

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2005～2008

課題番号：17200027

研究課題名（和文） 大脳皮質体性感覚野における痛覚情報処理機構の解明

研究課題名（英文） Clarification of nociceptive transmission in the primary somatosensory cortex

研究代表者

吉村 恵 (YOSHIMURA MEGUMU)

九州大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：10140641

研究成果の概要：大脳皮質体性感覚野における痛覚情報処理機構を明らかにするため、深層の錐体細胞から *in vivo* パッチクランプ記録を行い、皮膚への機械的および温度刺激を加えた時の応答を正常と慢性炎症ラットを用いて解析した。Bursting の頻度と活動電位の発生頻度には正常と炎症ラットで変化がなかったが、機械的痛みと熱および冷刺激を加えると、炎症ラットで活動電位を発生する細胞数が明らかに増加した。これは bursting の振幅が増大したか、細胞の興奮性が増加した可能性を示唆する。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
18年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
19年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
20年度	8,000,000	2,400,000	10,400,000
年度			
総計	35,600,000	10,680,000	46,280,000

研究分野：感覚生理学

科研費の分科・細目：神経科学、神経・筋肉生理学

キーワード：in vivo パッチクランプ、錐体細胞、bursting, EPSP, 慢性炎症、体性感覚野、熱刺激、冷刺激

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質感覚野における情報処理機構については、主に細胞外記録法を用いて解析が進められているが、特に視覚情報に関しては詳細な解析が進んでいる。いくつかの研究室からは、細胞内記録法による解析結果の報告もあるが、*in vivo* での細胞内記録は安定せず、その解析は困難であった。しかし、パッチクランプ法が開発され、微細な細胞からの記録も可能になり、興奮性および抑制性シナプス応答の詳細な解析が進んでいる。しかしながら、その解析の多くは視覚野からのものが多

く、体性感覚野からの感覚情報は齧歯類のヒゲからの入力への解析が主で、皮膚からの侵害性シナプス入力を解析したものは少ない。また、慢性疼痛モデル動物では痛覚過敏やアロディニアが惹起され、末梢および脊髄レベルにおいて受容体の感作や脊髄内受容体や回路の可塑的变化が起こることが報告されている。しかしながら、慢性疼痛モデル動物で末梢および脊髄レベルでおこった変化が大脳皮質体性感覚野に対してどのような影響を示すか、また、その情報処理がどのように行われるかなど、大脳皮質レベルにおける研

究は殆ど見いだし得ない。

2. 研究の目的

末梢からの体性感覚情報は、末梢神経をへて脊髄後角に伝えられ、そこで修飾・統合を受けた後、視床を介して大脳皮質体性感覚野に運ばれ知覚される。今までの研究から、慢性疼痛時には末梢のみならず脊髄レベルでも受容体や回路に可塑的変化が起こる事が報告されている。末梢および脊髄レベルにおける痛覚情報の過剰入力にはさらに第一次体性感覚野にも何らかの変化を引き起こすものと推測される。そこで、先ず正常ラットの大脳皮質体性感覚野における痛覚情報処理機構を明らかにするため *in vivo* パッチクランプ記録法を確立し、受容野皮膚への刺激によって如何なるシナプス応答が惹起されるか、また、その応答はモダリティとどのような相関を持つか等を明らかにする。次いで、*sham* ラットと慢性炎症モデルラットを用い、後肢皮膚へ加えた機械的侵害性刺激、および侵害性温度刺激によって誘起されるシナプス応答を解析し、大脳皮質体性感覚野レベルで如何なる可塑的変化が惹起されるかを明らかにする。

3. 研究の方法

ペントバルビタール麻酔下に成熟ラット後肢足底に complete Freund's adjuvant (CFA) を注入し、慢性炎症モデルラットを作製した。Von Frey Hair によって足底に加えた機械的刺激の閾値の変化を調べた。次いで、ペルチエ素子を用いて熱刺激と冷刺激を行い、如何なる変化が観察されるかを調べた。記録細胞の受容野に侵害熱刺激として 50°C の熱を、また侵害冷刺激として 5°C の刺激を加え痛覚過敏やアロディニアが惹起されているか否かを行動学的に明らかにした。痛覚過敏を示したラットをウレタンで麻酔し、頭部の皮膚を切開した後、3 ml のシリンジから作製した記録用チャンバーを歯科用のセメントを用いて頭蓋骨に固定した。歯科用のドリルを用いて第 1 次体性感覚野に相当する部位に約 1 x 1 mm の穴を開けた。硬膜を微細なハサミを用いて切開した後、クモ膜と軟膜に微細なハリを用いて電極刺入用の穴を作製した。記録用チャンバーを加温した Krebs 液で持続的に灌流した。記録した細胞の同定には、皮質表面からの深さと、記録終了後に neurobiotin を電極から記録細胞に注入し、実験後に固定、染色してその形態学的な特徴から行った。また、記録電極から脱分極電流を流し活動電位の発生様式からも同定を行った。

