

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K17019

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法による島皮質から三叉神経脊髄路核尾側亜核への投射経路の機能解明

研究課題名(英文) Optogenetic strategies to investigate profiles of excitatory projection from the insular cortex to trigeminal spinal subnucleus caudalis

研究代表者

中谷 有香 (NAKAYA, Yuka)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60781391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：口腔顔面領域における侵害情報は主に三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)へ入力する。味覚や痛覚など複数の感覚情報が収束する島皮質はSp5Cへ下行性投射しているが、Sp5C内の局所神経回路の解明が十分でない。本研究ではオプトジェネティクス法を用いて島皮質 Sp5C下行性投射線維を特異的に活性化させ、ホールセル・パッチクランプ法にてSp5Cにおける抑制性および興奮性ニューロンから同程度に興奮性シナプス後電流を記録した。しかし、Sp5C内で抑制性ニューロンから興奮性ニューロンへのシナプス応答はfailure rateが高いことから、島皮質 Sp5C下行性投射はSp5Cの興奮性を強めると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験で得られた結果は、抜歯や外科的処置後に生じる神経障害性疼痛などの慢性痛の形成メカニズムを解明する一助となる。

島皮質から三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)への下行性投射がSp5Cにおいて抑制性よりも興奮性の作用を強める可能性があるという本実験の結果は、島皮質の過興奮によって顔面・口腔感覚の異常を引き起こす可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：The trigeminal spinal subnucleus caudalis (Sp5C) is well known as the key nucleus that relays orofacial noxious sensory information to the higher central nervous system. The insular cortex (IC) plays a principal role in processing noxious inputs, and the direct descending projection from IC to Sp5C have been reported. However, little information is available in terms of physiological effects in the IC Sp5C pathway. We examined how IC projections modulate the activities of Sp5C neurons using an optogenetic technique in combination with pharmacological manipulation of synaptic transmission. Optogenetic stimulation induced EPSCs both in excitatory and inhibitory Sp5C neurons. We recorded unitary inhibitory postsynaptic currents (uIPSCs) from Venus-positive neurons to Venus-negative neurons, and found the synapses showed the high failure rate of uIPSCs. These results suggest that IC projections induce excitatory rather than inhibitory effects on excitatory projection neurons in the Sp5C.

研究分野：神経科学

キーワード：三叉神経脊髄路核尾側亜核 島皮質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔顔面領域の侵害情報は、自由神経終末で種々の受容器を介して活動電位に変換され、一次求心性線維を介して三叉神経脊髄路核尾側亜核 (Sp5C) の 1 層に投射する。Sp5C には GABA - アミノ酪酸やグリシンを含有する抑制性介在ニューロンが多数存在し、周囲のニューロンの活動を抑制している。1 層には上位中枢へ投射するニューロンが存在することから、この領域に存在する抑制性ニューロンの活動は侵害受容の制御に直接関与すると考えられる。一方で、味覚や内臓感覚に加えて痛み感覚の情報処理を行うことで知られる島皮質から Sp5C に投射するニューロンの存在も明らかにされている(Sato et al., 2013)が、この機能についてはほとんど明らかにされていない。これまでに島皮質から青斑核内の GABA ニューロンへの出力が報告されており、青斑核の抑制性ニューロンの興奮を調節することで、青斑核ノルアドレナリンニューロンの周囲の抑制性ニューロンの興奮を介して、痛みの感受性を上昇させていると考えられている(Jasmin et al., 2003)。すなわち、島皮質から Sp5C への出力もまた、口腔顔面領域からの疼痛情報を減弱させるか、あるいは増強すると考えられる。そこで島皮質 Sp5C 下行性投射経路ならびに Sp5C 局所神経回路を解明することで、口腔顔面領域における急性・慢性痛に対する除痛効果を生み出す新規治療の基盤を提案することができると考えた。

