

令和元年6月10日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15341

研究課題名(和文) 前帯状回からの覚醒下in vivoパッチクランプ記録法の開発

研究課題名(英文) Development of in vivo patch-clamp recording technique from the anterior cingulate cortex

研究代表者

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)

兵庫医科大学・医学部・教授

研究者番号：20304884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：痛みの評価は今まで主に、逃避行動や脊髄の神経活動が指標とされているが、快・不快に加え感情や共感を含めた痛みの情動的側面など疼痛の本質を見極める極めて有用な評価法を開発する必要がある。そこで、覚醒時の前帯状回の痛みに対する役割を明らかにする神経生理的記録・評価法を開発すれば、痛みの情動・高次機能を捉える手掛かりを得ることができる。また、その評価系は難治性疼痛など新規鎮痛薬の評価に有用であることから、成果を広く社会に貢献できると考え本研究を遂行した。前帯状回から疼痛特有の応答が記録できるなど、神経生理学的記録・評価法の開発に成功し、今後の応用研究に大いに寄与できることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

覚醒下前帯状回においてvon Frey刺激に伴う持続性の応答を得ることができるなど、新たな神経生理的記録・評価法の開発に成功した。一方で、麻酔下では、麻酔の影響を受けて感覚応答が減弱したものの、特に、神経障害性モデルを用いた解析から前帯状回ニューロンの閾値は低下し、von Frey刺激の間中持続するモデル特有の応答が記録された。In vivo標本は全身や局所への薬物の投与が可能であることから、本研究で開発した評価・記録法は、基礎医学の発展のみならず、痛みの情動等に対する鎮痛薬の評価に有用であり、難治性疼痛に対する新規治療法開発など今後の応用研究に大いに寄与できる。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have shown that anterior cingulate cortex (ACC) is an important brain region in the emotional aspect of pain. However, the neuronal mechanisms for the ACC emotional pain, is not fully understood. In this study, we developed in vivo electrophysiological recordings from ACC neurons, and examined neuronal responses evoked by natural sensory stimulation. Under urethane and isoflurane anesthesia, in vivo extracellular and whole-cell patch-clamp recordings were made from ACC neurons. ACC neurons exhibited up- and down-states and fired spontaneously during up-states. Mechanical stimulation applied to the skin of the hind paw elicited action potentials in ACC neurons. We also developed an in vivo awake recording technique from the ACC. It enabled us to analyze a typical sustained excitation of ACC neurons after cessation of sensory mechanical stimulation applied to the skin. The present in vivo recordings may be useful to develop new analgesic agents and treatments.

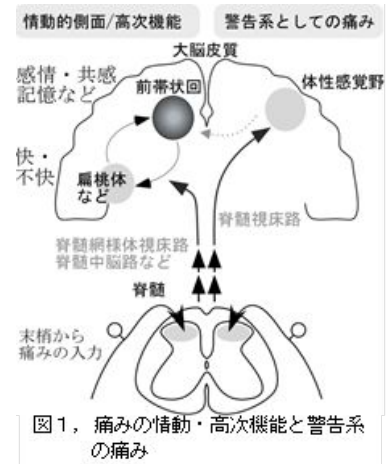
研究分野：神経生理

キーワード：情動 鎮痛 神経生理的評価

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みには組織傷害を感知する生体警告系としての感覚に加え、感情や共感、記憶や予測と密接に関連し、痛みの高次機能として形成される情動的側面がある。現在まで逃避行動や脊髄神経活動など生体警告系を指標に、アロディニアなど疼痛発現機構の研究が精力的に進められ、多くの成果が得られている。一方で、痛みの情動・高次機能の詳細は、脳画像解析から既に前帯状回や島皮質、扁桃体など大脳辺縁系の関与が明確にされているにも関わらず、未だ不明なことが多い(図1)。研究代表者は麻酔下に脊髄や、意識などに重要な役割を果たす青斑核、体性感覚野からの *in vivo* パッチクランプ法を開発し、従来手法では困難な生理的な痛みの伝達・調節機構の詳細をシナプスレベルで明らかにしてきた。そこで、覚醒時の前帯状回の痛みに対する役割を明らかにする神経生理的記録・評価法を開発すれば、痛みの情動・高次機能を捉える手掛かりを得ることができる。また、その評価系は難治性疼痛など新規鎮痛薬の評価に有用であることから、成果を広く社会に貢献できると考え本研究を遂行した。



2. 研究の目的

覚醒下の前帯状回からの神経生理学的記録・評価法を開発し、麻酔下から得られた結果と比較し、麻酔が前帯状回に与える影響等を調べた。疼痛モデルにおける神経機構を解析し、前帯状回における疼痛特有の応答を捉え、記録・解析することを目的とした。