4. 研究成果

体性感覚野深層の錐体細胞から記録を行

うと、記録を行なった全ての細胞は自発性の *bursting* 活動を示し、振幅の大きな *bursting* は活動電位を誘起した。この *bursting* は膜電位を変化させてもその頻度には影響を受けず、また、皮質表面にグルタミン酸受容体の一つである AMPA 受容体の拮抗薬である CNQX を投与すると完全に消失することから、内因性の活動ではなく、外因性の活動で、他の細胞から同期したグルタミン酸を介した入力を受けていることを示す。また、この *bursting* は麻酔の種類によって大きく変化し、ウレタンで麻酔をすると全ての細胞で振幅の大きな *bursting* が見られるが、ペントバルビタールなどで麻酔をすると、*bursting* は殆んど観察されなくなる。ペントバルビタールが GABA_A 受容体の持続時間を延長することから、*bursting* の発生には GABA ニューロンが関与していることを示唆する。*Bursting* の発生頻度および振幅、また、*bursting* に重畳した活動電位の振幅や幅には *sham* と炎症ラットで有意差はみられなかった。先ず、触刺激による応答を解析したが、僅かな細胞で活動電位の発生頻度が上昇したが、*bursting* の発生頻度には大きな変化が見られなかった。次に、鉤付きのピンセットを用い、皮膚への機械的侵害刺激に対する応答を解析した。

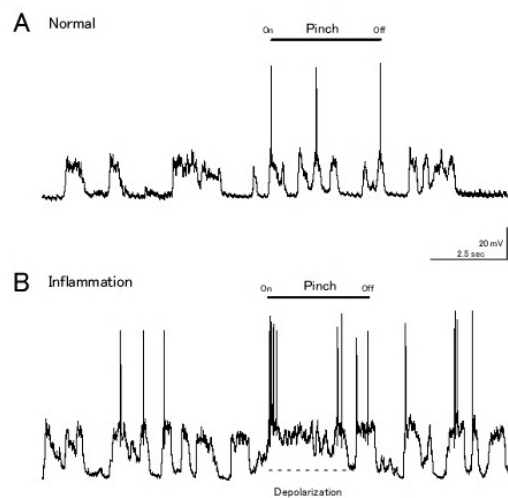


図 1 正常と慢性炎症ラットにおける機械的痛み刺激による応答変化

正常ラットでは痛み刺激を加えても、僅かな *bursting* が活動電位を惹起しているが (A)、炎症ラットでは頻回に活動電位が惹起され、膜の脱分極が見られる (B)。

記録細胞と同側後肢の受容野に痛み刺激を加えると、*sham* ラットでは 30% の細胞でのみ活動電位の発生頻度が増加したが、炎症ラットでは約 60% の細胞で発生頻度の増加

が見られた。すなわち、sham と比較し炎症ラットでは活動電位の発生頻度が高く、膜の脱分極を伴っていた。膜の脱分極は刺激後直ちに元にもどり緩徐なシナプス応答は観察されなかった。この結果から、膜の脱分極は EPSP または **bursting** による加重のためと考えられた。次に、熱刺激を加えたときの活動電位の頻度の変化を解析した。皮膚に 30°C および 40°C の熱刺激を加えたが、何ら変化は見られなかった。そこで、50°C の熱刺激を加えると、活動電位の発生頻度が上昇する細胞が多く観察された。活動電位の頻度が上昇する細胞が Sham ラットでは約 30% で、炎症ラットでは約 60% の細胞で観察され、sham ラットと比較して有意に高かった。熱と同様、5°C の冷刺激を加えると、sham では約 20% の細胞で活動電位の頻度が増加したが、炎症ラットでは 55% と有意に頻度が増加した。

