

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17266

研究課題名(和文) オプトジェネティクス法を用いた島皮質による侵害情報に対する修飾作用の解明

研究課題名(英文) Explication of modulatory action to infringement information by insular cortex using optogenetics way

研究代表者

武井 浩樹 (TAKEI, Hiroki)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：50632543

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯髄侵害情報を伝える三叉神経第三枝である下歯槽神経に5回連続の電気刺激を行った。刺激中に尾側亜核の単一ニューロンレベルでの発火が同期し、刺激前と比較して発火応答が4倍に増加した。本刺激条件に加え、島皮質の電気刺激を実施すると、三叉神経脊髄路核ニューロンの発火応答がさらに上昇した。

ラット延髄スライス標本を作製し、559 nmレーザー光によって島皮質出力ニューロン由来の下行性線維を可視化した。島皮質由来の下行性線維は、尾側亜核の比較的表層に広範囲に分布が認められた。抑制性ならびに興奮性ニューロンから行ったパッチ・クランプ記録ではいずれもEPSCが誘発された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

島皮質から青斑核、結合椀傍核、縫線核への投射経路を示し、GABA受容体の作動薬を無顆粒皮質へ投与することにより、モデル動物の侵害性熱刺激に対する疼痛閾値が上昇すること明らかにされている。島皮質-青斑核の一連の神経回路によって発揮され、痛みの閾値の調節、特に閾値の低下に寄与する神経回路に類似した回路が、島皮質-三叉神経脊髄路核間にも存在する可能性がin vivo実験で示唆された。また、島皮質が三叉神経脊髄路核尾側亜核における種々のニューロンに影響し、修飾する可能性をin vitro実験にて示唆された。

研究成果の概要(英文)：I performed five times consecutive electrical stimulation to the inferior alveolar nerve which was the trigeminal nerve third branch which conveyed pulpal infringement information. The firing at the single neuron level of the caudal part synchronized during stimulation, and firing replies increased to 4 times in comparison with before stimulation. The firing reply of the spinal tract nucleus of trigeminal nerve neuron increase more when I carried out the electrical stimulation of the insular cortex in addition to this stimulation condition. I made rat medulla oblongata slice preparation and visualized bottom bank-related fiber derived from an insular cortex output neuron by a 559 nm laser beam. As for the bottom bank-related fiber derived from insular cortex, distribution was accepted widely by the comparative outer layer of the caudal part. Inhibitory and excitatory neuron caused EPSC by whole-cell patch-clamp.

研究分野：神経生理

キーワード：島皮質 三叉神経脊髄路核尾側亜核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯や舌などの口腔領域の痛みは病気との関連を理解できない小児にとって精神的・肉体的に深い苦痛であり、精神発達に遅れを生じることがある。

口腔内の痛みは三叉神経脊髄路核尾側亜核を經由し、視床を介して島皮質へと伝えられる。以前、光学計測法や細胞外記録法を用いた研究によって、歯の痛みを模した歯髄電気刺激に应答するニューロンが島皮質に存在することを明らかとした。また、下歯槽神経を切断した動物モデルにおいて上顎歯髄刺激に対する皮質の应答範囲が拡大することを明らかにしており、末梢神経の損傷が大脳皮質における神経可塑性を誘発する可能性を示唆している。

四肢からの侵害情報に対して、大脳皮質は中継核である脊髄後角の神経活動を直接または間接的に調節することが知られているが、口腔領域の侵害情報に対するトップダウンによる三叉神経脊髄路核尾側亜核への修飾機構はほとんど不明である。そこで尾側亜核の口腔内の痛みに対する神経活動が、大脳皮質電気刺激によってどのように修飾されるかを検証することとした。

