

令和元年5月30日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05507

研究課題名(和文) 三叉神経損傷による島皮質および二次体性感覚野における局所神経回路の再編機構

研究課題名(英文) Trigeminal nerve transection-induced neuroplastic changes in the somatosensory and insular cortices in a rat ectopic pain model

研究代表者

小林 真之 (KOBAYASHI, Masayuki)

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00300830

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系における異常疼痛のメカニズムについて明らかにするために、口腔関連島皮質における神経活動を解析した。その結果、下歯槽神経切断モデル動物では、上顎臼歯髄刺激に応答する同皮質の興奮伝播が亢進していた。そこで2光子レーザー顕微鏡によるカルシウム測光を行ったところ、興奮性細胞および抑制性細胞共に、活動性が増大していた。そのメカニズムを明らかにするために脳スライス標本を用いて興奮性入力源を解析したところ、島皮質Ⅱ層のニューロンへの深層からのグルタミン酸入力が増大していることが明らかになった。また、興奮性細胞に対するGABAA受容体を介する抑制性入力は減弱していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔領域は、触圧覚や味覚、歯根膜感覚など多様な感覚入力が生じる点が、他の感覚と大きく異なる。本研究によって明らかになった現象、すなわち下顎からの感覚入力遮断による上顎歯髄刺激応答の増大は、味覚や温度感覚、筋感覚など島皮質が司っている他の感覚との相互作用を起こす可能性を示唆するものである。さらに、このような現象には大脳皮質の回路の再編が含まれていることから、末梢組織の損傷からの回復後に生じる慢性的な異常疼痛のメカニズムに中枢神経系が関与することが明らかとなった。この成果は、今後、臨床で生じる様々な感覚異常の治療法の開発に貢献すると期待できる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the mechanisms of neuropathic pain and allodynia in the central nervous system, we focused on plastic changes of excitation in secondary somatosensory cortex and insular oral region (S2/IOR) of inferior alveolar nerve transection (IANX) model rats in which the mandibular but not maxillary nerve branch was cut. Optical imaging using VSD revealed contradictory excitatory responses 1 w after IANX between mandibular and maxillary molar pulp stimulation as follows: the loss of excitation following mandibular stimulation vs facilitated excitation following maxillary stimulation. At this stage, the neural activities in layer II/III excitatory and inhibitory neurons in S2/IOR in the IANX model rats were enhanced due to facilitated glutamatergic inputs. On the other hand, the inhibitory inputs onto the pyramidal neurons were reduced in the IANX model rats. These results suggest that IANX induces plastic changes in S2/IOR by changing the local excitatory and inhibitory circuits.

研究分野：神経生理学

キーワード：疼痛 神経損傷 大脳皮質 島皮質 神経可塑性 光学計測 カルシウム測光 抑制性シナプス後電流

1. 研究開始当初の背景

末梢神経や脊髄の損傷は、末梢のみならず高次中枢の情報処理機構も可塑的に変化させると考えられている。その変化は、末梢神経修復後も持続し、慢性疼痛や幻肢痛の原因になる可能性があり、三叉神経系においても神経損傷後にアロディニアや hyperalgesia, 異所性疼痛などが惹起され、損傷部位が外見上治癒した後も継続することがあり、その多くは難治性である。歯科臨床においては、三叉神経の中でも特に下歯槽神経の損傷が多く、口腔周囲のしびれなど様々な症状とともに異常疼痛が生じると言われている、その治癒機転については不明な点が多く、なかでも中枢神経系における変化についてはほとんど明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は、末梢神経が修復された後も続く慢性的な異常疼痛の原因の一つに、中枢神経系における可塑的变化があるとの仮説を立てた。そして、三叉神経系の疼痛情報が集約される大脳皮質の一領域である島皮質および背側に隣接する二次体性感覚野(以下、口腔関連島皮質)に注目し、下歯槽神経損傷モデル動物における同皮質領域における疼痛刺激に対する応答の変化について巨視的手法を用いて明らかにし、そのメカニズムについて微視的手法によって明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究課題における研究は、下歯槽神経切断モデル動物を作製して対照群と比較することによって、口腔関連島皮質で生じる疼痛刺激に対する興奮性の変化について明らかにした。行った実験系は、全脳動物を用いた *in vivo* 実験(1-1および1-2)と、脳スライス標本を用いた *in vitro* 実験(2-1および2-2)に大別される。

