

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20380

研究課題名(和文) オプトジェネティクス法を駆使した島皮質における除痛促進神経回路の解明

研究課題名(英文) Activation of fast-spiking GABAergic neurons in the agranular insular cortex through a piriform cortical pathway

研究代表者

山本 清文 (YAMAMOTO, Kiyofumi)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：30609764

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：種々の感覚情報が収斂する島皮質は、他の皮質構造と異なる「無顆粒(AI)」皮質領域が存在する。過去の報告からこのAI領域は、特異的な神経回路が構築されている可能性が示唆されるが、詳細な検討が成されていない。そこで、laser-scanning photostimulation法、電気刺激ならびに光遺伝学的手法にて、嗅覚情報を処理する梨状皮質が、抑制性fast-spiking に強力に inputs し、その島皮質の有力な出力先が延髄の三叉神経核であることを同定した。

研究成果の概要(英文)：The insular cortex (IC) plays a pivotal role in processing multiple sensory information. Among the IC subdivisions, i.e. granular, dysgranular, and agranular IC (AI), the AI lacks the granular cell layer. In spite of the accumulating knowledge about the functional significance of the AI including nociceptive and olfactory information processing, functional features of AI local circuits has been unknown. To elucidate the synaptic connection mechanisms in the AI, we used laser-scanning photostimulation (LSPS) mapping using slice preparations, which is suitable for exploring neural connections to comprehend the source of excitatory synaptic inputs to recorded neuron. The activities of GABAergic fast-spiking interneurons are driven by neurons in the piriform cortex and the endopiriform cortex. The fast-spiking cell in the AI may play as a gate of excitatory inputs from the piriform cortex to the IC.

研究分野：神経生理

キーワード：島皮質 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系は、さまざまな感覚受容器から届く情報を分析・統合することによって外界の状況を「知覚」する。この原則は、外傷や炎症反応などの身体の内外の危険な状況を報せるための疼痛知覚にも当てはまる。口腔・顔面領域の疼痛シグナルは、体表・口腔内に存在する種々の受容器により活動電位のインパルスに変換され、三叉神経などの求心性線維を介して脳内に入り、視床後内側核を経由し、その一部は島皮質に入力する。入力した情報は、同皮質内に存在する局所神経回路によって統合・処理される。島皮質は、扁桃体とも密に連絡することから、ストレスや情動行動にも重要な働きをしている (Yamamoto et al., 1994)。島皮質の情報処理機構が破綻すると、顔面・口腔感覚の異常、味覚異常ならびにストレス性自律機能障害、さらには薬物中毒といった重篤な疾患を引き起こすと考えられる (Naqvi and Bechara, 2009)。

視覚野や聴覚野と比し、痛み刺激に応答するニューロンが存在することが認められるため (Jasmin et al., 2003, 2004)、島皮質は痛覚、内臓感覚、味覚など複数の感覚が収斂する特殊な感覚野であるといえる。他の感覚野と類似した 6 層から構成される顆粒島皮質および不全顆粒島皮質は、味覚・口腔感覚の生成に寄与し (Yamamoto et al., 1985; Yasui et al., 1990; Hanamori et al., 1998)、第 4 層の顆粒細胞層を欠く無顆粒島皮質は、痛みに関する情報を処理するニューロンが存在することが知られる (Jasmin et al., 2003, 2004)。解剖学的手法により、島からの興奮性線維は腕傍核ならびに青斑核へ投射することが示されている。島からの出力は、これら神経核の 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重要な役割を担う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、痛みを感じやすくさせると考えられる (Jasmin et al., 2003, 2004)。無顆粒皮質の GABA 作動

薬の無顆粒皮質への投与、ならびに同領域への herpes virus による GAD67 遺伝子の強制発現がモデル動物の疼痛閾値を著明に上昇させたことから、無顆粒島皮質は、痛覚の生成や侵害刺激を痛みとして感じる「疼痛閾値の決定」に非常に重要であると考えられる。したがって、閾値の決定に係わる無顆粒島皮質の局所回路において、出力ニューロンである興奮性細胞の活動を強力に抑制する、あるいは本興奮性細胞に抑制をかける GABA 作動性ニューロンを選択的に動員することにより、口腔領域のみならず身体の疼痛閾値をコントロールすることが可能であると推測される。既報によると、(1) 無顆粒島皮質ならびに不全顆粒皮質において、電極刺激に対する応答が表層-深層方向に伝播する微小カラム状応答が、疼痛閾値の決定に関係する無顆粒皮質に特徴的な局所回路が存在する可能性を示唆している (Sato et al., 2008)。(2) 代表者の先行研究で、高頻度発火型の GABA 作動性介在ニューロン (fast-spiking interneuron, FSN) のマーカータンパクである parvalbumin の陽性ニューロンが無顆粒皮質の第 5 層深層-第 6 層に密に存在することを見出した (Kawaguchi and Kubota 1997; Galarreta and Hestrin 2002)。浅層の PV ニューロンと比較し、これらのニューロン集団の axon terminal は第 5 層深層-第 6 層に終止することを示した。代表者は、Laserscanning photostimulation (LSPS) 法により、(3) このニューロン集団のみが隣接する傍梨状皮質の方向から興奮性入力を受けることを示した。したがって、傍梨状皮質からの興奮性入力は無顆粒皮質の FSN を動員し、周囲の出力性の錐体細胞の興奮を強力に抑制し、島皮質からの出力を減弱・消失させると予想される。この傍梨状皮質-島皮質における回路を選択的に賦活させることで、青斑核ノルアドレナリンニューロンの興奮を介した痛みの下行性抑制系の賦活を引き起こし、口腔領域ならびに身体の除痛効果を生み出

