

令和 3 年 5 月 27 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09731

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法をもちいたプロポフォル誘発性アルファ周波数帯律動性応答の解明

研究課題名(英文) Neuronal mechanisms of the propofol-induced alpha rhythm

研究代表者

小柳 裕子 (KOYANAGI, Yuko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20609771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：島皮質において、静脈麻酔薬であるプロポフォルはfast-spiking (FS) 細胞から錐体細胞への抑制性入力を増大させるとともに、錐体細胞の発火タイミングの同期性を向上させた。この同期性に対する作用は、FS細胞をアルファ周波数帯である10 Hzで発火させた時に最も顕著であった。島皮質への入力源の一つである視床後内側腹側核小細胞部 (VPMpc) から島皮質への軸索投射は、主に 1 層の錐体細胞とFS細胞を標的とすることが明らかとなった。VPMpcから島皮質FS細胞への興奮性シナプス後電流の潜時、ピークに至るまでの時間は錐体細胞への入力と比較して有意に短かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロポフォルによる意識消失時にアルファ周波数帯(8～13 Hz)の増強が観察されることが分かっている一方で、その発生メカニズムの詳細は不明であった。本研究結果により、プロポフォルはFS細胞から錐体細胞への抑制性入力を増強することで錐体細胞の発火タイミングをアルファ周波数帯に近づける可能性が示唆された。また島皮質FS細胞はVPMpcからの興奮性入力を錐体細胞に先行して受けることで、周囲の錐体細胞を視床からの興奮性入力の前に抑制することで、発火タイミングの調節を行っている可能性が示唆された。これらの基礎的データの蓄積は、精度の高い麻酔・鎮静深度モニタの開発に寄与する可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Propofol enhanced unitary inhibitory postsynaptic currents recorded from the connection between fast-spiking (FS) neurons and pyramidal neurons in the rat insular cortex (IC). The synchronization index, which reflects the degree of spike synchronization among pyramidal neurons, was increased by propofol when a presynaptic FS neuron was activated at 10 Hz. AAV5.CAG.ChR2(H134R).mCherry, a virus that expresses ChR2 and a fluorescent protein in an anterograde manner, was injected into the medial parvocellular portion of the ventral posterior medial division of the thalamus (VPMpc), and their terminals were densely observed in layer 2/3 of the IC. Laser stimulation of ChR2-expressing thalamocortical terminals evoked excitatory postsynaptic currents (EPSCs) in both FS and pyramidal neurons. The latency, time to peak, and half width of EPSCs recorded from FS neurons were shorter than those recorded from pyramidal neurons.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：プロポフォル誘発性アルファ周波数帯 視床 皮質路 島皮質 視床後内側腹側核小細胞部

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

プロポフォールは今日最もよく用いられている静脈麻酔薬である。近年ヒトにおいて、プロポフォールによる意識消失時にプロポフォール誘発性アルファ周波数帯(8~13 Hz)が観察されることが報告されている。しかし、そのアルファ波の発生メカニズムや発生源に関する詳細な検証はなされていない。プロポフォール誘発性アルファ波のメカニズムとして、これまでの我々の研究結果を踏まえて以下の仮説を立てた。

- (1) プロポフォールは皮質において代表的な抑制性ニューロンである fast-spiking (FS) ニューロン 錐体細胞間の抑制性シナプス伝達を特異的に増強し、錐体細胞に対する抑制性入力を増強する (Koyanagi et al., 2014)。
- (2) シナプス前細胞に相当する FS ニューロンの先行発火による抑制性入力に呼応して、錐体細胞の発火タイミングは同期する。
- (3) 大脳皮質ニューロンは視床をはじめとする外部からの興奮性入力により発火する。プロポフォール誘発性アルファ周波数帯の発生には視床から大脳皮質への入力が重要な役割を果たしている (Ching et al., 2010; Vijayan et al., 2013)。この外部から皮質への入力タイミングに FS ニューロンおよび錐体細胞は呼応して同期発火することで、プロポフォール誘発性アルファ波が形成される。

### 2. 研究の目的

前述のプロポフォール誘発性アルファ波発生機序のうち、(1)はすでに申請者らのこれまでの研究により検証されていることから、本研究課題では(2)および(3)について検証を行うことを目的とし、以下の研究計画を立てた。

