

令和元年6月3日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11765

研究課題名(和文)オピオイド受容体の高次痛覚中枢における局所神経回路修飾作用の解明

研究課題名(英文) Opioid subtype-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission and excitatory propagation in the rat insular cortex

研究代表者

大井 良之 (OI, Yoshiyuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：60271342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ラット急性脳スライス標本を用いた同時ホールセル記録により、島皮質において、 μ オピオイド受容体アゴニストとオピオイド受容体アゴニストではシナプス後細胞の種類により異なる抑制性シナプス調節効果を示した。In vivoラットでの膜電位感受性色素を用いた光学計測により、島皮質における歯髄刺激応答に対して、 μ オピオイド受容体アゴニストは応答を減弱させるが、オピオイド受容体アゴニストは応答を増強した。 μ オピオイド受容体を発現する皮質抑制性ニューロンは皮質コリン作動性ニューロン(CCN)であり、周囲のCCNと電気的結合を有し、抑制性ニューロンに投射して皮質活動性の調節を行っていることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身麻酔で用いられる麻薬性鎮痛薬は、大脳皮質において興奮性シナプス伝達をオピオイド受容体が抑制することは知られているが、抑制性シナプス伝達に対する作用は不明であった。本研究結果から、強力な鎮痛作用を発揮する μ オピオイド受容体アゴニストは、強力な抑制性ニューロンであるFSに投射する抑制性シナプスを選択的に抑制することでFSを脱抑制させ、島皮質における侵害刺激応答を減らすことが分かった。また、CCNは電気的および化学的シナプスを通じて島皮質ニューロンの活動性の調節に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。これらのメカニズムを解明することで、より副作用の少ない鎮痛薬の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Pyramidal and GABAergic neurons in the rat insular cortex (IC) were recorded by a multiple whole-cell patch-clamp technique. DAMGO, a mu opioidergic agonist, reduced unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSC) amplitude in fast-spiking interneuron (FS) FS connections without a significant effect on FS pyramidal cell (Pyr) connections. The delta opioidergic agonist, DPDPE, reduced uIPSC amplitude in FS FS/Pyr connections. U50488, a kappa opioidergic agonist, had little effect on uIPSC in FS FS/Pyr connections. To assess the opioidergic effects on the cortical circuits, we obtained in vivo optical imaging. DAMGO suppressed the amplitude of cortical excitation induced by electrical stimulation of the upper molar pulp. In contrast, DPDPE increased the amplitude of excitation. These results suggest that mu opioid receptor (MOR)-induced suppression of excitatory propagation in the IC is an underlying mechanism of the powerful analgesic effects of MOR agonists.

研究分野：麻酔学

キーワード：オピオイド受容体 島皮質 抑制性シナプス伝達 皮質コリン作動性ニューロン ホールセル・パッチ
クランプ法 光学計測法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔に用いられる麻薬性鎮痛薬は、オピオイド受容体を介して鎮痛作用を発揮する。大脳皮質において、オピオイド受容体活性化により興奮性ニューロンのシナプス伝達を抑制することはすでに報告されている。しかし、抑制性ニューロンのシナプス伝達において、オピオイド受容体がどのように鎮痛効果に影響を及ぼしているかは解明されていなかった。

また、大脳皮質において、 μ オピオイド受容体発現抑制性介在ニューロンは高頻度に vasoactive intestinal peptide (VIP) およびニコチン型アセチルコリン受容体を発現しており、前脳基底核からのコリン作動性ニューロンの投射を受けて大脳皮質局所回路の調節を行っていると考えられる。しかし、VIP 陽性ニューロンの局所回路に対する修飾作用は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、各種オピオイド受容体およびオピオイド受容体発現ニューロンによる大脳皮質局所神経回路の修飾作用を解明することで、麻薬性鎮痛薬の作用機序を解明することを最終的な目的とした。この目的を達成するために、以下の小目的を設定した。

