1 を活性化して膠様質ニューロンの膜を過分極することが明らかとなった。グルタミン酸放出の促進は疼痛を発生させ、膜の過分極は鎮痛を引き起こすと考えられる。これらの結果からガラニンは脊髄後角における痛み伝達制御に細胞レベルの機序で寄与すると推察される。いくつかの膠様質ニューロンでガラニンにより膜の脱分極が起こるが、この薬理学的性質や発生機序を今後調べる必要がある。最近、ラット背側縫線核ニューロンでガラニンが神経末端からの GABA 放出を抑制すると報告されている¹⁷⁾。痛み伝達の制御には抑制性シナプス伝達の修飾も関与しているので¹¹⁾、ガラニンがこの伝達にどんな影響を及ぼすかも今後の検討課題である。

文 献

- 1) Alier, K.A., Chen, Y., Sollenberg, U.E., Langel, Ü., Smith, P.A., Selective stimulation of GalR1 and GalR2 in rat *substantia gelatinosa* reveals a cellular basis for the anti- and pro-nociceptive actions of galanin, *Pain*, 137 (2008) 138-146.
- 2) Ch'ng, J.L.C., Christofides, N.D., Anand, P., Gibson, S.J., Allen, Y.S., Su, H.C., Tatemoto, K., Morrison, J.F.B., Polak, J.M., Bloom, S.R., Distribution of galanin immunoreactivity in the central nervous system and the responses of galanin-containing neuronal pathways to injury, *Neuroscience*, 16 (1985) 343-354.
- 3) Cridland, R.A., Henry, J.L., Effects of intrathecal administration of neuropeptides on a spinal nociceptive reflex in the rat: VIP, galanin, CGRP, TRH, somatostatin and angiotensin II, *Neuropeptides*, 11 (1988) 23-32.
- 4) Florén, A., Land, T., Langel, Ü., Galanin receptor subtypes and ligand binding, *Neuropeptides*, 34 (2000) 331-337.
- 5) Fujita, T., Nakatsuka, T., Kumamoto, E., Opioid receptor activation in spinal dorsal horn. In: E Kumamoto (Ed), *Cellular and Molecular Mechanisms for the Modulation of Nociceptive Transmission in the Peripheral and Central Nervous Systems*, Research Signpost, India, 2007, pp87-111.
- 6) Fürst, S., Transmitters involved in antinociception in the spinal cord, *Brain Res. Bull.*, 48 (1999) 129-141.
- 7) Holmes, F.E., Bacon, A., Pope, R.J.P., Vanderplank, P.A., Kerr, N.C.H., Sukumaran, M., Pachnis, V., Wynick, D., Transgenic overexpression of galanin in the dorsal root ganglia modulates pain-related behavior, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100 (2003) 6180-6185.
- 8) Jhamandas, J.H., Harris, K.H., MacTavish, D., Jassar, B.S., Novel excitatory actions of galanin on rat cholinergic basal forebrain neurons: implications for its role in Alzheimer's disease, *J. Neurophysiol.*, 87 (2002) 696-704.
- 9) Ji, R.-R., Zhang, X., Zhang, Q., Dagerlind, Å., Nilsson, S., Wiesenfeld-Hallin, Z., Hökfelt, T., Central and peripheral expression of galanin in response to inflammation, *Neuroscience*, 68 (1995) 563-576.
- 10) Kai, A., Ono, K., Kawano, H., Honda, E., Nakanishi, O., Inenaga, K., Galanin inhibits neural activity in the subfornical organ in rat slice preparation, *Neuroscience*, 143 (2006) 769-777.
- 11) Kohno, T., A role of spinal inhibition in neuropathic pain. In: E Kumamoto (Ed), *Cellular and Molecular Mechanisms for the Modulation of Nociceptive Transmission in the Peripheral and Central Nervous Systems*, Research Signpost, India, 2007, pp131-145.
- 12) Kumamoto, E., Fujita, T., Role of adenosine in regulating nociceptive transmission in the spinal dorsal horn. In: SG Pandalai (Ed), *Recent Res Devel Physiol*, Vol. 3, Research Signpost, India, 2005, pp39-57.
- 13) Kuraishi, Y., Kawamura, M., Yamaguchi, T., Houtani, T., Kawabata, S., Futaki, S., Fujii, N., Satoh, M., Intrathecal injections of galanin and its antiserum affect nociceptive response of rat to mechanical, but not thermal, stimuli, *Pain*, 44 (1991) 321-324.
- 14) Landry, M., Bouali-Benazzouz, R., André, C., Shi, T.J.S., Léger, C., Nagy, F., Hökfelt, T., Galanin receptor 1 is expressed in a subpopulation of glutamatergic interneurons in the dorsal horn of the rat spinal cord, *J. Comp. Neurol.*, 499 (2006) 391-403.
- 15) Lang, R., Gundlach, A.L., Kofler, B., The galanin peptide family: receptor pharmacology, pleiotropic biological actions, and implications in health and disease, *Pharmacol. Ther.*, 115 (2007) 177-207.
- 16) Liu, H.-X., Brumovsky, P., Schmidt, R., Brown, W., Payza, K., Hodzic, L., Pou, C., Godbout, C., Hökfelt, T., Receptor subtype-specific pronociceptive and analgesic actions of galanin in the spinal cord: selective actions via GalR1 and GalR2 receptors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98 (2001) 9960-9964.
- 17) Sharkey, L.M., Madamba, S.G., Siggins, G.R., Bartfai, T., Galanin alters GABAergic neurotransmission in the dorsal raphe nucleus, *Neurochem. Res.*, 33 (2008) 285-291.
- 18) Tamura, K., Palmer, J.M., Winkelmann, C.K., Wood, J.D., Mechanism of action of galanin on myenteric neurons, *J. Neurophysiol.*, 60 (1988) 966-979.
- 19) Tatemoto, K., Rökaeus, Å., Jörnvall, H., McDonald, T.J., Mutt, V., Galanin—a novel biologically active peptide from porcine intestine, *FEBS Lett.*, 164 (1983) 124-128.
- 20) Waters, S.M., Krause, J.E., Distribution of galanin-1, -2 and -3 receptor messenger RNAs in central and peripheral rat tissues, *Neuroscience*, 95 (2000) 265-271.
- 21) Wiesenfeld-Hallin, Z., Villar, M.J., Hökfelt, T., The effects of intrathecal galanin and C-fiber stimulation on the flexor reflex in the rat, *Brain Res.*, 486 (1989) 205-213.
- 22) Willis, Jr. W.D., Coggeshall, R.E., *Sensory Mechanisms of the Spinal Cord*. 2nd edition, Plenum Press, New York, 1991, pp94-115.

- 23) Yue, H.-Y., Fujita, T., Kawasaki, Y., Kumamoto, E., AM404 enhances the spontaneous release of L-glutamate in a manner sensitive to capsazepine in adult rat substantia gelatinosa neurones, *Brain Res.*, 1018 (2004) 283-287.
- 24) Yue, H.-Y., Fujita, T., Kumamoto, E., Phospholipase A2 activation by melittin enhances spontaneous glutamatergic excitatory transmission in rat substantia gelatinosa neurons, *Neuroscience*, 135 (2005) 485-495.