- (1) 大脳皮質急性脳スライス標本での錐体細胞発火同期性に対するプロポフォールの作用の検討

皮質におけるプロポフォール誘発性アルファ周波数帯の発生は、生体組織である脳スライス標本では再現されていない。そこでラット大脳皮質急性脳スライス標本上でプロポフォールにより錐体細胞の発火同期性増強が起こるかどうかを検証する。

- (2) 視床 皮質中継ニューロンにおけるオプトジェネティクス法の確立  
アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いて視床 皮質中継ニューロン特異的にチャンネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させるためのウイルス注入部位・注入量を決定する。
- (3) 視床 皮質中継ニューロンの大脳皮質投射様式および興奮性シナプス後電流の特性の検討  
プロポフォール誘発性アルファ周波数帯に重要な役割を果たしていると考えられている視床皮質中継ニューロンが大脳皮質においてシナプスを形成している部位やニューロンの種類、興奮性シナプス後電流の振幅や持続時間などの特性を、皮質ニューロンの種類ごとに比較・検討する。

### 3. 研究の方法

- (1) 大脳皮質急性脳スライス標本での錐体細胞発火同期性に対するプロポフォールの作用の検討

実験には抑制性ニューロン特異的に蛍光タンパクである Venus を発現させた VGAT-Venus ラットを用いる。通法に従い急性脳スライス標本を作製し、島皮質において1つのFSニューロンと2つ以上の錐体細胞から同時ホールセル記録を行い、FSニューロンから同時に2つ以上の錐体細胞に抑制性シナプス結合の存在するペアを探し出す。錐体細胞は電流固定モードにて電流注入を行いランダムに発火させておき、FSニューロンを活動させた時の記録錐体細胞の発火タイミングのプロポフォールによる変化を観察する。

- (2) 視床 皮質中継ニューロンにおけるオプトジェネティクス法の確立  
VGAT-Venus ラットを用い、イソフルラン吸入麻酔下で側頭部を開頭(直径約1 mm)し、島皮質に投射する視床領域である視床後内側腹側核小細胞部(VPMpc)へ到達するためのマイクロシリッジ刺入位置を検討する。インク注入後イソフルラン5%吸入下で断頭し、脳を取り出したのち、マイクロライザーを用いて急性脳スライス標本を作製し、インク注入部位の確認を行う。
- (3) 視床 皮質中継ニューロンの大脳皮質投射様式および興奮性シナプス後電流の特性の検討  
VPMpcニューロン特異的にChR2を発現させたVGAT-Venusラットを用いて急性脳スライス標本を作製し、蛍光観察下で島皮質におけるVPMpcからのニューロン投射領域を確認する。島皮質ニューロンからホールセル記録を行い、光刺激によってChR2発現ニューロンのみを特異的に発火させた際の島皮質ニューロンの発火応答の有無および興奮性シナプス後電流の特性を錐体細胞とFSニューロンで比較・検討する。

### 4. 研究成果

- (1) 大脳皮質急性脳スライス標本での錐体細胞発火同期性に対するプロポフォールの作用の検討

プロポフォール (1 または 10  $\mu\text{M}$ ) 灌流投与により, シナプス前細胞に相当する FS 細胞に 4 連の活動電流を発生させている間のシナプス後細胞に相当する錐体細胞の発火タイミングの同期性は増強した。この錐体細胞の発火タイミングの増強は, シナプス前細胞に相当する FS 細胞を 1, 4, 13.3 Hz で活動させた時と比較して 10 Hz で活動させた時に顕著に観察された。

(2) 視床 皮質中継ニューロンにおけるオプトジェネティクス法の確立

4 週齢の VGAT-Venus ラットにて, オス・メスとも bregma より-3.6 mm, 側方 1.1 mm, 深さ 6.4 mm の位置で, 2  $\mu\text{L}$  用マイクロシリンジを用いてインクを 0.5  $\mu\text{L}$  注入した場合に VPMpc に局所注入を行えることが分かった。