- (1) オピオイド受容体は μ , δ , および κ オピオイド受容体のサブタイプに分類できる。また、大脳皮質において抑制性介在ニューロンは、電気生理学的発火特性により fast-spiking 細胞 (FS) と non-FS に分類できる。各種オピオイド受容体サブタイプが FS および non-FS による抑制性シナプス伝達をどのように修飾するかを解析することで、シナプスレベルでの大脳皮質局所神経回路における各種オピオイド受容体の抑制性シナプス伝達修飾作用の詳細を解明する。
- (2) (1)の結果として、痛み刺激により誘発される大脳皮質での興奮伝播を各種オピオイド受容体サブタイプがどのように変化させるか解析し、脳領域レベルでのオピオイド受容体の作用を解明する。
- (3) VIP 陽性ニューロンの投射様式および VIP 陽性ニューロンにより形成されるシナプス伝達を解析することで、VIP 陽性ニューロンの大脳皮質局所神経回路に対する修飾作用を解明する。

3. 研究の方法

前述の目的(1)~(3)を解明するために、それぞれ以下の実験を行った。

- (1) 抑制性ニューロンを同定するために、GABA 作動性ニューロンに Venus 蛍光タンパクを発現させた VGAT-Venus ラットを用いた。2~5 週齢の VGAT-Venus ラットをイソフルラン吸入麻酔下にて断頭し、島皮質を含む急性脳スライス標本を作製した。蛍光観察下で Venus 陽性である抑制性ニューロンからホールセル記録を行い、電気生理学的発火特性から FS または non-FS に分類した。さらに周囲のニューロンから同時ホールセル記録を行い、FS または non-FS と抑制性シナプスを形成している細胞を探し出した。シナプス後細胞は、電気生理学的発火特性および Venus 発現の有無から FS, non-FS, および興奮性細胞である錐体細胞 (Pyr) に分類した。シナプス前細胞である FS または non-FS に電流注入を行った際にシナプス後細胞から記録される単一抑制性シナプス後電流 (uIPSC) に対する各種オピオイド受容体選択的アゴニストの修飾作用を検討した。
- (2) 7~8 週齢の SD ラットに対してウレタン麻酔下で気管切開・挿管を行ったのち、金属ワイヤー電極をラット上顎大白歯歯髄に挿入・固定した。その後ラット頭部を脳定位固定装置に固定し、皮膚を切開、開頭して左側島皮質周辺を露出させ、膜電位感受性色素 (RH1691) を付加した。上顎大白歯歯髄に電気刺激 (7 V, 50Hz, 100 msec) を加え、光学計測システムを用いて島皮質での興奮伝播を RH1691 の蛍光強度変化として記録した。さらに各種オピオイド受容体選択的アゴニストを脳表に滴下し、上顎大白歯歯髄電気刺激時の島皮質での興奮伝播がどのように変化するか観察した。
- (3) VGAT-Venus ラットとコリン作動性ニューロンを蛍光標識した ChAT-tdTomato ラットを掛け合わせた自家繁殖ラットを用いて、(1)と同様に島皮質を含む急性脳スライス標本を作製した。島皮質ニューロンから同時ホールセル記録を行い、Venus 発現の有無、tdTomato 発現の有無、電気生理学的発火特性からニューロンを弁別し、VIP 陽性ニューロンの投射様式および VIP 陽性ニューロンにより形成されるシナプス伝達を解析した。

4. 研究成果

前述の方法(1)~(3)から、それぞれ以下の結果を得た。

- (1) μ 受容体アゴニストである DAMGO (1 μ M) 灌流投与により、FS/non-FS \rightarrow FS のシナプスで uIPSC の振幅は有意に減少した。2 発目の 1 発目に対する振幅比 (PPR) は有意な差を示さなかったが、Failure rate は増大し、DAMGO は FS に投射する抑制性シナプスにおいて、シナプス前終末からの GABA の放出を抑制することが示唆された。一方、FS/non-FS \rightarrow Pyr のシナプスでは uIPSC の振幅、PPR、および Failure rate に有意な変化は見られなかった。
 δ 受容体アゴニストである DPDPE (1 μ M) 灌流投与により、FS \rightarrow FS のシナプスで uIPSC の振幅は減少し、PPR および Failure rate は増大した。FS \rightarrow Pyr のシナプスでも Failure rate の増大を伴って uIPSC の振幅は減少し、DPDPE は FS だけでなく Pyr に投射する抑制性シ

