

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462824

研究課題名(和文) In vivoマルチパッチクランプ法による島皮質統合機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of sensory integration in the insular cortex -multiple in vivo patch clamp analysis-

研究代表者

安達 一典 (Kazunori, Adachi)

明海大学・歯学部・准教授

研究者番号：20349963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：皮質錐体細胞の膜電位は脱分極状態が1秒ほど継続するup stateを発現する、自発的なoscillationを有している。吻側島皮質無顆粒層II/III層の錐体細胞のoscillationは、一次体性感覚野の錐体細胞と比較して少ないことが明らかになった。また、up state後に認められる一過性の過分極は、GABAA受容体アゴニストで増強と持続時間の延長をされた。舌への電気刺激への応答性を確認したところ、中大脳動脈から1 mm前方の部位に存在する錐体細胞は高頻度でEPSPsを発現することが解った。一方で、中大脳動脈から3 mm前方の部位では低頻度のIPSPs応答を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The spontaneous membrane potential oscillation of cortical pyramidal neuron is characterized by up state, a short depolarization period, and down state that included following after hyperpolarization (AHP) and resting membrane potential. Up state of agranular insular (AI) cortical pyramidal neurons was less exhibited compared with those of somatosensory cortical neurons. GABAA agonist increased and prolonged AHP. Electrical tongue stimulation induced EPSPs in AI neurons located 1 mm rostral from middle central artery with high incidence. In more rostral region, same stimulation induced IPSPs with low incidence.

研究分野：歯科薬理学

キーワード：島皮質 侵害受容 錐体細胞 patch clamp ラット

1. 研究開始当初の背景

島皮質は味覚記憶の形成と維持 (Jones *et al. J Neurosci* 1999; Ferreira *et al. Eur J Neurosci* 2005), 嗅覚受容 (Ferreira *et al. Behav Neurosci* 1987), 侵害受容 (Kuroda *et al. Stereotact Funct Neurosurg* 1995; Jasmin *et al. J Comp Neurol* 2004; Chen *et al. Somatosens Mot Res* 2010), 聴覚受容 (Rodgers *et al. Cereb Cortex* 2008), てんかん痙攣発作 (Isnard *et al. Ann Neurol* 2000), 薬物依存 (Di Pietro *et al. Psychopharmacology* 2008) といった感覚・運動・情動のいずれにも重要な役割を果たしている。興味深いことに、島皮質の神経細胞は複数の末梢感覚に対して応答することが知られており (Hanamori *et al. J Neurophysiol* 1998; Ogawa *et al. Neurosci Lett* 2002), 各種の末梢情報の統合機構として機能していることが推察される。島皮質は吻尾側に伸展する形状をしており、顆粒細胞の分布状況によって背側から顆粒層 (granular: GI), 不全顆粒層 (dysgranular: GI), 無顆粒層 (agranular: AI) に分類される。応募者は、三叉神経領域の感覚・運動の統合機構に強い興味を持ち研究を行っており、近年、このような特性を有する島皮質の末梢感覚統合機構の解明を行っている。その結果、皮質表層への電気刺激によって誘発される興奮は吻側部 AI もしくは GI/DI の II/III 層ではそれぞれ吻側方向へ有意に伝播され、同心円状に伝播が生じる一次感覚野などとは全く異なったパターンを示した (Fujita *et al. Neuroscience* 2010)。そこで、GI/DI の II/III 層錐体細胞内に *in vivo* patch-clamp 法にて biocytin を取り込ませ再構築したところ、吻側方向への有意な軸索伸展を認め、興奮伝播の特異的なパターンへの解剖学的裏付けを得ることができた (Adachi *et al. J Comp Neurol* 2013)。加えて、軸索は細胞体周囲へブトンに富む側枝を高密度に展開しており、徐々にその密度を減らしながら GI/DI/AI, 感覚野や運動野などの深表層へ投射していることが明らかになり、このような特異的な軸索展開が島皮質内での情報の統合とその出力に重要な役割を果たしているものと考えられる。

2. 研究の目的

上記研究の背景から、本研究では、GI/DI の腹側に位置し味覚・嗅覚ならびに三叉神経領域の疼痛に与する吻側部 AI の II/III 層錐体細胞に焦点を当て、島皮質の統合機構をより詳細に検討することを目的とした。そのため、全身麻酔下ラットの島皮質と一次体性感覚野の II/III 層錐体細胞から *in vivo* patch-clamp 法による細胞内記録を同時に行い