すと予想される。無顆粒島皮質の FSN によって形成される大脳皮質嗅覚野-痛覚野連関の局所神経回路の同定が、全く新しい機序による慢性疼痛に対する治療の基盤を構築すると考えられるため、本研究の立案に至った。

2. 研究の目的

除痛に寄与すると予想される無顆粒島皮質-青斑核の一連の脳内経路の存在する根拠として、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を示した (Jasmin et al., 2003, 2004)。ある特定の物質 (男性臭やアンドロステロンなどのステロイドホルモン) の吸引は、ストレスホルモンであるコルチコステロンの血中濃度を上昇させるが、一方で種々の痛み刺激に対するマウスならびに他の動物種の疼痛閾値を上げ、痛みを感じにくくさせていることが報告されている (Sorge et al., 2014)。したがって無顆粒皮質深層に局在し、FSN の集団が、疼痛閾値を下げる島皮質の出力に抑制をかけ、この経路が除痛作用に寄与していると大いに予想される。代表者は、以下に示す可能性をオプトジェネティクス的手法を取り入れ、薬理的、電気生理学的によって検討し、島皮質における局所神経回路を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

実験には VGAT-Venus 蛍光タンパク遺伝子導入ラットを用いた。既報に基づき急性脳スライス標本作製した。2-3 週齢の Venus 発現ラットを pentobarbital 麻酔下で断頭した (75 mg/kg, i.p.)。吻側大脳皮質を摘出し、マイクロサライサーを用いて島皮質を用いて厚さ 350 μm の冠状断スライスを作製した。人工脳脊髄液灌流下で、共焦点レーザー顕微鏡ならびに蛍光顕微鏡観察下で、Venus 陽性ニューロンと陰性ニューロンを GABA 作動性抑制性ニューロンと興奮性錐体ニューロ

ン (Pyr) に弁別した。複数のニューロンに電極を同時に装着しホールセルパッチクランプ法により膜電位を記録した。脱分極性ならびに過分極性パルスによって惹起された発火パターンや膜特性から記録したニューロンの高頻度発火型介在細胞 (FSN) を同定した。分類したニューロンに対し、-60 mV で膜固定し、脱分極性刺激パルス (1200 pA, 2.5 ms) によってパッチ電極を設置するニューロン同士で形成されるシナプス応答を記録した。ケージドグルタミン酸 (200 μM) および AD-5 (25-50 μM) 灌流下で、記録ニューロン周囲に UV レーザーを最大 560 ポイントの地点を照射し、レーザー誘発性のシナプス応答から記録ニューロンに入力する興奮性の入力源の位置を推定した。

電気刺激実験において、電極を LOT 上に設置し、0.1 - 2 mA の強度にて刺激し、刺激誘発性 EPSC を記録した。

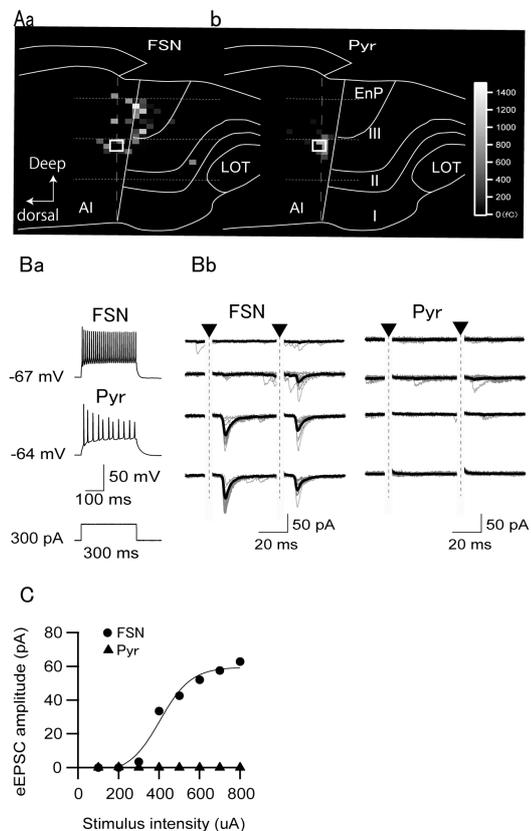


図 1 Caged-グルタミン酸灌流下における UV レーザー照射時の興奮性入力応答マップと LOT 刺激の誘発で誘発した EPSC response

ChR2-mCherry 遺伝子を島皮質のニューロンに発現させる目的で、アデノ随伴ウイルス (AAV)5 型をベクターとして使用した (Penn-vector core)。3-4 週齢ラットを深麻酔し (導入 5%, 維持 1-2%)、島皮質の直上の頭蓋骨に直径 1 mm 以下の孔を開ける。マイクロシリンジにてウイルス混濁液 (1 μ L) を数分間かけて注入する。注入後、縫合して閉創し、3-5 週間後に、ウイルス注入部位および青斑核を含む脳幹部の急性スライス標本を作製し遺伝子の発現状態および注入位置を確認する。青斑核スライスに青色 LED にて光刺激し、島皮質から投射する線維の動員によって、EPSC が発生する可能性を検討した。