2. 研究の目的

藻類由来のチャンネルロドプシンは、青色光を吸収すると陽イオン、とくに Na^+ を取り込むという性質をもち、チャンネルロドプシンを発現したニューロンを光刺激することによって Na^+ が細胞内に流入し、脱分極することでニューロンを興奮させる。この光遺伝学的手法を用いて島皮質ニューロンを特異的に活性化させ、島皮質ニューロンの Sp5C へのシナプス伝達様式を明らかにすることを目的とした。さらに、緑色蛍光タンパク Venus で標識された遺伝子改変ラット (VGAT-Venus ラット) を用いることで、Sp5C の 1 層および 2 層におけるニューロンについて興奮性が抑制性を同定し、電気生理学的解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Sp5C における抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの分布

動物には、抑制性ニューロンが緑色蛍光タンパク Venus で標識された VGAT-Venus ラットを用いた。5%イソフルラン吸入麻酔下にて、4%パラホルムアルデヒドを用いて灌流固定し、組織を採取した。Sp5C を含む脳スライスを作成し、共焦点レーザー顕微鏡下で Sp5C における抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの分布を解析した。

(2) チャンネルロドプシン 2 (ChR2)を用いた Sp5C における島皮質ニューロンの関与の検討

ChR2 および蛍光タンパクである mCherry を発現させるためにアデノ随伴ウイルスをベクターとして用い、左側島皮質に懸濁液を微量注入した。また、侵害情報を Sp5C から高位中枢に投射する経路のうち、ラットではほとんどの神経線維が結合腕傍核に投射すると報告されていることから、逆行性トレーサーであるコレラトキシンサブユニット B (CTB) を右側腕傍核に注入し、腕傍核へ投射する Sp5C ニューロンを同定可能にした。4-5 週間後に、Sp5C を含む急性脳幹スライス標本を作製した。同時に、島皮質および腕傍核を含む急性スライスを作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて注入位置、発現量などを評価した。Sp5C ニューロンからホールセル・パッチクランプ法によって膜電位を記録し、LED 光誘発性の興奮性シナプス後電流 (EPSC) ならびに抑制性シナプス後電流 (IPSC) を記録する。本シナプスのシナプス応答が monosynaptic もしくは polysynaptic を介した応答であるかを電位依存性 Na^+ チャンネルブロッカーであるテトロドトキシン (TTX) および K^+ チャンネルブロッカーである 4 - アミノピリジン (4AP) を用いて同定した。

(3) Sp5C におけるニューロンの膜特性の分類とシナプス伝達特性の検討

Sp5C を含む急性脳スライス標本を Venus ラットから作製し, Sp5C における I/ 層の Venus 陽性ならびに陰性ニューロンからホールセル・パッチクランプ法で同時に記録した。片方のニューロンに脱分極性パルスを加えて活動電位を誘発し, 他方のニューロンから興奮性シナプス後電流または抑制性シナプス後電流を記録した。

4. 研究成果

(1) Sp5C における抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの分布

本実験では, 抑制性ニューロンが緑色蛍光タンパク Venus で標識された VGAT-Venus ラットを用い, 抑制性ニューロンと興奮性ニューロンそれぞれの分布を解析した。緑色が抑制性ニューロン, 赤色が神経マーカーである NeuN を示し, 黄色は Venus 陽性ニューロンと NeuN の共発現を示す。本実験により, 興奮性ニューロンが7割程度, 抑制性ニューロンが3割程度を占めた。

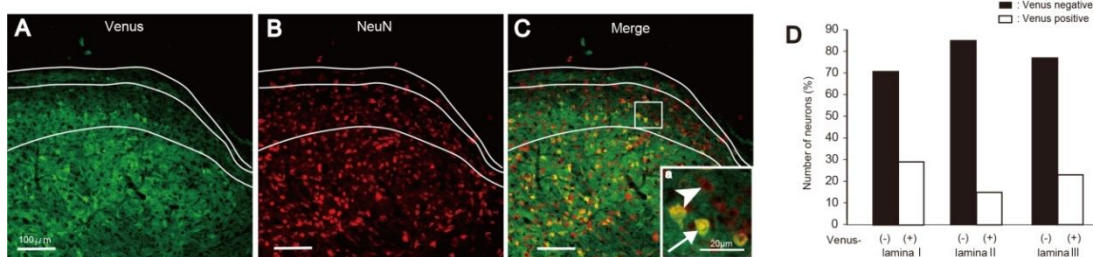


図1 Sp5C における抑制性ニューロンと興奮性ニューロンの分布
Sp5C における VGAT-Venus 陽性細胞 (A), NeuN 陽性細胞 (B) および重ね合わせ (C) の共焦点レーザー顕微鏡像を示す。Sp5C 表層における VGAT-Venus 陽性細胞と陰性細胞の割合を示す (D)。