(1-1) 光学計測法による口腔関連島皮質での興奮伝播の時空間的解析

ウレタン麻酔下で、ラットの中大脳動脈と嗅溝の交点を中心とした骨窓を開け、大脳皮質に膜電位感受性色素(RH1691)を負荷した。その後、実体顕微鏡に CCD カメラを搭載した光学計測システムを用いて神経活動を光学的に記録した。

(1-2) 二光子レーザー顕微鏡による *in vivo* カルシウム・イメージング法

ラットをウレタン麻酔した後、口腔関連島皮質を開窓し、細胞内記録用の細い鋭利なガラスピペットを用いて Oregon green BAPTA を観察部位に注入した。その後、開窓部位は寒天で被覆してカバーガラスを設置し、上顎および下顎第一臼歯に電極を挿入して電気刺激を行い、カルシウム応答を記録した。

(2-1) ケージド・グルタミン酸によるシナプス入力源のマッピング

実験には、興奮性および抑制性ニューロンを区別するため、GABA vesicular transporter を Venus 蛍光タンパク質で可視化した Venus-VGAT 遺伝子改変ラットを用いた。口腔関連島皮質を含む厚さ 350 μm の急性脳スライス標本において、Venus 陰性(興奮性)錐体細胞と Venus 陽性(GABA 作動性)抑制性ニューロンから同時ホールセル・パッチクランプ記録を行った。ケージド・グルタミン酸を灌流投与した状態で、共焦点レーザー顕微鏡を用いて UV レーザー光を脳スライス標本に局所的に照射することで、瞬間的にグルタミン酸を照射部位に暴露してシナプス後電位を記録した。格子状にレーザー光を照射することによって、各領域からの興奮性もしくは抑制性ニューロンの投射とその振幅を定量化した。

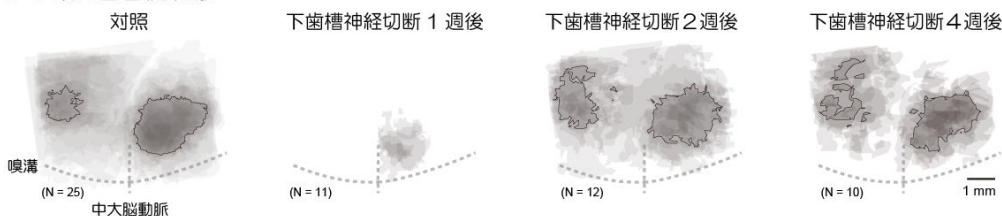
(2-2) 口腔関連島皮質における抑制性シナプス伝達特性の解析

(2-1)と同様のラットを使用してスライス標本を作製し、複数の興奮性および抑制性ニューロンから同時にホールセル・パッチクランプ記録を行った。自発性抑制性シナプス後電流を記録することで、口腔関連島皮質における抑制性シナプス入力の変化を解析した。

4. 研究成果

(1-1) 下歯槽神経切断モデルラットを作製し、上顎臼歯歯髄への電気刺激に対する島皮質の興奮応答を光学計測法によって計測したところ、生後3週齢で下歯槽神経を切断したモデルでは、下歯槽神経が修復された後も歯髄刺激に対する島皮質の興奮応答が増大することが明らかになった。すなわち、末梢神経系の回復だけでは中枢神経系における過剰な神経活動は抑えることができないと考えられた。