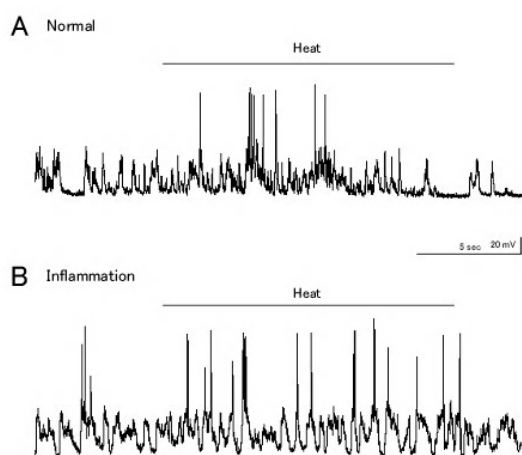


図2 正常と慢性炎症ラットにおける侵害性熱刺激による応答変化

正常ラットでは活動電位が惹起されているものの、その持続は短い (A)。一方、炎症ラットでは刺激に伴い活動電位が持続的に発生している (B)。

以上の結果から、慢性炎症時においては、機械的侵害刺激や熱および冷刺激の応答で、活動電位を発生する細胞の割合が増加し、かつ活動電位の発生頻度も有意に増加した。しかし、**bursting** の発生頻度には明らかな変化がなく、活動電位の発生には **bursting** の振幅の増大を伴っているためか、または、錐体細胞の興奮性が変化したためだと思われる。すなわち、慢性炎症時には脊髄レベルのみならず第 1 次体性感覚野のレベルにおいても何らかの可塑的变化が惹起されている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 16 件)

- ① Abe K, Kato G, Katafuchi T, Tamae A, Furue H and Yoshimura M. Responses to 5-HT in morphologically identified neurons in the rat substantia gelatinosa in vitro. *Neuroscience*, 159(1):316-324, 2009
- ② Takazawa T, Furue H, Nishikawa K, Uta D, Takeshima K, Goto F and Yoshimura M. Actions of propofol on substantia gelatinosa neurones in rat spinal cord revealed by in vitro and in vivo patch-clamp recordings. *European Journal of Neuroscience*, 29(3):518-529, 2009
- ③ Katano T, Furue H, Okuda-Ashitaka E, Tagaya M, Watanabe M, Yoshimura M and Ito S. N-Ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation. *European Journal of Neuroscience*, 27(12):3161-3170, 2008
- ④ Suzuki SC, Furue H, Koga K, Jiang N, Nohmi, M, Shimazaki Y, Katoh-Fukui Y, Yokoyama M, Yoshimura M, Takeichi M. Cadherin-8 is required for the first relay synapses to receive functional inputs from primary sensory afferents for cold sensation. *Journal of Neuroscience*, 24: 3466-3476, 2007
- ⑤ Yasaka T, Kato G, Furue H, Rashid MH, Sonohata M, Tamae A, Murata Y, Masuko S and Yoshimura M. Cell type specific excitatory and inhibitory circuits involving primary afferents in the substantia gelatinosa of the rat spinal dorsal horn in vitro. *Journal of Physiology(London)*, 581(2): 603-618, 2007
- ⑥ Shimada H, Uta D, Nabekura J, Yoshimura M. Involvement of Kv channel subtypes on GABA release in mechanically dissociated neurons from the rat substantia nigra. *Brain Research*, 1141: 74-83, 2007
- ⑦ Doi A, Mizuno M, Katafuchi T, Furue H, Koga K and Yoshimura M. Slow oscillation of membrane currents mediated by glutamatergic inputs of rat somatosensory cortical neurons: in vivo patch-clamp analysis. *European Journal of Neuroscience*, 26(9): 2565-2575, 2007
- ⑧ Tsuda M, Ishii S, Masuda T, Hasegawa S, Nakamura K, Nagata K, Yamashita T, Furue H, Tozaki-Saitoh H, Yoshimura M, Koizumi S, Shimizu T, Inoue K. Reduced