2. 研究の目的

歯髄感覚神経はそのほとんどが A・C 線維で構成されているため痛覚に特化した受容器と言える。侵害情報は感覚神経線維にインパルスとして変換され、三叉神経を介して三叉神経主感覚核・脊髄路核に投射し、視床を經由して大脳皮質へ入力する (Hari et al., 1983; Chudler et al., 1985; Nakamura et al., 2015)。また、下顎切歯への電気刺激によって三叉神経脊髄路核尾側亜核表層に侵害情報を伝えるニューロンが存在すること (Belforte et al., 2005) や、下顎右側の第 1・第 2 臼歯を動かすことで尾側亜核表層に痛みの指標である Fos 蛋白が発現することが明らかになっている (Badral et al., 2013)。加えて、口腔粘膜および舌、口唇の侵害情報も同様に三叉神経主感覚核・脊髄路核へと伝えられる。また、解剖学的手法により、三叉神経主感覚核・脊髄路核に顆粒島皮質・不全顆粒島皮質からの直接的・間接的な投射があることが示されている (Bamett et al., 1991; Sato et al., 2013)。大脳皮質は神経科学的に認知、随意運動、予測、学習などの高次脳機能を担う重要な領域であり、その中でも島皮質は、味覚、嗅覚、触覚、痛覚などの複数の知覚情報に加え、情動、自己意識などにも関与していることが知られる。また解剖学的手法から、腕傍核ならびに青斑核に興奮性線維を投射していることが示されており、これらの神経核の GABA 作動性ニューロン群の興奮を介して、痛みの下行性抑制系に大きく関与している青斑核のノルアドレナリン作動性ニューロンの活動を抑制し、痛みに対する感受性を増大させると考えられている (Jasmin et al., 2003, 2004)。以上のことから、島皮質は口腔領域からの侵害情報入力を受けるだけでなく、同領域からの下行性出力は、島皮質へ情報を中継する尾側亜核に何らかの調節を行っている可能性が考えられる。

手足などの末梢で生じた痛みの感覚は、侵害情報として主として脊髄後根から脊髄に入り、脊髄視床路・脊髄網様体路を介して皮質へと伝えられる一方で、脊髄の侵害受容性ニューロンは中脳水道周囲灰白質を起始とする延髄諸核で中継される下行性抑制系により侵害受容性应答を強力に抑制することが広く知られている (Pael., 1984)。しかし、口腔領域の侵害入力に対する痛みの制御機構である下行性抑制系の有無については不明なままである。口腔領域における下行性抑制系の解明は「耐え難い口腔領域の痛み」を取り除く歯科診療における重要な基盤となり、早期治療の確立と異常性疼痛の回避につながると考えられる。そこで本研究では、口腔領域の痛みに対する島皮質による尾側亜核の神経活動に対する修飾作用の解明を目的し、同心円電極による島皮質電気刺激を用いて、中継核を介した全脳的な尾側亜核への修飾作用を明らかにした。

3. 研究の方法

生後4~5週齢のラットをハロタン麻酔下で細胞外記録による三叉神経尾側亜核の細胞外記録を実施した。本実験では3カ所に刺激用ならびに記録用電極を設置した。島皮質の先行刺激を実施するために、島皮質直上の頭蓋骨を穿孔し、電気刺激用同心円電極を島皮質に設置した。その後、同ラットの三叉神経核上の頭蓋骨を穿孔し、記録用電極を挿入した。また、口腔内疼痛の誘発を目的とし、三叉神経第三枝である下歯槽神経に刺激電極を設置した。

島皮質から投射する下行性線維を選択的に刺激するための光遺伝学的手法によって三叉神経脊髄路核ニューロンから興奮性シナプス応答を記録するために、アデノ随伴ウイルス (AAV) を同皮質に微量注入し、チャンネルロドプシン2 (ChR2) および mCherry を島皮質に発現させた。微量注入後約4週間後に、実験通法により厚さ 350 μm の急性脳スライス標本を作製した。近赤外線微分干渉装置を実装する顕微鏡および CCD カメラにてこれらニューロン種類を探し、Venus 蛍光から抑制性ニューロンと興奮性ニューロンを同定した。