1. 自発活動性の差違とその調節機構：  
生体内の錐体細胞は脳波に呼応した膜電位の slow oscillation

(Steriade *et al. J Neurosci* 1993; Adachi *et al. J Comp Neurol* 2013) を示す。両部位の錐体細胞の膜電位変動の周波数ならびに発火頻度を解析し、脳内への薬物投与で周期性や興奮性に与する受容体機構を明らかにする。

2. 口腔内侵害刺激に対する反応性の差違とその調節機構：同一の末梢刺激への両部位の錐体細胞の応答性を発現率、膜電位変動ならびに発火頻度への影響の観点から解析し、脳内への薬物投与で応答誘発に与する受容体機構を明らかにする。
3. 解剖学的特性：記録した細胞の細胞体の位置、樹状突起ならびに軸索の展開様式と投射先を明らかにし、それらと末梢刺激への膜電位ならびに発火頻度への影響の有無を含む応答特性との間の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

Urethane (1.5 g/kg, i.p.) 全身麻酔下の 4~5 週齢 SD 系雄性ラットを、脳定位固定装置に固定し、口腔内侵害刺激用電極を右側舌へ刺入したのちに頭皮を剥離し脳波測定用金属ねじを Cz-P3/P4 相当部に植立する。左側の島皮質 AI 相当部 (bregma から前方 3 mm, 腹側 8-9 mm) ならびに一次体性感覚野相当部 (bregma から後方 2 mm, 側方 4 mm) を中心とした部位の頭蓋骨に直径約 1.5 mm の開窓術をおこない、硬軟膜を除去する。脳表面の乾燥を予防すると同時に薬液の浸漬投与をおこなうために、開窓部位にチャンバーを装着し人工脳脊髄液の灌流を行う。ラット体温は  $37 \pm 0.5$  に維持し、心電図をモニターする。

錐体細胞自発活動性の記録：各開窓部位に脳内局所刺激 (ICMS) 用電極を約 200  $\mu\text{m}$  の深さに留置したのちに biocytin 20 mM 添加記録用内液 (Adachi *et al. J Comp Neurol* 2013) を封入した記録用ガラスキャピラリーをその近傍に刺入し、II/III 層錐体細胞から whole-cell 記録を current clamp にて行う。細胞の自発活動性の記録に続き、電流段階的印加 (300 ms) ならびに ICMS ( $\pm 1-8$  V, 200  $\mu\text{s}$ , 30 ms 間隔 5 回, 20-200  $\mu\text{A}$ , 200  $\mu\text{s}$  x 12, 333Hz) で誘発される活動性を記録しオフライン解析に用いる。自発活動性は膜電位変動の周期性と活動電位の発火頻度、それらに与える保持電位の影響を脳波とあわせて検討する。次いで、自発活動性に与するグルタミン酸受容体機構を検討するために、灌流液中に NMDA 受容体アンタゴニスト (MK-801:  $< 1$  mM もしくは APV:  $< 50$   $\mu\text{M}$ ) または AMPA 受容体アンタゴニスト (CNQX, BNQX いずれも  $< 50$   $\mu\text{M}$ ) を添加し開窓部から脳内へ浸漬投与したのちに同様の検討を加える。

口腔内侵害刺激にたいする錐体細胞応答性の記録：上記検討に続き，薬物無添加の ACSF を十分量灌流したのちに，舌へ電気刺激（1.5 ms，32 Hz）を段階的に強度を上昇させて与える．島皮質 AI もしくは一次体性感覚野錐体細胞のいずれかで応答の生じる刺激閾値を求め，閾値強度の 1.5，2，4 倍の電気刺激を与え応答性を記録する．次いで灌流液中に NMDA 受容体もしくは AMPA 受容体アンタゴニスト（上記参照）を添加し開窓部から脳内へ浸漬投与したのちに，同様の電気刺激を舌に与え侵害刺激への応答性へのグルタミン酸受容体機構を検討する．

錐体細胞の三次元再構築：実験終了後，ラットを 4% paraformaldehyde にて灌流固定し脳組織連続切片標本（70  $\mu\text{m}$ ）を作成する．通常に従い biocytin 免疫染色後，1% neutral red にて対比染色することで脳の層構造を明瞭化し，記録した細胞の位置を確認する．記録した細胞の再構築はカメラルシーダを用いて低倍率（20 倍）で行ったのち，染色状態の良好なサンプルのみニューロルシーダを用いて高倍率（100 倍）で，脳外形，白質，皮質層構造，細胞体，樹状突起（含スパイン），軸索投射（含ブトン）と併せて行う．この手法で，非常に時間のかかる高倍率での再構築を少しでも円滑に行くと同時に，記録された細胞の全脳的な位置・構造特性を明らかとする．なお，免疫染色は実験協力者の長尾隆英と本学大学院生の尾基令奈，齋藤喜大の補助を得て行い，ニューロルシーダを用いた再構築は，連携研究者の小林真之准教授（日本大）のもとで本学大学院生の青木竜平が現在に継続して行う．