A 下顎臼歯歯髄刺激



B 上顎臼歯歯髄刺激

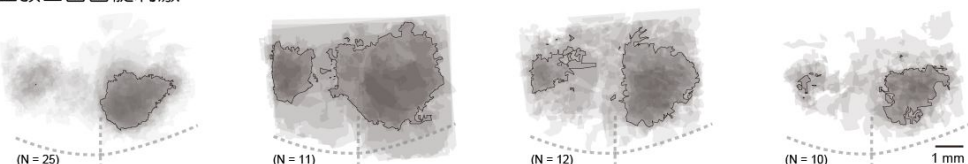


図 1. 下歯槽神経切断前(対照)と切断1, 2, 4週後の下顎臼歯歯髄刺激(A)と上顎臼歯歯髄刺激(B)に対する10/25頭分の応答領域を重ね合わせたもの。切断1週後に上顎刺激に対する応答が増大する。

(1-2) 2光子レーザー顕微鏡による個々のニューロンにおける興奮性の定量解析に着手した結果、興奮伝播の増大は、興奮性のみならず抑制性ニューロンにおけるカルシウム応答の増大が示すように、神経回路全体の興奮性が増大するためであることを明らかにすることが出来た。

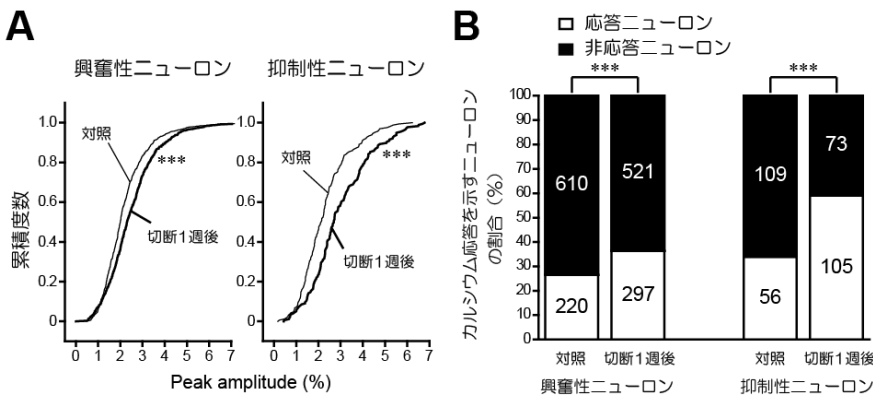


図 2. 下歯槽神経切断前(対照)と切断1週後の上顎臼歯歯髄刺激に対するカルシウム応答の大きさは興奮性ニューロンにおいても抑制性ニューロンにおいても増大する(A)。また、カルシウム応答を示すニューロンの割合は興奮性・抑制性ニューロン共に切断1週後で増加する(B)。

(2-1) Laser scanning photostimulation 法を用いて島皮質における興奮性入力の分布図を作成すると、切断モデル群のII/III層錐体細胞は、コントロール群と比較してIV層から強力な興奮性入力を受けることが明らかになった。一方II/III層に位置するGABA作動性fast-spiking interneuronにおいても、切断モデル群はコントロール群に比べて興奮性入力が増大していた。以上の結果は、下歯槽神経切断後に認められた島皮質における興奮性の増大は、大脳皮質の局所回路の一部が変化することによって生じることを示唆している。