4. 研究成果

歯髄侵害情報を伝える三叉神経第三枝である下歯槽神経に5回連続の電気刺激 (100 μs , 50 Hz, 5 V) を行った。刺激中に尾側亜核の単一ニューロンレベルでの発火が同期し、刺激前と比較して発火応答が4倍に増加した (約 35 events/10 msec)。本刺激条件に加え、下歯槽神経に数マイクロ秒だけ先行する島皮質の電気刺激 (100 μs , 100 Hz, 10 times, 3V) を実施すると、三叉神経脊髄路核ニューロンの発火応答がさらに上昇した (約 50 events/10 msec)。また、島皮質の連続刺激中には三叉神経脊髄路核ニューロンの発火応答の著明な増強は認められなかった。これらの応答は、本来歯髄からの痛覚を含む感覚情報を脳内に伝える役割を果たす神経を電気刺激することで動員されるため、その情報を中継する神経核の活動電位の発火応答が増加することが予想された。一方、三叉神経脊髄路核ニューロンの発火応答の著明な増強が島皮質刺激との組合せで生じるメカニズムは不明である。そこで、ChR2 を発現させるために AAV を島皮質に微量注入した。手術後4週でラット延髄スライス標本を作製し、559 nm レーザ光によって島皮質出力ニューロン由来の下行性線維を可視化した。蛍光タンパクである mCherry で標識された島皮質由来の下行性線維は、尾側亜核の比較的表層に広範囲に分布することが示され、これら線維の一部に終末構造が認められた。そこで、同ウイルスを処置したラットから延髄の急性スライス標本を作製した。GABA 作動性ならびに glycine 作動性ニューロンとして同定される Venus 陽性ニューロンならびに Venus 陰性から行ったパッチ・クランプ記録ではいずれも EPSC が誘発された。Jasmin らは解剖学的手法により無顆粒島皮質から青斑核、結合椀傍核、縫線核への投射経路を示し、GABA 受容体の作動薬を無顆粒皮質へ投与することにより、モデル動物の侵害性熱刺激に対する疼痛閾値が上昇すること明らかにした (Jasmin et al., 2003, 2004)。この無顆粒島皮質-青斑核の一連の神経回路によって発揮され、痛みの閾値の調節、特に閾値の低下に寄与する神経回路に類似した回路が、島皮質 三叉神経脊髄路核間にも存在する可能性が我々の *in vivo* 実験で示唆された。しかし、450 nm 光刺激によって誘発した EPSC が三叉神経脊髄路核内の Venus 陰性ならびに Venus 陽性ニューロンから EPSC が記録されたにもかかわらず、*in vivo* 実験での島皮質への高頻度連続刺激に対して、尾側亜核ニューロンの著明な発火応答が誘発されない齟齬が生じた。尾側亜核ニューロンは、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) などの種々の神経ペプチドに対するいくつかの受容体が発現しており、島皮質由来の下行線維の終末からグルタミン酸とともに、ニューロンの膜特性を修飾する作用を有する神経修飾物質やペプチドが放出される可能性を詳細に検討する必要があると考えられる。

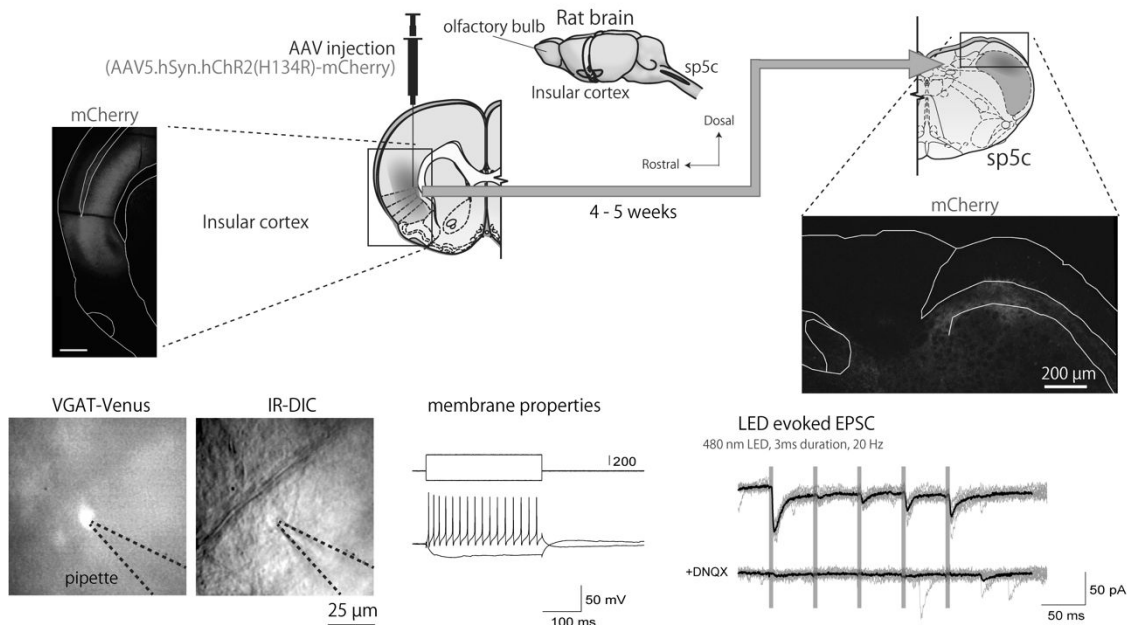


図 島皮質への AAV 導入によって sp5c で発現した ChR2

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shota Murayama, Kiyofumi Yamamoto, Satoshi Fujita, Hiroki Takei, Tadashi Inui, Bunnai Ogiso, Masayuki Kobayashi	4. 巻 149
2. 論文標題 Extracellular glucose-dependent IPSC enhancement by leptin in fast-spiking to pyramidal neuron connections via JAK2-PI3K pathway in the rat insular cortex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 133-148
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考
---------------------------	-----------------------	----