#### 4. 研究成果

本実験方法では記録電極は blind patch-camp 法に準じて脳内に刺入されるため，細胞記録は錐体細胞もしくは介在神経細胞から無作為に行われる．そのため，記録開始時に記録細胞への電流印加を行い，連続して誘発される活動電位間に認められる ISI（Inter Spike Interval）の減衰をもって錐体細胞を同定し，本研究での解析対象とした．なお，介在神経とおぼしき細胞からも記録は行っており，今後解析を加えることで，錐体細胞との特徴的な差異を明確にする予定である．AI の II/III 層錐体細胞の膜電位は自発的な過分極（down state）と脱分極（up state）を繰り返す約 1 Hz の振動を示し，up state では自発的な活動電位が認められた．記録部位から 1 mm 尾側皮質（脳表から 2 mm）への電気刺激は，記録細胞に刺激強度に依存して増強される興奮性シナプス後電位（EPSPs）を引き起こした．この電気刺激誘発 EPSPs は，連続電気刺激による増強と，膜電位の脱分極に依存する減少を示した．これ

らの膜電位特性は，他の島皮質部位（顆粒層（GI）ならびに不全顆粒層（DI））の II/III 層錐体細胞で認められるものと大きな差異は認められなかった．一方，膜電位の自発的な振幅に関しては，一次体性感覚野の III/III 層錐体細胞と比較して有意に up state の発現頻度が低いことが明らかになった．GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬を人口脳脊髄液に含有させて脳表から浸漬投与すると AI の II/III 層錐体細胞の静止膜電位は影響を受けないが，up state の発現が有意に減少し，薬剤非含有人口脳脊髄液への置換で up state の回復が確認出来た（図 1）．また，up state 後

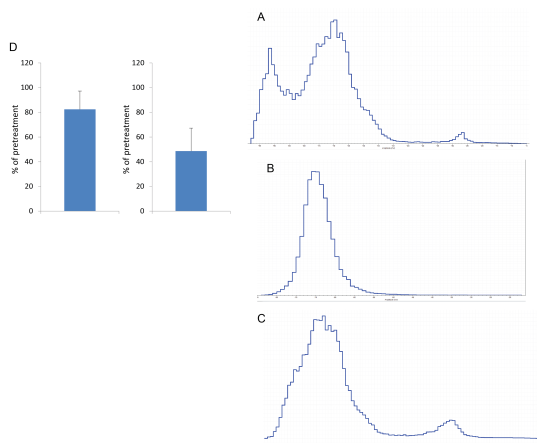


図 1 尾側 AI で記録された up state の維持に対する GABA<sub>A</sub> 受容体作動薬の効果

に認められる過分極の増強（振幅並びに持続時間）が認められた．但し，膜電位の自発的な振動の周波数自体には大きな影響を与えなかった．このことは，細胞記録が全身麻酔下で行われている事に起因すると考える．AI の II/III 層錐体細胞の末梢刺激応答性には部位特異性が存在し，舌への電気刺激に対して中心大脳動脈の前方 1 mm 以内の錐体細胞は EPSPs を高頻度（> 90%）で発現した（図 2）

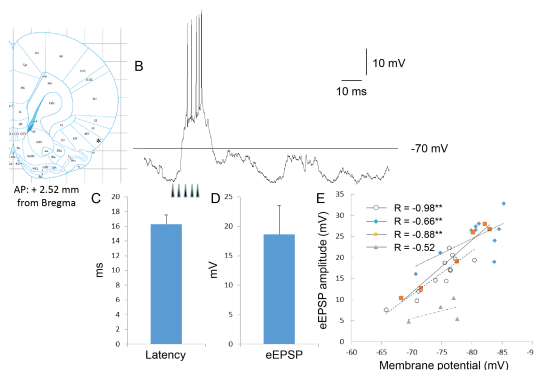


図 2 尾側 AI で記録された舌刺激誘発 EPSPs の詳細

が，更に前方（3 mm 以上）では無反応もしくは低頻度（< 20%）で抑制性シナプス後電位（IPSPs）が記録された（図 3）．なお，舌刺激によって誘発される EPSPs も IPSPs も，いずれも潜時は安定していたことから，primary な入力と考えられる．しかしながら，AI の II/III 層錐体細胞でシナプス応答を引