ナプスにおいても、シナプス前終末からの GABA の放出を抑制することが示唆された。non-FS→FS/Pyr のシナプスでは uIPSC の振幅, PPR, および Failure rate に有意な変化は見られなかった。

κ 受容体アゴニストである U504881 (1 μ M) は, FS→FS/Pyr のシナプスにおいて uIPSC の振幅, PPR, および Failure rate に有意な変化をもたらさなかった。

以上の結果から、各種オピオイド受容体サブタイプは大脳皮質において、シナプスを構成する細胞の違いによりそれぞれ異なる抑制性シナプス伝達修飾作用を示すことが分かった。なお、本研究結果の詳細は Neuroscience 誌に掲載されている (Yokota et al., 2016, 雑誌論文)。

- (2) μ 受容体アゴニストである DAMGO (10 μ M および 100 μ M) は、上顎大臼歯歯髄電気刺激に対する島皮質での膜電位感受性色素の光学応答の振幅を有意に減少させた (Fig. a and b)。一方、 δ 受容体アゴニストである DPDPE (10 μ M および 100 μ M) 脳表付加により、歯髄電気刺激に対する膜電位感受性色素の光学応答の振幅は有意に増大した (Fig. c and d)。 κ 受容体アゴニストである U50488 (10 μ M および 100 μ M) では、歯髄刺激による膜電位感受性色素の光学応答は変化しなかった。

以上の結果から、 μ 受容体と δ 受容体では、島領域の興奮性に対して逆の作用を示すことがわかった。なお、本研究結果の詳細は Neuroscience letters 誌に掲載されている (Yokota et al., 2016, 雑誌論文)。

- (3) 島皮質において VIP 陽性ニューロンはコリンアセチルコリントランスフェラーゼを発現しており、GABA 作動性ニューロンであると同時に皮質コリン作動性ニューロン (CCN) でもあることが分かった。CCN は島皮質において、主に FS および non-FS の一種である low threshold spike ニューロン (LTS) に投射しており、Pyr への投射はほとんど見られないことがわかった。また、CCN はしばしば近傍の皮質 CCN と化学的および電気的結合を有しており、発火同期性を示すことが分かった。アセチルコリンまたはカルバコール灌流投与により、自発性興奮性シナプス後電位は FS および LTS では減弱し、Pyr では増強した。ニコチン灌流投与でも自発性興奮性シナプス後電位は FS および LTS では減弱し、Pyr では増強したことから、CCN はムスカリン型およびニコチン型アセチルコリン受容体を介して間接的に Pyr を脱抑制することが示唆された。