3. 研究の方法

吸入麻酔を用い全身麻酔下に固定用チャンバーを固定し、術後動物の状態を管理した。定位に前帯状回から記録を行い、パッチクランプ法および細胞外記録法により神経活動を記録した。ホールセルモードで後角細胞からパッチクランプ記録やマルチユニット記録を行い、活動電位の記録に加え、電位固定下にグルタミン酸を介した興奮性のシナプス後電流を記録した。下肢皮膚へ生理的な感覚刺激を加え、誘起されるシナプス応答を定量解析した。麻酔深度を変え覚醒下に、自発性の活動や感覚刺激に対する応答を記録した。先行研究で多く用いられている疼痛モデルを本研究にも用いた。神経障害性疼痛モデルから同様に *in vivo* パッチクランプ記録や細胞外記録を行い、電位固定下にシナプス後電流を単離・定量記録を行った。麻酔深度の影響も検討し、モデル動物における前帯状回固有の応答を記録した。実験は生命倫理の観点に十分配慮した上で実験計画を策定し、所属機関の当該委員会や国際疼痛学会の策定規約に従って研究を遂行した。

4. 研究成果

まず、前帯状回からの麻酔下での記録・解析を行い、次いで覚醒下からの記録法の開発を行った。定位に前帯状回的位置を確認し、麻酔下にパッチクランプ用記録電極を前帯状回へ刺入した。ホールセルモードでパッチクランプ記録を行って活動電位の記録に加え、電位固定下に興奮性のシナプス後電流 (Excitatory postsynaptic current, EPSC) を記録した。下肢皮膚へ生理的な感覚刺激を加え、誘起されるシナプス応答や活動電位を定量解析すると、皮膚への機械的刺激に伴って EPSC の発生頻度が増加し、活動電位の発火頻度が上昇した。麻酔深度を変えると、麻酔深度に依存してシナプス応答や活動電位の発火が変化し、特に深度を高めるとバースト状の群発性の発火が観察された。活動電位閾値下のシナプス応答を電流固定下で記録・解析すると、麻酔深度に依存して up-state に比して down-state が増加し、感覚刺激に対する応答が減弱した。

上述のように痛みの情動的側面に関与する部位の1つである前帯状回は麻酔下で感覚応答を惹起するが、その神経活動は麻酔の影響を受けることが示唆された。そこで、麻酔の影響を排除するために、覚醒下に記録を行う方法を開発した。覚醒下からの記録は困難を極めたが、安定した記録を行う上で重要な保定法を開発し、検討の結果小動物から細胞外記録により安定した記録が得られた。まず、von Frey フィラメントを用いた行動学的解析を行った。次いで、覚醒下に前帯状回から in vivo 細胞外記録を行い、後肢に感覚刺激を加えた。Von Frey による触や圧刺激を後肢に加えると弱い屈曲反射がみられた。その際の神経活動を同時記録すると特徴的な周波数成分が出現するなど、覚醒下の前帯状回応答の記録に成功した。また、屈曲反射後もその応答が持続するなど覚醒下特有の感覚応答の記録に成功した。一方で覚醒下では逃避行動後に観察される持続性の応答を得ることはできたが、記録を行った多くの場合、後肢の逃避行動に伴う体動により記録が安定せず、定量的解析が困難な場合も多かった。そこで、疼痛モデルにおける応答を安定して記録し、正常のものと比較・検討するために、覚醒下 in vivo 前帯状回からの記録法を用いた。行動解析で用いた刺激と同様の後肢への von Frey 刺激を行い、生理的な機械的刺激に伴う帯状回の応答を記録した。正常動物前帯状回において、自発性の活動が観察され、一定の周波数のバースト状の自発活動が記録された。Von Frey 刺激により刺激を行うと、刺激の間中神経活動が持続した。次いで、末梢神経障害性のモデル動物を作製し、同様の解析を行うと、バースト状の自発活動は正常と比較して変化は見られなかった。一方、強度の弱い von Frey 刺激でも前帯状回の神経活動が持続するなど、正常に比べモデル特有の応答を見出した。