き起こすための刺激は、舌に強い twitch を引き起こすほどの強度が必要であり、特に侵害受容に關与するものであることが示唆さ

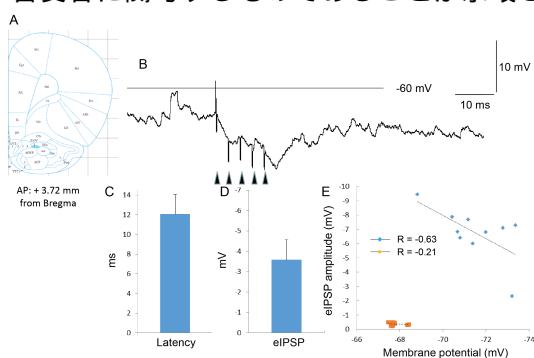


図 3 吻側 AI で記録された舌刺激誘発 IPSPs の詳細

れた。舌刺激に対する EPSPs は GABA<sub>A</sub> 受容体作用薬の投与により発現頻度ならびに強度が減弱することが認められた。これらのことから、IV 層を欠如する島皮質 AI の吻尾側のにはほぼ中央に位置する II/III 層錐体細胞は、VI 層構造を有する一般的な皮質(一次体性感覚野)と比較して興奮性が乏しい可能性が考えられる。また、同部位の GABA<sub>A</sub> 受容体機構は、膜電位の自発的な振幅の調整のみならず、口腔内侵害受容に重要な役割を果たしていることが明らかになった。口腔内に生じる侵害受容は皮質運動野の顎口腔領域を減少させることから、長期に亘る口腔内疼痛の存在は島皮質においても神経回路の変成を引き起こしている可能性が明らかになった。

#### 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 4 件)

Horie, N., Nagao, T., Hino, H., Kato, T., Kaneko, T., Sakagami, H. and Adachi, K., Analgesic effect on pseudonociceptive responses induced by acute administration of rikkosan, ORAL THERAPEUTICS AND PHARMACOLOGY, 査読有り, Vol. 33, 2014, pp. 1-9

Ikeda, H., Adachi, K., Fujita, S., Tomiyama, K., Saigusa, T., Kobayashi, M., Koshikawa, N. and Waddington, J. L., Investigating complex basal ganglia circuitry in the regulation of motor behaviour, with particular focus on orofacial movement, Behav Pharmacol, 査読有り, Vol, 26, 2015, pp. 18-32

Fukuchi, K., Okudaira, N., Adachi, K., Odai-Ide, R., Watanabe, S., Ohno, H., Yamamoto, M., Kanamoto, T., Terakubo, S., Nakashima, H., Uesawa, Y., Kagaya, H. and Sakagami, H., Antiviral and Antitumor Activity of Licorice Root

Extracts, In Vivo, 査読有り, Vol. 30, pp. 777-85

Sessle, B.J., Adachi, K., Yao, D., Suzuki, Y. and Lavigne, G., Orofacial Pain and Sleep, Contemporary Oral Medicine, 査読有り, in press

#### 〔学会発表〕(計 4 件)

Adachi, K., Kobayashi, M., Sakagami, H. and Koshikawa, N., Pyramidal neurons in the agranular insular cortex receives sensory inputs from the tongue: an in vivo whole-cell patch-clamp study, Neuroscience 2015, 2015, 10月, Chicago (USA)

Adachi, K., Kobayashi, M. and Sakagami, H., The responses of the agranular insular pyramidal neuron to oral stimulation, 第89回日本薬理学会年会, 2016, 3月, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

Adachi, K., Kobayashi, M. and Sakagami, H., Membrane potential oscillation in the agranular insular pyramidal neuron is mediated by GABAergic input, Neuroscience 2016, 2016, 11月, San Diego (USA)

安達 一典, 坂上 宏, 睡眠時末梢刺激応答性に關与する因子の同定と受容体機構の検討, 明海歯科医学会第32回学術大会, 2017, 6月, 明海大学歯学部(埼玉県・坂戸市)

#### 〔図書〕(計 1 件)

安達 一典, パーキンソン病での咀嚼運動, 査読有り, Annual Review 2015 神経, 2015, pp. 189-95

#### 〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安達 一典 (ADACHI, Kazunori)  
明海大学・歯学部・准教授  
研究者番号：20349963

(2) 研究分担者

小林 真之 (KOBAYASHI, Masayuki)  
日本大学歯学部・教授  
研究者番号：00300830

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

青木 竜平 (AOKI, Ryuhei)  
長尾 隆英 (NAGAO, Takahide)  
尾碁 令奈 (ODAI, Reina)  
齋藤 喜大 (SAITO, Yoshihiro)