

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390156

研究課題名(和文) In Vivo 脊髄痛覚シナプス伝達の中枢性制御

研究課題名(英文) Central modulation of spinal nociceptive synaptic transmission in vivo

研究代表者

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)

生理学研究所・生体情報研究系・准教授

研究者番号：20304884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000 円、(間接経費) 4,320,000 円

研究成果の概要(和文)：本来生体に備わる痛みを中枢性に制御する内因性抑制系、特に青斑核からのノルアドレナリン神経を介した下行性抑制機構の本質を in vivo シナプスレベルで明確にした。また、臨床で用いられる鎮静剤が低用量でこの鎮痛機構を賦活化することを見出すなど、内因性抑制系を利用した新たな鎮痛法を開発した。これらの成果は国際誌や国内外の学会で公表を終えるなど、本研究成果は慢性疼痛に対する新たな鎮痛・治療法の開発に極めて有用であり、ヒト健康増進など社会に大きく還元できる。

研究成果の概要(英文)：Descending noxious inhibitory system was studied with a combination of in vivo optogenetic and electrophysiological approaches. Locus coeruleus neurons in the brain stem in vivo elicited a slow inward current without eliciting a barrage of synaptic responses in response to noxious cutaneous stimulation, and showed an excitation-inhibition, biphasic firing response. A tonic activation of the locus coeruleus neurons expressing channel rhodopsin by light stimulation excited spinal GABAergic neurons to suppress noxious synaptic transmission. Alpha2 agonist, a chronically used sedative agent, at low doses also activated the descending pontospinal noradrenergic system. The present study represents a new target for the treatment of chronic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：疼痛の神経機構 鎮痛 下行性痛覚抑制 光操作 神経生理 ノルアドレナリン 鎮静 in vivoパッチ
クランプ

1. 研究開始当初の背景

生体は、生命が脅かされるなど特殊な状況において一時的に痛みを抑制し、闘争や逃避を可能にする防御システムを備えていることが知られている。戦場での負傷兵士の多くがまったく痛みを訴えない場合などがその例である。この系には大脳皮質、視床下部など複数の部位が関与していると考えられるが、最終的には脳幹に存在する神経核（青斑核や縫線核）から下行する線維によって、痛みの中枢への入り口である脊髄後角において、選択的に末梢からの痛みの入力を有効に抑制するものと考えられている。

現在までこの下行性抑制系を介した脊髄鎮痛メカニズムの詳細は主に、脳画像解析や行動薬理的解析に加え脊髄スライス標本（Yoshimura & Nishi, Neuroscience 1993）が用いられてきた。しかし、スライス標本には脳幹から脊髄に至る下行性の神経回路が保存されていないため、作動薬をスライス全体に投与してシナプス伝達抑制機構の解析が行われてきた。従って、下行性の神経終末から実際に脊髄放出される伝達物質による抑制作用を明らかにすることは困難であった。この問題を補うために研究代表者は、1999年に世界に先駆けて、麻酔下脊髄後角からの *in vivo* パッチクランプ法を開発した（Furue et al., J Physiology 1999; Furue, et al., Patch-Clamp Analysis: Advanced Technique, The Humana Press, 2007; 古江秀昌, 最新パッチクランプ実験技術法, 吉岡書店 2011）。この手法を用いて現在まで、縫線核の電気刺激に伴う下行性抑制機構の解明を行った（Kato et al., J Neuroscience 2006）。しかしながら、脳幹など中枢から制御される痛覚抑制系の以下の本質的な問題が未解決であった。

(1) 下行性抑制系は如何にして作動し、脊髄の痛覚伝達を制御するか？即ち痛覚抑制の指令を出す起始核、青斑核における動作原理の詳細とそれを担う神経回路が不明であった。

(2) 脊髄において強烈な痛覚抑制能を発揮するための基盤神経回路と、それを利用した鎮痛法や病的時におけるその抑制機能の破綻の程度

2. 研究の目的

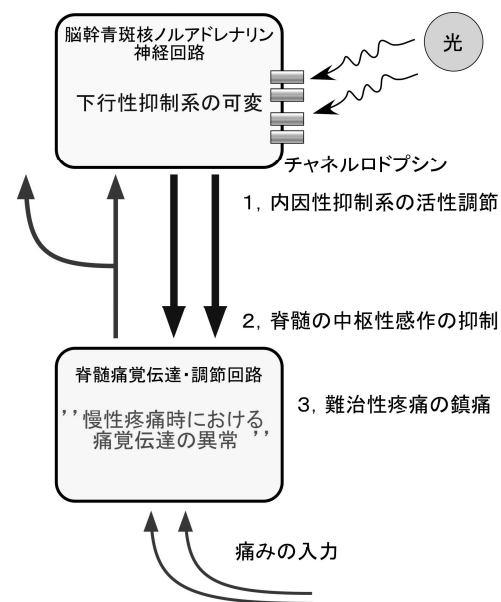
上記の問題を明らかにするために、脳幹から下行性に制御を行う抑制系の1つである、青斑核からの下行性ノルアドレナリン抑制系（図）に着目し、以下の研究を遂行した。