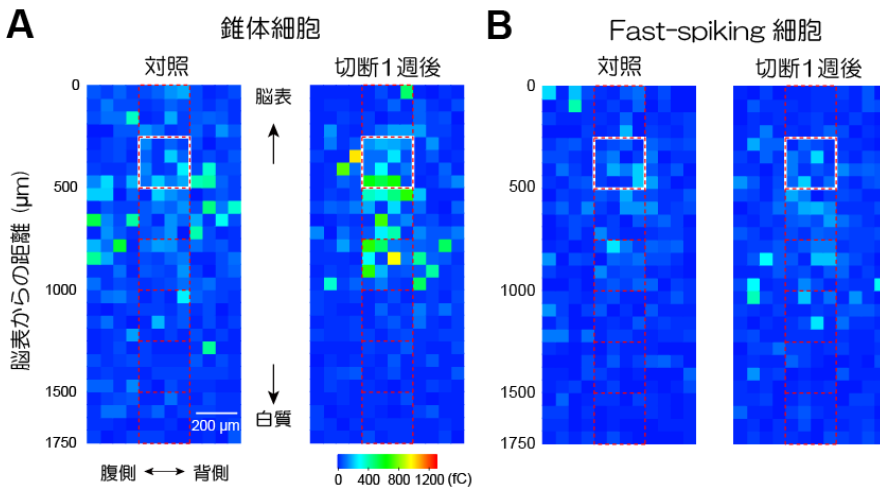


図 3. 下歯槽神経切断前(対照)と切断1週後の島皮質スライス標本における錐体細胞(興奮性ニューロン; A)とfast-spiking細胞(抑制性ニューロン; B)からのホールセル記録。紫外線レーザー光によるケージド・グルタミン酸の解除によって生じる興奮性シナプス後電流の大きさをカラーコードで示す。切断1週後でどちらのニューロンでも興奮性入力が増大している。

(2-2) テトロドトキシン灌流下でII/III層錐体細胞から記録されるminiature IPSCの発生頻度ならびに振幅値は、切断モデル群で減少していることが明らかとなった。抑制性ニューロンから興奮性ニューロンへのシナプス伝達が減弱していることが明らかになった。

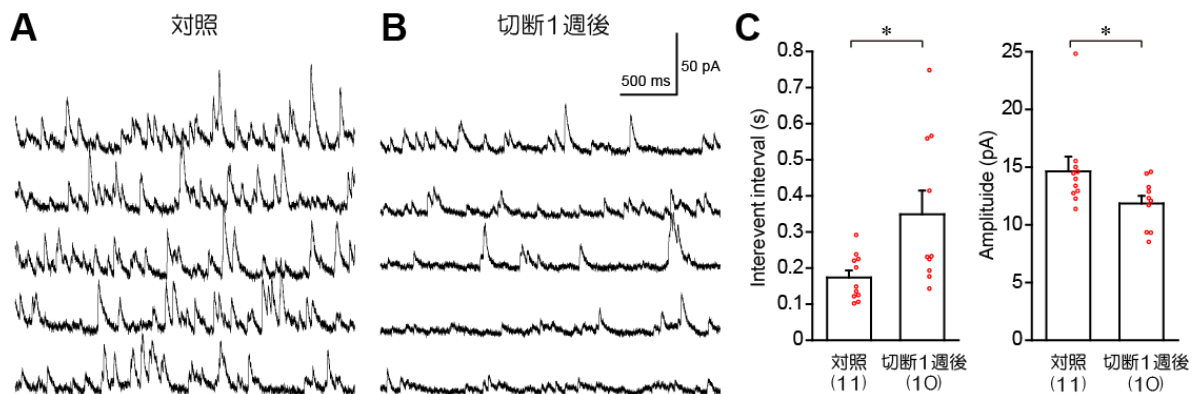


図 4. 下歯槽神経切断前(対照; A)と切断1週後(B)の島皮質スライス標本における錐体細胞からのホールセル記録。抑制性シナプス後電流の発生間隔が延長し、振幅が減少している(C)。

以上の結果から、下歯槽神経切断後に認められた島皮質における興奮性の増大は、グルタミン酸作動性の興奮性入力の増加とGABA作動性の抑制性入力の低下によると考えられる。このような島皮質における可塑的变化は、末梢神経系が治癒した後も持続することから、三叉神経障害性疼痛のメカニズムの一つと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 25 件)