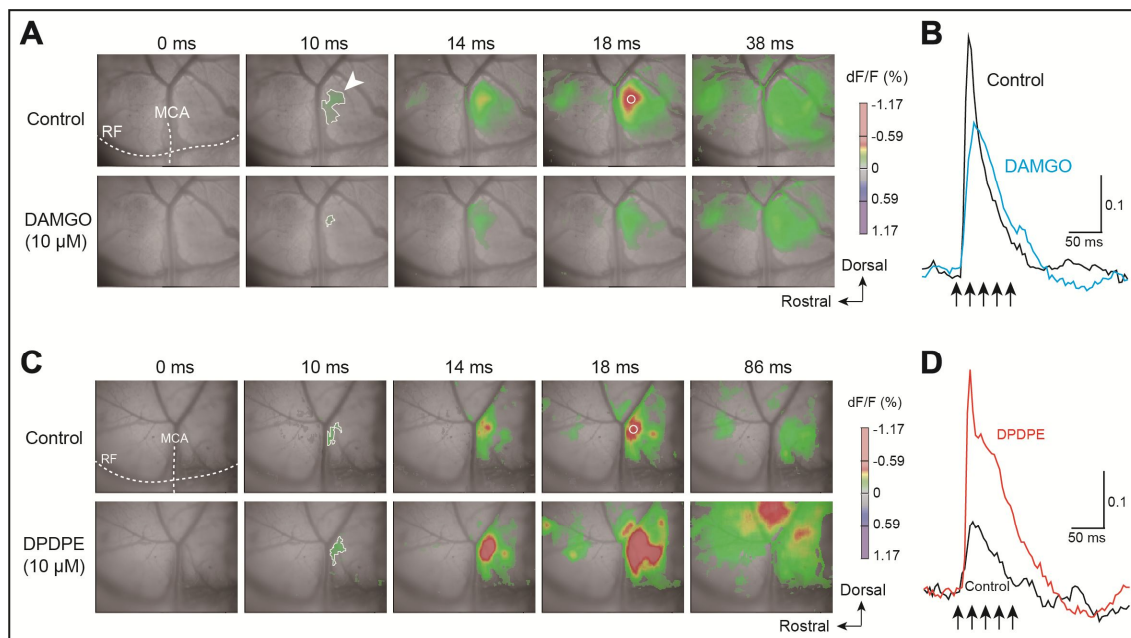


Fig. Effects of DAMGO and DPDPE on cortical excitatory propagation induced by repetitive electrical stimulation of the upper molar pulp.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

Kaneko K, Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M. Propofol-induced spike firing suppression is more pronounced in pyramidal neurons than in fast-spiking neurons in the rat insular cortex. Neuroscience 339, 2016, pp.548-560, 査読有
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.016

Yokota E, Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Opioid subtype- and cell-type dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. Neuroscience 339, 2016, pp.478-490, 査読有
DOI: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.004

Yokota E, Koyanagi Y, Nakamura H, Horinuki E, Oi Y, Kobayashi M. Opposite effects of mu and delta opioid receptor agonists on excitatory propagation induced in rat somatosensory and insular cortices by dental pulp stimulation. *Neuroscience letters* 628, 2016, pp.52-58, 査読有
DOI: 10.1016/j.neulet.2016.05.065

〔学会発表〕(計 7 件)

Kaneko K, Matsumura S, Oi Y, Kobayashi M. Cholinergic interneurons facilitate disinhibition of pyramidal neurons in the rat cerebral cortex. *Neuroscience*, 2018

Kaneko K, Matsumura S, Oi Y, Kobayashi M. Cholinergic inputs to cortical cholinergic neurons facilitate disinhibition of excitatory neurons in the rat cerebral cortex. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology, 2018

金子啓介, 小柳裕子, 大井良之, 小林真之. ラット無顆粒島皮質における錐体細胞および抑制性介在ニューロンの電気生理学的膜特性に及ぼすプロポフォールの影響. 第 64 回日本麻酔科学会学術集会, 2017

金子啓介, 大井良之, 小林真之. ラット大脳皮質に存在するコリン作動性ニューロンの役割. 第 69 回日本大学歯学会学術大会, 2017

Yokota E, Oi Y, Kobayashi M. Mu and delta opioidergic modulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. *Neuroscience*, 2016

Kaneko K, Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M. Propofol-mediated spike firing suppression is more sensitive in pyramidal neurons than in fast-spiking interneurons in the rat insular cortex. *Neuroscience*, 2016

横田英子, 大井良之, 小林真之. μ および δ オピオイド受容体による無顆粒島皮質における抑制性シナプス伝達修飾作用の解明. 第 134 回日本薬理学会関東部会, 2016

〔その他〕

<http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/pharmacology/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小林 真之

ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Masayuki)

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 00300830

(2)研究協力者

研究協力者氏名：横田 英子

ローマ字氏名：(YOKOTA, Eiko)

研究協力者氏名：金子 啓介

ローマ字氏名：(KANEKO, Keisuke)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。