(1) 脳幹青斑核からの *in vivo* パッチクランプ記録法を開発し、下行性抑制系の起始核

の作動原理の詳細を解析した。

(2) 青斑核に刺激電極を留置、あるいはチャンネルロドプシンを青斑核ニューロンに特異的に発現させ、青斑核ニューロンの活動を光依存性に制御する手法を確立した。

(3) 更に、脊髄後角からの *in vivo* パッチクランプ法により、光依存性に活動制御した青斑核ニューロンが如何なる機構で痛みを抑制するか。また、これらの抑制系を利用した鎮痛法の開発、および痛覚過敏やアロディニアなど病的痛みの発症に、これらの抑制にどのような変調が生じるか検討を行った。



図、中枢性の(下行性ノルアドレナリン神経による)痛覚抑制、除痛のメカニズム

3. 研究の方法

(1) 下行性抑制系起始核、青斑核における局所回路の作動原理の解析

青斑核は解剖学的に脊髄後角表層から直接痛みの入力を受けることが報告されている。青斑核ニューロンから *in vivo* パッチクランプ記録を行い、生理的な痛み刺激によって誘起される興奮性シナプス後電流 (EPSC) や抑制性シナプス後電流 (IPSC) の発生頻度や振幅を解析した。青斑核ニューロンが痛み刺激に対して如何なるシナプス入力を受け、発火頻度を制御しているか調べた。また、パッチ電極にニューロピオチンを添加して記録細胞を実験終了後に染色し、記録細胞の位置や形状、および含有する合成酵素を指標にノルアドレナリン神経を同定した。

(2) 光依存性の青斑核の活動制御

レンチウイルスベクターにチャンネルロドプシンを組み込み、青斑核ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させた。青斑核ニューロ

ンは脊髄のみならず視床下部、大脳皮質、小脳、延髄など広範に投射し、睡眠、覚醒、呼吸、循環や皮質の活動に重要な役割を果たすことが知られている。従って、副作用を最小限にして鎮痛効果を発揮させるために、脊髄へ下行性に投射するニューロンのみを如何に選択的に活性化できるかが問題である。これを解決するために、ウイルスを脊髄の下行性線維から逆行性に感染させた。発現した光感受性チャンネルの機能評価や光刺激による青斑核ニューロンの活動変化の観察は、脳幹スライス標本、あるいは *in vivo* 青斑核からのパッチクランプ法を用いて行った。プリストル大学・Anthony, E, Pickering 博士らと共同でこの研究を行った。

(3) 青斑核活性化に伴う脊髄痛覚抑制機構の解析

光ファイバーを青斑核に留置し、あるいは刺激電極を留置して青斑核ニューロンを選択的に活性化し、その効果を脊髄後角からの *in vivo* パッチクランプ法により記録した。脊髄における興奮性および抑制性シナプス応答への影響を解析し、下行性抑制系の出力が及ぼす影響をシナプスレベルで調べた。また、GABA ニューロンから記録を行うため、VGAT-venus ラット(生理研・川口教授、群馬大学・柳川教授より供与)を用いた。既に確立され多くの研究者が用いている痛覚過敏やアロディニアを呈するモデル動物を用いて下行性抑制作用の破綻の程度を解析した。

4. 研究成果

以下に列記する成果を得て、本来生体に備わる痛みを中枢性に制御する内因性抑制系、特に青斑核からのノルアドレナリン神経を介した下行性抑制機構の本質を明確にした。また、臨床で用いられる鎮静剤が低用量でこの鎮痛機構を賦活化することを見出すなど内因性抑制系を利用した新たな鎮痛法を開発した。これらの成果は国際誌や国内外の学会で公表を終えるなど、本研究成果は慢性疼痛に対する新たな鎮痛・治療法の開発に極めて有用であり、ヒト健康増進など社会に大きく還元できると考えられた。

(1) 下行性抑制系の起始核、青斑核ノルアドレナリン神経の作動原理

青斑核からの *in vivo* パッチクランプ法を用い、生理的な刺激によって誘起される応答をシナプスレベルで解析した。電極内に添加したニューロピオチンにより記録細胞を染色し、ノルアドレナリンの合成酵素との2重染色や記録電極先端の位置から記録細胞がノルアドレナリン神経であることを同定した。青斑核ニューロンは数 Hz の自発性の発