(3) 視床 皮質中継ニューロンの大脳皮質投射様式および興奮性シナプス後電流の特性の検討  
前述の方法を用いてマイクロシリンジにて pAAV5.CAG.hChR2(H134R)-mCherry.WPRE.SV40 を VPMpc に局所注入し, 約 4 週間の回復期間ののち, 島皮質を含む急性脳スライス標本を作製し, 蛍光観察下で島皮質における VPMpc からのニューロン投射を確認した。その結果, 島皮質のうち顆粒層から不全顆粒層にかけて, II/III 層深部を中心に VPMpc からの投射があることがわかった。さらに, 島皮質ニューロンの発火応答に対する視床 皮質入力の影響を検討するため, 島皮質錐体細胞からホールセル記録を行い, 光刺激によって ChR2 発現ニューロンのみを特異的に発火させた際の錐体細胞の発火応答を検討した。その結果, 島皮質の錐体細胞および抑制性介在ニューロンである fast-spiking (FS) 細胞は ChR2 発現 VPMpc ニューロンからの興奮性入力を強く受けており, VPMpc ニューロンの発火に呼応してこれらの細胞から活動電位または興奮性シナプス後電流 (eEPSC) が記録されることが分かった。これらの細胞に対する興奮性入力が, 直接の VPMpc からの入力なのか, それとも島皮質内の錐体細胞を介した入力なのかを検討するために, テトロドトキシンと 4AP を用いて検討を行ったところ, テトロドトキシン灌流投与により消失した eEPSC は 4AP 灌流投与により再度観察され, 直接の VPMpc からの入力であることがわかった。VPMpc ニューロンの光刺激に呼応した eEPSC のキネティクスを細胞の種類ごとに解析したところ, VPMpc ニューロンの光刺激から eEPSC が発生するまでの時間, および eEPSC の開始からピークまでの時間は錐体細胞と比較して FS 細胞で有意に短かった。eEPSC の半値幅は錐体細胞と比較して FS 細胞で有意に小さかった。eEPSC の振幅は錐体細胞と FS 細胞で有意な差は見られなかった。

以上の結果から, 大脳皮質の一領域である島皮質において, プロポフォールは FS 細胞から錐体細胞への抑制性入力を増強することで錐体細胞の発火タイミングを同期させることが分かった。またこの発火タイミング同期作用は FS 細胞をアルファ周波数帯で活動させた時に最も顕著であった。島皮質への外部からの入力源の一つである VPMpc から島皮質への視床皮質路は主に I 層の錐体細胞と FS 細胞に対して入力していることが分かった。また, 島皮質 FS 細胞は VPMpc からの入力を錐体細胞に先行して受けることで周囲の錐体細胞にフィードフォワード抑制をかけ, 発火タイミングの調節を行っている可能性が示唆された。これらの結果の一部は *Anesthesiology* 誌に掲載されている (Koyanagi et al., 2021)。

#### < 引用文献 >

Ching S, Cimenser A, Purdon PL, Brown EN, Kopell NJ. Thalamocortical model for a propofol-induced alpha-rhythm associated with loss of consciousness. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010, 107: 22665-22670.

Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M. Fast-spiking interneurons contribute to propofol-induced facilitation of firing synchrony in pyramidal neurons of the rat insular cortex. *Anesthesiology* 2021, 134: 219-233.

Koyanagi Y, Oi Y, Yamamoto K, Koshikawa N, Kobayashi M. Fast-spiking cell to pyramidal cell connections are the most sensitive to propofol-induced facilitation of GABAergic currents in rat insular cortex. *Anesthesiology* 2014, 121: 68-78.

Vijayan S, Ching S, Purdon PL, Brown EN, Kopell NJ. Thalamocortical mechanisms for the anteriorization of alpha rhythms during propofol-induced unconsciousness. *J Neurosci* 2013, 33: 11070-11075.

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 Koyanagi Y, Oi Y, Kobayashi M	4. 巻 134
2. 論文標題 Fast-spiking interneurons contribute to propofol-induced facilitation of firing synchrony in pyramidal neurons of the rat insular cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesthesiology	6. 最初と最後の頁 219-233
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ALN.0000000000003653.	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 梶原美絵, 小林真之
2. 発表標題 プロポフォルによる意識消失時の大脳皮質における神経活動の変化
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分 担 者	小林 真之  (KOBAYASHI Masayuki)  (00300830)	日本大学・歯学部・教授    (32665)	

	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
研究 協 力 者	金子 啓介  (KANEKO Keisuke)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	千喜良（臼井） 緑  (CHIKIRA-USUI Midori)		
研究協力者	梶原 美絵  (KAJIWARA Mie)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関