4. 研究成果

無顆粒皮質 layer V 深層部に位置する Fast-spiking interneuron (FSN、図 1Aa)ならびに錐体細胞 (Pyr、図 1Ab)の興奮性入力のマッピングを LSPS 法によって推定した。MNI-caged グルタミン酸を灌流し、スポット状の UV (350 - 1750 nm) を照射して(336 -560 ポイント)、興奮性シナプス応答を誘発した。中央の白枠内に存在するニューロンから記録した。Layer V 深層部の FSN に対する興奮性入力の入力源は無顆粒皮質 AI に隣接する傍梨状皮質 (EnP)で多く認められた。また、LOT に設置した電極からの電気刺激によって誘発した Fast-spiking interneuron (FSN)および錐体細胞 (Pyr)の同時記録で得られたシナプス応答を図 1C で示す。2 回連続した刺激をマーク (▼)で示す時間に行った。Layer V 深層部の FSN から長い潜時の eEPSC が認められた。潜時のばらつきが少ないことから、LOT-SFN 間のモノシナプス応答を記録する可能性が高く、LOT の終末が FSN に直接シナプスを形成している可能性を示唆する。本 FSN 周辺に位置する Pyr からシナプス応答は認められなかった。

AAV を微量注入し、4-5 週間後に作成した島皮質スライスにおいて mCherry の発現が確認された(図 2)。また予想外であったが、既報で示されていた青斑核・縫線核といった神

経核において僅かな mCherry の発現が認められた。しかしながら、三叉神経核 (sp5c) において mCherry の著明な発現が認められたことから、本神経核が島皮質からの主な出力先のひとつである可能性を示唆した。また、島皮質からの出力線維が生理的に機能する可能性を検討するため、LED 光刺激を行ったところ、三叉神経核に局在する GABA 作動性ニューロンから興奮性シナプス応答が記録された。この結果は、少なくとも島からの出力が三叉神経核にて GABA/glycine 作動性ニューロンを動員する可能性を示した。今後、島からの出力が GABA/glycine 作動性ニューロンもしくは興奮性 2 次ニューロンに投射する可能性を詳細に検討しなければならない。

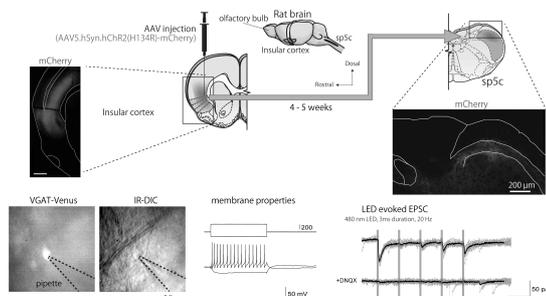


図 2 島皮質への AAV 導入によって sp5c で発現した ChR2

5. 主な発表論文等

(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 2 件)

1. Yokota Y, Koyanagi Y, Yamamoto K, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Opioid subtype- and cell type-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in the rat insular cortex. *Neuroscience*, 339: 査読有 . p478-490.2016
2. Yamamoto K, Takei H, Koyanagi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Presynaptic cell-type-dependent regulation of GABAergic synaptic transmission by nitric oxide in rat insular cortex. *Neuroscience* 284: 査読有 . p65-77.

2015

[学会発表] (計 4 件)

1. 山本清文、小林真之、P/Qタイプカルシウムチャンネルによって制御されるラット島皮質 GABA 作動性シナプス伝達、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎ブリックホール、長崎新聞ホール アストピア (長崎県・長崎市)
2. 山本清文、小林真之、島皮質における抑制性シナプス伝達の短期可塑性に対する電位依存性カルシウムチャンネルサブタイプの役割、第 133 回日本薬理学会関東部会、2016 年 7 月 9 日、国際医療福祉大学 (栃木県・大田原市)
3. 山本清文、越川憲明、小林真之、無顆粒皮質 GABA 作動性 fast-spiking ニューロンにおける梨状皮質由来の興奮性入力応答、第 89 回日本薬理学会関東部会、2016 年 3 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
4. 山本清文、中村紘子、越川憲明、小林真之、ラット下歯槽神経切断モデルで生じる島皮質局所神経回路の変性機序の解明、第 132 回日本薬理学会関東部会、2015 年 7 月 4 日、明海大学 (千葉県・浦安市)

[図書] (計 0 件)

[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 0 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

山本 清文 (YAMAMOTO, Kiyofumi)
日本大学・歯学部・助教
研究者番号：30609764