以上より、覚醒下で von Frey 刺激に伴う持続性の応答を得ることができるなど、新たな神経生理的記録・評価法の開発に成功した。覚醒下では記録の安定に問題があるものの、屈曲反射に伴う持続的応答は前帯状回における負の情動に関与することが示唆された。一方で、麻酔下では、麻酔の影響を受けて感覚応答が減弱したものの、特に、神経障害性モデルを用いた解析から前帯状回ニューロンの閾値は低下し、von Frey 刺激の間中持続するモデル特有の応答が記録された。In vivo 標本は全身や局所への薬物の投与が可能であることから、本研究で開発した評価・記録法は痛みの情動等に対する鎮痛薬の評価に有用であり、難治性疼痛に対する新規治療法開発など今後の応用研究や基礎医学の発展に寄与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 14 件)

Koga K, Matsuzaki Y, Migita K, Shimoyama S, Eto F, Nakagawa T, Matsumoto T, Terada K, Mishima K, Furue H, Honda K. Stimulating muscarinic M1 receptors in the anterior cingulate cortex reduces mechanical hypersensitivity via GABAergic transmission in nerve injury rats. *Brain Res* 1704:187-195, 2019, doi: 10.1016/j.brainres.2018.10.013. 査読有.

Yamada A, Koga K, Kume K, Ohsawa M, Furue H. Ethanol-induced enhancement of inhibitory synaptic transmission in the rat spinal substantia gelatinosa. *Mol Pain* 14(1744806918817969): 1-13, 2018, doi: 10.1177/1744806918817969. 査読有.

Tashima R, Koga K, Sekine M, Kanehisa K, Kohro Y, Tominaga K, Matsushita K, Tozaki-Saitoh H, Fukazawa Y, Inoue K, Yawo H, Furue H, Tsuda M. Optogenetic Activation of Non-Nociceptive A Fibers Induces Neuropathic Pain-Like Sensory and Emotional Behaviors after Nerve Injury in Rats. *eNeuro* 15;5(1), 2018 doi: 10.1523/ENEURO.0450-17.2018. 査読有.

Koga K, Shimoyama S, Yamada A, Furukawa T, Nikaido Y, Furue H, Nakamura K, Ueno S. Chronic inflammatory pain induced GABAergic synaptic plasticity in the adult mouse anterior cingulate cortex. *Mol Pain* 14 (1744806918783478): 1-14, 2018, doi: 10.1177/1744806918783478. 査読有.

Nakamori H, Naitou K, Horii Y, Shimaoka H, Horii K, Sakai H, Yamada A, Furue H, Shiina T, Shimizu Y. Medullary raphe nuclei activate the lumbosacral defecation center through the descending serotonergic pathway to regulate colorectal motility in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 314(3):G341-8, 2018, doi: 10.1152/ajpgi.00317.2017. 査読有.

- Pham VM, Tu NH, Katano T, Matsumura S, Saito A, Yamada A, Furue H, Ito S. Impaired peripheral nerve regeneration in type-2 diabetic mouse model. *Eur J Neurosci* 47(2):126-139, 2018, doi: 10.1111/ejn.13771. 査読有.
- Kawatani M, Akimoto N, Yamada A, Furue H, Kawatani M. Noradrenergic effects in rat sacral autonomic nucleus using in vitro slice patch-clamp recordings. *Biomed Res* 38(6):359-369, 2017, doi: 10.2220/biomedres.38.359. 査読有.
- Koga K, Kanehisa K, Kohro Y, Shiratori-Hayashi M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K, Furue H, Tsuda M. Chemogenetic silencing of GABAergic dorsal horn interneurons induces morphine-resistant spontaneous nociceptive behaviours. *Sci Rep* 7(1):4739, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-04972-3. 査読有.
- Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Imoto K, Furue H. Characterization of Nociceptive Behaviors Induced by Formalin in the Glabrous and Hairy Skin of Rats. *Basic Clin Neurosci* 8(1):37-42, 2017, doi: 10.15412/J.BCN.03080105. 査読有.
- Jang IJ, Davies AJ, Akimoto N, Back SK, Lee PR, Na HS, Furue H, Jung SJ, KimYH, Oh SB. Acute inflammation reveals GABA(A) receptor-mediated nociception in mouse dorsal root ganglion neurons via PGE(2) receptor 4 signaling. *Physiol Rep* ;5(8). pii: e13178, 2017, doi: 10.14814/phy2.13178. 査読有.
- Yoshimura M, Furue H. In vivo electrophysiological analysis of mechanisms of monoaminergic pain inhibitory systems. *Pain* 158: S85-91, 2017, doi: 10.1097/j.pain.0000000000000844. 査読有.
- Takayama Y, Furue H, Tominaga M. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities. *Sci Rep* 7:43132, 2017, doi: 10.1038/srep43132. 査読有.
- Choi S, Yamada A, Kim W, Kim SK, Furue H. Noradrenergic inhibition of spinal hyper excitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments. *J Physiol Sci* 67(3):431-438, 2017, doi: 10.1007/s12576-016-0505-9. 査読有.
- 御領憲治、古江秀昌. 脳幹における痛みの抑制と慢性疼痛発現の機構、*医学のあゆみ* 260(2) : 144-148, 2017, 査読無.