- 1) Fujita S, Yamamoto K, Kobayashi M (2019) Trigeminal nerve transection-induced neuroplastic changes in the somatosensory and insular cortices in a rat ectopic pain model. *eNeuro*, 6, e0462-18. doi: 10.1523/ENEURO.0462-18.2019. 査読あり
- 2) Usui M, Kaneko K, Oi Y, Kobayashi M (2019) Orexin facilitates GABAergic IPSCs via postsynaptic OX₁ receptors coupling to the intracellular PKC signalling cascade in the rat cerebral cortex. *Neuropharmacology*, 149, 97-112. doi: 10.1016/j.neuropharm.2019.02.012. 査読あり
- 3) Murayama S, Yamamoto K, Fujita S, Takei H, Inui T, Ogiso B, Kobayashi M (2019) Extracellular glucose-dependent IPSC enhancement by leptin in fast-spiking to pyramidal neuron connections via JAK2-PI3K pathway in the rat insular cortex. *Neuropharmacology*, 149 133-148. doi : 10.1016/j.neuropharm.2019.02.021. 査読あり
- 4) Kobayashi M (2018) Mechanisms of orofacial sensory processing in the rat insular cortex. *J Oral Biosci*, 60, 59-64. 査読あり
- 5) Kato R, Yamanaka M, Kobayashi M (2018) Application of unfolding transformation in the random matrix theory to analyze in vivo neuronal spike firing during awake and anesthetized conditions. *J Pharmacol Sci*, 136, 172-176. doi: 10.1016/j.jphs.2018.01.004. 査読あり
- 6) Zama M, Hara Y, Fujita S, Kaneko T, Kobayashi M (2018) Somatotopic organization and temporal characteristics of cerebrocortical excitation in response to nasal mucosa stimulation with and without an odor in the rat: an optical imaging study. *Neuroscience*, 377, 77-86. doi: 10.1016/j.neuroscience.2018.02.042. 査読あり
- 7) Kaneko M, Fujita S, Shimizu N, Motoyoshi M, Kobayashi M (2018) Experimental tooth movement temporally changes neural excitation and topographical map in rat somatosensory cortex. *Brain Res*, 1698, 62-69. doi: 10.1016/j.brainres.2018.06.022. 査読あり
- 8) Ohtani S, Fujita S, Hasegawa K, Tsuda H, Tonogi M, Kobayashi M (2018) Relationship between the fluorescence intensity of rhodamine-labeled orexin A and the calcium responses in cortical neurons: An in vivo two-photon calcium imaging study. *J Pharmacol Sci*, 138, 76-82. doi: 10.1016/j.jphs.2018.09.005. 査読あり
- 9) Yamamoto K and Kobayashi M (2018) Opposite roles in short-term plasticity for N-type and P/Q-type voltage-dependent calcium channels in GABAergic neuronal connections in the rat cerebral cortex. *J Neurosci*, 38, 9814-9828. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0337-18.2018. 査読あり
- 10) Fujita S, Zama M, Kaneko K, Murayama S, Ohtani S, Usui M, Noma D, Tsuda H, Yamamoto K, Kobayashi M (2018) Menthol-induced facilitation of cerebrocortical excitatory propagation induced by air puff stimulation of the nasal cavity in the rat: An optical imaging study. *Neurosci Lett*, 696, 87-92. doi: 10.1016/j.neulet.2018.12.018. 査読あり
- 11) Kohnomi S, Ebihara K, Kobayashi M (2017) Suppressive regulation of lateral inhibition between medium spiny neurons via dopamine D1 receptors in the rat nucleus accumbens shell. *Neurosci Lett*, 636, 58-63. doi: 10.1016/j.neulet.2016.10.049. 査読あり
- 12) Fujita S, Kaneko M, Nakamura H, Kobayashi M (2017) Spatiotemporal profiles of proprioception processed by the masseter muscle spindles in rat cerebral cortex: an optical imaging study. *Front Neural Circuit*, 11, 4. doi: 10.3389/fncir.2017.00004. 査読あり
- 13) Aoki R, Kato R, Fujita S, Shimada J, Koshikawa N, Kobayashi M (2017) Phase-dependent activity of neurons in the rostral part of the thalamic reticular nucleus with saccharin intake in a cue-guided lever-manipulation task. *Brain Res*, 1658, 42-50. doi: 10.1016/j.brainres.2017.01.013. 査読あり
- 14) Minoda A, Mizoguchi N, Kobayashi M, Suda N, Muramoto K (2017) Intracortical signal processing of periodontal ligament sensations in rat. *Neuroscience*, 355, 212-224. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.04.045. 査読あり
- 15) Kaneko M, Horinuki E, Shimizu N, Kobayashi M (2017) Physiological profiles of cortical responses to mechanical stimulation of the tooth in the rat: An optical imaging study. *Neuroscience*, 358, 170-180. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.06.042. 査読あり
- 16) Murayama S, Yamamoto K, Kaneko M, Ogiso B, Kobayashi M (2017) Ablation of C-fibers decreases quantal size of GABAergic synaptic transmission in the insular cortex. *Neuroscience*, 365, 179-191. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.09.052. 査読あり
- 17) Takei H, Yamamoto K, Bae YC, Shirakawa T, Kobayashi M (2017) Histamine H₃ heteroreceptors suppress glutamatergic and GABAergic synaptic transmission in the rat insular cortex. *Front Neural Circuits*, 11, 85. doi: 10.3389/fncir.2017.00085. 査読あり