- pain behaviors and extracellular signal-related protein kinase activation in primary sensory neurons by peripheral tissue injury in mice lacking platelet-activating factor receptor. *Journal of Neurochemistry*, 102(5): 1658-1668, 2007
- ⑨ Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuno M, Iwamoto Y and Yoshimura M. Direct GABAergic and glycinergic inhibition of the substantia gelatinosa from the rostral ventromedial medulla revealed by in vivo patch-clamp analysis in rats. *Journal of Neuroscience*, 26(6):1787-1794, 2006
- ⑩ Kawamata M, Furue H, Kozuka Y, Narimatsu E, Yoshimura M and Namiki A. Changes in properties of substantia gelatinosa neurons after surgical incision in the rat: In vivo patch-clamp analysis. *Anesthesiology*, 104:432-440, 2006
- ⑪ Shiokawa H, Nakatsuka T, Furue H, Tsuda M, Katafuchi T, Inoue K and Yoshimura M. Direct excitation of deep dorsal horn neurones in the rat spinal cord by the activation of postsynaptic P2X receptors. *Journal of Physiology(London)*, 573(Pt3):753-763, 2006
- ⑫ Rashid MH, Furue H, Yoshimura M and Ueda H. Tonic inhibitory role of alpha4beta2 subtype of nicotinic acetylcholine receptors on nociceptive transmission in the spinal cord in mice. *Pain*, 125(1-2):125-135, 2006
- ⑬ Tamae A, Nakatsuka T, Koga K, Kato G, Furue H, Katafuchi T and Yoshimura M. Direct inhibition of substantia gelatinosa neurones in the spinal cord by activation of dopamine D2-like receptors. *Journal of Physiology (London)* 568(Pt1):243-253, 2005
- ⑭ Koga K, Furue H, Rashid MH, Takaki A, Katafuchi T and Yoshimura M. Selective activation of primary afferent fibers evaluated by sine-wave electrical stimulation. *Molecular Pain* 1(1):13, 2005
- ⑮ Miyakawa A, Furue H, Katafuchi T, Jiang N, Yasaka T, Kato G and Yoshimura M. Action of neuropeptide Y on nociceptive transmission in substantia gelatinosa of the adult rat spinal dorsal horn. *Neuroscience*, 134(2):595-604, 2005
- ⑯ Matayoshi S, Jiang N, Katafuchi T, Koga K, Furue H, Yasaka T, Nakatsuka T, Zhou XF, Kawasaki Y, Tanaka N and Yoshimura M. Actions of brain-derived neurotrophic factor on the spinal nociceptive transmission during inflammation. *Journal of Physiology (London)*, 569(Pt2):685-695, 2005
- [学会発表] (計 9 件)
- ① Yoshimura M. Bursting activity mediated by glutamatergic inputs in the primary somatosensory cortex in vivo. The 3rd International Conference of Neurons and Brain Diseases, Seoul, Korea, 2008.8.5-7
- ② Yoshimura M, Koga K and Furue H. Modulation of sensory inputs from inflamed region to the primary sensory cortex. The 2nd International Symposium on Design of Artificial Environments. Fukuoka, Japan, 2007.11.29-12.1
- ③ Mizuno M, Doi A, Yasaka T, Furue H, Aou S and Yoshimura M. Cortical membrane potential fluctuations may be modified by thalamocortical inputs in rat barrel cortex in vivo. The 37th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, San Diego, USA, 2007.11.3-7
- ④ Koga K, Shiokawa H, Mizuno M, Doi A, Mizuguchi-Takase H, Furue H and Yoshimura M. Modification of bursting activities in somatosensory cortex in inflamed rats in vivo. Second International Congress on Neuropathic Pain, Berlin, Germany, 2007.6.7-10
- ⑤ Koga K, Shiokawa H, Mizuno M, Doi A, Takase-Mizuguchi H, Furue H and Yoshimura M. In vivo patch clamp analysis of synaptic responses evoked in primary somatosensory cortex in inflamed rats. The 30th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, Yokohama, Japan, 2007.9.10-12
- ⑥ Shiokawa H, Yoshimura M and Takahashi S. Analysis of hypnotic or analgesic effect of anesthetic agents by in-vivo patch clamp recordings from somatosensory cortex in rats. The 54th Annual Meeting of Japanese Society of Anesthesiologists, Hokkaido, Japan, 2007.5.31-6.2
- ⑦ Yoshimura M. Sensory processing and functional reorganization of sensory transmission in the postnatal spinal dorsal horn. The 11th World Congress of Pain, Sydney, Australia,

2005.8.21-26

- ⑧ Doi A, Mizuno M, Furue H, Katafuchi T and Yoshimura M. In vivo patch-clamp analysis of slow bursting in the rat somatosensory cortex. The Fifth Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles Kitakyushu, Japan, 2005.7.22-24
- ⑨ Yoshimura M, Matayoshi S, Furue H, Koga K, Katafuchi T, Yasaka T and Nakatsuka T. Mechanisms of oscillation and sensory processing in the rat somatosensory cortex - In vivo patch-clamp analysis-. The 82nd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan, Sendai, 2005.5.18-20

[図書] (計 4 件)

- ① Furue H, Katafuchi T and Yoshimura M. In vivo patch-clamp technique. In: Patch-Clamp Analysis: advanced techniques, Second Edition. Ed. by Walz W., Humana Press Inc., Totowa, pp.229-251, 2007, 475pages
- ② Yoshimura M. Spinal glutamate receptors. In: Molecular Pain. Ed. Zhuo M., Higher Education Press, Beijing, P. R. China, pp85-95, 2007, 501pages
- ③ Yoshimura M. Whole-cell patch-clamp recording in vivo. In: Molecular Pain. Ed. Zhuo M., Higher Education Press, Beijing, P. R. China, pp459-467, 2007, 501pages
- ④ 古江秀昌. 大脳皮質からの in vivo パッチクランプ法開発. In:ブレインサイエンスレビュー2005 (伊藤正男、河合述史編) クバプロ・(株)ブレインサイエンス振興財団, pp.37-50, 2005

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉村 恵 (YOSHIMURA MEGUMU)
九州大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：10140641

(2) 研究分担者

古江 秀昌 (FURUE HIDEMASA)
九州大学・大学院医学研究院・助教
研究者番号：20304884

(3) 連携研究者

片渕 俊彦 (KATAFUCHI TOSHIHIKO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号：80177401