〔学会発表〕(計 16 件)

- 中川達貴、箱崎敦志、秋元 望、尾崎紀之、井本敬二、古江秀昌 (2018.3.30) 下部尿路から脊髄への知覚伝達機構. 第 95 回日本生理学会大会. サポートホール高松 (香川県高松市) ポスター
- 山田彬博、古賀浩平、井本敬二、桑 和彦、大澤匡弘、古江秀昌 (2018.3.30) in vivo 前帯状回皮質感覚応答の解析. 第 95 回日本生理学会大会. サポートホール高松 (香川県高松市) ポスター
- 高山靖規、古江秀昌、富永真琴 (2018.3.29) TRP チャネルと ANO1 を標的とした 4-イソプロピルシクロヘキサノールによる疼痛および搔痒の緩和. 第 95 回日本生理学会大会. サポートホール高松 (香川県高松市) ポスター
- 古賀浩平、矢尾育子、瀬藤光利、古江秀昌、ずお みる (2018.3.29) ユビキチンプロテアソームシステムを介した前帯状回シナプス前長期増強の調節機構. 第 95 回日本生理学会大会. サポートホール高松 (香川県高松市) ポスター
- Furue H (2018.3.10) Activation of spinal parasympathetic neuronal circuit by noxious afferent fibers. Spring meeting of Korean Pain Research Society (IASP, Korean Chapter) Ewha Womens University LG Convention Center (Korea) 英語招待講演
- 中川達貴、秋元 望、箱崎敦志、古江秀昌 (2017.11.18) 下部尿路からの脊髄への感覚伝達機構の解析. 第 110 回近畿生理学談話会プログラム. 神戸大学大学院医学研究科・医学部 楠キャンパス (兵庫県神戸市) 口演
- 高山靖規、古江秀昌、富永真琴 (2017.6.17) 4 - イソプロピルシクロヘキサノールのイオンチャネル阻害作用. 第 39 回日本疼痛学会. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市) 口演
- 山田彬博、大澤匡弘、桑和彦、井本敬二、古江秀昌 (2017.3.30) 覚醒下前帯状回皮質感覚応答の In vivo 解析. 第 94 回日本生理学会大会 (静岡県浜松市) アクトシティ浜松・ポスター
- 古江秀昌 (2017.3.17) ノルアドレナリン神経による上行性および下行性の痛覚調節機. 第 90 回日本薬理学会年会. 長崎パブリックホール・シンポジウム (長崎県長崎市) シンポジウム

Furue H (2016) Orofacial stimulation-induced excitation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus and its control of nociceptive transmission. 第 93 回日本生理学会大会 (北海道札幌市) 英語シンポジウム

Furue H (2016) Optogenetic control of descending noradrenergic system and in vivo analysis of its antinociceptive action. 第 89 回日本薬理学会年会 (神奈川県横浜市) シンポジウム

N. Akimoto, A. Hakozaiki, M. Kawatani, K. Imoto, M. Kawatani, H. Furue (2016) Spinal Nociceptive Transmission from the Lower Urinary Tract. International Association for the Study of Pain (IASP) (神奈川県横浜市) ポスター

A. Yamada, M. Ohsawa, K. Kume, K. Imoto, H. Furue (2016) Effects of ethanol on GABAergic synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn. International Association for the Study of Pain (IASP) (神奈川県横浜市) ポスター

S. Choi, S. Kim, S. Oh, H. Furue (2016) Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: Electrophysiological and behavioral assessments. International Association for the Study of Pain (IASP) (神奈川県横浜市) ポスター

D. Uta, M. Yoshimura, R. Kawatsu, K. Imoto, H. Furue (2016) Electrophysiological analysis of local anesthetic actions on nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal cord. International Association for the Study of Pain (IASP) (横浜) ポスター

H. Furue, L. Hickey, Y. Li, A. Pickering, K. Imoto (2016) Spinal GABAergic Synaptic Responses Elicited by Optogenetic Activation of Descending Noradrenergic System. International Association for the Study of Pain (IASP) (神奈川県横浜市) ポスター

〔その他〕

ホームページ等

兵庫医科大学神経生理部門 HP

<https://www.hyo-med.ac.jp/department/neurophysiol/index.html>

6 . 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：井本 敬二

ローマ字氏名：(IMOTO, Keiji)

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。