- 18) Kobayashi M, Horinuki E (2017) Neural mechanisms of nociception by orthodontic treatment. *J Oral Sci*, 59, 167-171. doi: 10.2334/josnusd.16-0847. 査読あり
- 19) Kobayashi M, Oi Y (2017) Actions of propofol on neurons in the cerebral cortex. *J Nippon Med Sch*, 84, 165-169. doi: 10.1272/jnms.84.165. 査読あり
- 20) Fujita S, Mizoguchi N, Aoki R, Cui Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Cytoarchitecture-dependent decrease in propagation velocity of cortical spreading depression in the rat insular cortex revealed by optical imaging. *Cereb Cortex* 26, 1580-1589. doi: 10.1093/cercor/bhu336. 査読あり
- 21) Horinuki E, Yamamoto K, Shimizu N, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Sequential changes in cortical excitation during orthodontic treatment. *J Dent Res*, 95, 897-905. doi: 10.1177/0022034516641276. 査読あり
- 22) Yokota E, Koyanagi Y, Nakamura H, Horinuki E, Oi Y, Kobayashi M (2016) Opposite effects of mu and delta opioid receptor agonists on excitatory propagation induced in rat somatosensory and insular cortices by dental pulp stimulation. *Neurosci Lett*, 628, 52-58. doi: 10.1016/j.neulet.2016.05.065. 査読あり
- 23) Kato R, Yamanaka M, Yokota E, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Spike timing rigidity is maintained in bursting neurons under pentobarbital-induced anesthetic conditions. *Front Neural Circuits*, 10, 86. 査読あり
- 24) Yokota E, Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Opioid subtype- and cell type-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. *Neuroscience*, 339, 478-490. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.004. 査読あり
- 25) Kaneko K, Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M (2016) Propofol-induced spike firing suppression is more pronounced in pyramidal neurons than in fast-spiking neurons in the rat insular cortex. *Neuroscience*, 339, 548-560. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.10.016. 査読あり