火を伴い、皮膚への痛み刺激によってその発火頻度を一過性に上昇し、その後抑制する2相性の応答を示した。その発火頻度上昇には緩徐な内向き電流が関与し、興奮性および抑制性シナプス入力は関与しないなど、青斑核の作動原理を明らかにした。

(2) 青斑核ニューロンの活動を光依存性に制御する手法の確立

レンチウイルスを用いてチャンネルロドプシンを青斑核ニューロンに発現する動物の作出に成功した。チャンネルロドプシンを発現する細胞は青斑核に局限し、その細胞はノルアドレナリンの合成酵素と共発現した。光依存性に青斑核ニューロンの活動をコントロール出来ることを脳幹スライス標本にて確認・評価し、光依存性に青斑核ニューロンの発火頻度が上昇した。

(3) 青斑核ニューロンによる痛覚抑制機構の解析(光操作と *in vivo* パッチクランプ法による解析)

脊髄後角から *in vivo* パッチクランプ記録を行い、上記と同様に光操作して青斑核ノルアドレナリンニューロンを興奮させた。静止電位付近の電位固定下に脊髄後角ニューロンは自発性の興奮性シナプス後電流を発生した。青斑核刺激を行うと、興奮性シナプス後電流の発生頻度や振幅に変化は現れなかった。一方、0 mV の電位固定下に抑制性シナプス後電流を記録すると、青斑核の光刺激によってその発生頻度と振幅が著明に増大した。

脊髄後角における抑制性介在ニューロンである GABA ニューロンから記録を行うと、一部の GABA ニューロンはノルアドレナリンにより活動電位を発生した。この GABA ニューロンの賦活化には 1 受容体を介することが明らかとなり、ホールセルクランプ法でもセルアタッチド法でも同様の作用が確認できた。一方、疼痛モデルを用いた解析ではこの抑制機構に著しい変調は見出し得なかった。

(4) 下行性抑制系を利用した鎮痛法の開発

鎮静剤であるデクスメトミジンを低用量投与すると、青斑核ニューロンが賦活化することを見いだした。また、同様に *in vivo* パッチクランプ法で詳細な解析を行うと、脊髄において抑制性シナプス伝達が増大すること、下行性抑制系を賦活化することが明らかになった。鎮静を呈さない低用量のデクスメトミジンは、下行性抑制機構を逆説的に賦活化して、脊髄 GABA ニューロンの活性化を伴って、鎮痛効果を現すことが明らかになった。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計20件)

Hickey L, Li Y, Fyson S, Watson T, Perrins R, Hewinson J, Teschemacher A, Furue H, Lumb B, Pickering AE. Opto-activation of locus coeruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats. *J Neurosci* 34(12): 4148-4160, 2014. (査読有) doi: 10.1523/JNEUROSCI.4835-13.2014.

Funai Y, Pickering AE, Uta D, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K and Furue H. Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms. *Pain* 155(3): 617-628, 2014. (査読有) doi: 10.1016/j.pain.2013.12.018.

Yamada J, Jinno S. S100A6 (calcyclin) is a novel marker of neural stem cells and astrocyte precursors in the subgranular zone of the adult mouse hippocampus. *Hippocampus* 24(1):89-101, 2014. (査読有) doi: 10.1002/hipo.22207.

Funai Y, Nishikawa K, Mori T, Asada A, Imoto K and Furue H. Systemic alpha-2 agonist administration facilitates inhibitory synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn mediated through alpha-1 adrenoceptors. *Pain Res* 28(3): 145-153, 2013. (査読有)

Hakozaki A, Imoto K, Hayashi Y, Kawatani M and Furue H. In vivo patch-clamp analysis of visceral spinal sensory synaptic transmission and spinal control of lower urinary tract function. *Pain Res* 28(3): 155-165, 2013. (査読有)

古江秀昌. 中枢性の痛覚抑制機構. *ペインクリニック*, 2013, 34(8):1091-1099, 2013. (査読無)

Yamada J, Jinno S. Spatio-temporal differences in perineuronal net expression in the mouse hippocampus, with reference to parvalbumin. *Neurosci* 253:368-79, 2013. (査読有) doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.08.061.

Yamada J, Jinno S. Novel objective classification of reactive microglia following hypoglossal axotomy using hierarchical cluster analysis. *J Comp Neurol* 521:1184-201, 2013. (査読有) doi: 10.1002/cne.23228.

Fukazawa Y(他10名、番目), Neurologin-1 controls synaptic abundance of NMDA-type glutamate receptors through extracellular coupling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110:725-730, 2013. (査読有) doi: 10.1073/pnas.1214718110.

Sugiyama D, Hur SW, Pickering AE, Kase D, Kim SJ, Kawamata M, Imoto K and Furue H. In vivo patch-clamp recording from locus coeruleus neurones in the rat brainstem. *J Physiol (Lond)*, 590(10): 2225-2231, 2012. (査読有) doi: 10.1113/jphysiol.2011.226407.

Xie DJ, Uta D, Feng PY, Wakita M, Shin MC, Furue H and Yoshimura M. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. *Mol Pain*, 8(1):58, 2012. (査読有) doi: 10.1186/1744-8069-8-58.

Furue H and Kato G. Noradrenaline. *Bone Joint Nerve*, 2(2): 231-237, 2012, 査読無

古江秀昌, 杉山大介, 川真田樹人, 舟井優介. 下行性ノルアドレナリン痛覚抑制機構とその活動制御. *麻酔* 61(増刊): S30-40, 2012 (査読無)

Yamada J, Jinno S. Upregulation of calcium binding protein, S100A6, in activated astrocytes is linked to glutamate toxicity. *Neurosci* 226:119-129, 2012. (査読有) doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.068.

Fukazawa Y and Shigemoto R. Intra-synapse-type and inter-synapse-type relationships between synaptic size and AMPAR expression. *Curr Opin Neurobiol*, 22:446-452, 2012. (査読有) doi: 10.1016/j.conb.2012.01.006.

Fukazawa Y(他6名、番目). Application of an optogenetic byway for perturbing neuronal activity via glial photostimulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:20720-20725, 2012.

(査読有) doi:

10.1073/pnas.1213458109.

Fukazawa Y(他7名、番目).

Light-evoked somatosensory perception of transgenic rats that express channelrhodopsin-2 in dorsal root ganglion cells. PLoS One 7:e32699, 2012. (査読有) doi:

10.1371/journal.pone.0032699.

Budisantoso T, Matsui K, Kamasawa N, Fukazawa Y and Shigemoto R. Mechanisms underlying signal filtering at a multisynapse contact. J Neurosci

32:2357-2376, 2012. (査読有) doi:

10.1523/JNEUROSCI.5243-11.2012.

Lu J, Katano T, Uta D, Furue H and Ito S. Rapid S-nitrosylation of actin by NO-generating donors and inflammatory pain model mice. Mol Pain, 7(1): 101, 2011. (査読有) doi:

10.1186/1744-8069-7-101.

Sugiyama D, Imoto K, Kawamata M and Furue H. In vivo patch-clamp analysis of descending noradrenergic controls of spinal nociceptive transmission. Pain Res, 26(1): 1-9, 2011. (査読有)

[学会発表](計8件)

古江秀昌. 生理学からみた鎮痛・発痛メカニズム. 第6回日本運動器疼痛学会, ランチョンセミナー, 2013.12.7-8, 神戸

Furue H and Imoto K. Endogeneous control of pain transmission. 1st CU-NIPS Symposium "Frontier in Physiological Sciences Research: From Basic Research to Diseases and Treatments" シンポジウム, 2013.10.21-22, Bangkok, Thailand

Furue H, Koga K, Imoto K. In vivo spinal inhibitory synaptic responses evoked by optoactivation of descending noxious inhibitory system. The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, シンポジウム, 2013.9.4-7 浜松

古江秀昌. 光による神経の活動制御と髄節を越える痛みの抑制. 第3回運動器疾患の新しい疼痛治療を考える会, 招待講演, 2013.6.8, 和歌山

Furue H. In vivo analysis of spinal GABAergic inhibition of nociceptive transmission. 第90回日本生理学会大会, シンポジウム, 2013.3.29-31, 東京

Furue H. In vivo patch clamp analysis of spinal modulation of nociceptive synaptic transmission by optoactivation of the locus coeruleus. NIPS International Workshop 2012, Central Neuroplasticity in Sensory-Emotional Link, 招待講演, 2012. 9. 13-15, Aichi

古江秀昌. 神経生理学からみた内因性痛覚抑制機序とその減弱による疼痛発現機序. 日本麻酔科学会第59回学術集会, 招待講演, 2012. 6. 7-9, 兵庫

Furue H. In vivo patch-clamp analysis of pontospinal descending inhibitory control of pain. 第89回日本生理学会大会, シンポジウム, 2012.3.29-31, 長野

[図書](計2件)

Furue H. In vivo blind patch-clamp recording technique. In: Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols. (Springer Protocols Handbooks) Springer-Verlag, Japan, pp.171-182, 2012

古江秀昌, In vivo ブラインドパッチ法. In; 最新パッチクランプ実験技術法. 吉岡書店, 京都, pp.115-120, 2011

[その他] ホームページ

<http://www.nips.ac.jp/huinfo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)
生理学研究所・生体情報研究系・准教授
研究者番号: 20304884

(2)研究分担者

神野 尚三 (JINNO, Shozo)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 10325524

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)
名古屋大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 60343745

(3)連携研究者

井本 敬二 (IMOTO, Keiji)
生理学研究所・所長
研究者番号: 00176512