〔学会発表〕(計 70 件) 一部リスト省略

- 1) Kaneko K, Matsumura S, Oi Y, Kobayashi M (2018) Cholinergic inputs to cortical cholinergic neurons facilitate disinhibition of excitatory neurons in the rat cerebral cortex. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology
- 2) Kajiwara M, Kato R, Oi Y, Kobayashi M (2018) Spike timing regularity depends on the firing time scale under propofol-induced anesthetic condition. 18th World Congress of Basic and Clinical Pharmacology
- 3) Fujita S, Yamamoto K, Kobayashi M (2018) Enhancement of responses to upper molar pulp stimulation in somatosensory and insular cortices in an ectopic pain model of the rat. Oral Neuroscience 2018
- 4) Murayama S, Ogiso B, Kobayashi M (2018) Membrane potential responses of the excitatory and inhibitory neurons in layer / of the insular cortex by dental pulp stimulation: In vivo whole-cell targeting patch-clamp recording. Oral Neuroscience 2018
- 5) Kaneko K, Matsumura S, Oi Y, Kobayashi M (2018) Cholinergic interneurons facilitate disinhibition of pyramidal neurons in the rat cerebral cortex. 48th Annual Meeting of Society for Neuroscience
- 6) Kaneko M, Horinuki E, Shimizu N, Kobayashi M (2017) Differences in cortical excitation profiles between mechanical and electrical stimulation of the periodontal ligament. Neuropathic Pain 2017
- 7) Usui M, Oi Y, Kobayashi M (2017) Orexin facilitates GABAergic inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. Neuropathic Pain 2017
- 8) Murayama S, Yamamoto K, Ogiso B, Kobayashi M (2017) Nociceptive input imbalance mediated by ablation of C-fibers causes plastic change of GABAergic neuronal circuits in the insular cortex. 47th Annual Meeting of Society for Neuroscience
- 9) Nakamura H, Kobayashi M, Shirakawa T (2016) Spatiotemporal profiles of nociceptive information processing of dental pulp in rat cerebral cortex. 10th Biennial Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia
- 10) Fujita S, Kato R, Nakamura H, Kaneko M, Kobayashi M (2016) Changes of neural activity responding to dental pulp stimulation in an inferior alveolar nerve transection model. International Congress on Orofacial Pain 2016
- 11) Kaneko M, Horinuki E, Shimizu N, Kobayashi M (2016) Spatiotemporal profiles of cortical excitation induced by mechanical stimulation of the periodontal ligament during experimental tooth movement. International Congress on Orofacial Pain 2016
- 12) Murayama S, Kobayashi M, Ogiso B (2016) Changes of insular cortical local circuits in the model rats that receive ablation of unmyelinated primary sensory fibers by capsaicin injection. International Congress on Orofacial Pain 2016
- 13) Adachi K, Kobayashi M, Sakagami H (2016) Involvement of GABAergic transmission in the sensory processing in the agranular insular cortex. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience
- 14) Horinuki E, Fujita S, Shimizu N, Kobayashi M (2016) Sequential changes in rat cortical excitation during

experimental tooth movement. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience

- 15) Kaneko K, Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M (2016) Propofol-mediated spike firing suppression is more sensitive in pyramidal neurons than in fast-spiking interneurons in the rat insular cortex. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience
- 16) Kato R, Yamanaka M, Koshikawa N, Kobayashi M (2016) Spike timing rigidity is maintained in bursting neurons under pentobarbital-induced anesthetic conditions. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience
- 17) Yokota E, Oi Y, Kobayashi M (2016) Mu and delta opioidergic modulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. 46th Annual Meeting of Society for Neuroscience

〔その他〕

ホームページ等：<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：藤田 智史

ローマ字氏名：FUJITA, Satoshi

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：00386096

研究分担者氏名：山本 清文

ローマ字氏名：YAMAMOTO, Kiyofumi

所属研究機関名：日本大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号(8桁)：30609764

研究分担者氏名：崔 翼竜

ローマ字氏名：CUI, YiLong

所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所

部局名：ライフサイエンス技術基盤研究センター

職名：ユニットリーダー

研究者番号(8桁)：60312229

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。