(2) ChR2 を用いた Sp5C における島皮質ニューロンの関与の検討

左側島皮質にアデノ随伴ウイルスを用いて ChR2 および共発現するよう設計した mcherry を微量注入し, 右側腕傍核に CTB を注入し, 4-5 週後に Sp5C を含む急性脳スライスを作成したところ, 右側 Sp5C において mcherry を発現した投射線維および CTB 陽性ニューロンの発現を確認した。そしてホールセル・パッチクランプ法で CTB 陽性ニューロンおよび抑制性ニューロンから記録し, 光刺激によってそれぞれ EPSC を記録した。さらに, 電位依存性 Na^+ チャンネルブロッカーである TTX を灌流投与することで光誘発性の EPSC を消失させ, K^+ チャンネルブロッカーである 4AP を投与してシナプス前ニューロンの入力抵抗を上昇することで脱分極を容易にし, ChR2 を発現したニューロンのみがシナプス伝達を可能にすることで, 島皮質ニューロンが単シナプス性に Sp5C ニューロンに入力しているかを検索した。すると, CTB 陽性ニューロンおよび抑制性ニューロンともに 4AP で EPSC の回復を認めた。さらに DNQX で応答が消失した。すなわち, 島皮質ニューロンが単シナプス性に Sp5C における投射ニューロンおよび抑制性ニューロンに入力し, さらにグルタミン酸作動性ニューロンであることを認めた。

(3) Sp5C におけるニューロンの膜特性の分類とシナプス伝達特性の検討

ホールセル・パッチクランプ法で Sp5C の2つのニューロンから同時に記録を行ない, 一方に脱分極性パルスを加えることで活動電位を発生させ, 他方から興奮性または抑制性シナプス後電流を得られるペアを探索したところ, 多くは抑制性ニューロンから興奮性ニューロンへの抑制性シナプス後電流を記録し, failure rate が非常に高い可能性を見出した。さらにほとんどはグリシン受容体遮断薬のストリキニーネによって応答が消失した。

< 引用文献 >

Sato F et. al, Projections from the insular cortex to pain-receptive trigeminal caudal subnucleus (medullary dorsal horn) and other lower brainstem areas in rats, Neuroscience, 233, 2013, 9-27

Jasmin L et. al, Analgesia and hyperalgesia from GABA-mediated modulation of the cerebral cortex,
Nature, 424, 2003, 316-320

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zama Manabu, Fujita Satoshi, Nakaya Yuka, Tonogi Morio, Kobayashi Masayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Preceding Administration of Minocycline Suppresses Plastic Changes in Cortical Excitatory Propagation in the Model Rat With Partial Infraorbital Nerve Ligation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Neurology	6. 最初と最後の頁 1150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fneur.2019.01150	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Masayuki, Nakaya Yuka	4. 巻 62
2. 論文標題 Anatomical aspects of corticotrigeminal projections to the medullary dorsal horn	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 144 ~ 146
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2334/josnusd.19-0386	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakaya Y, Yamamoto K, Kobayashi M
2. 発表標題 Profiles of excitatory projection from the insular cortex to trigeminal spinal subnucleus caudalis
3. 学会等名 the 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakaya Y, Yamamoto K, Kobayashi M
2. 発表標題 Optogenetic strategies to investigate profiles of excitatory projection from the insular cortex to trigeminal spinal subnucleus caudalis
3. 学会等名 11th Congress of the European Pain Federation (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中谷 有香、小林 真之
2. 発表標題 島皮質における興奮性ニューロンの三叉神経脊髄路核尾側亜核のI/II層における興奮性および抑制性ニューロンへの投射様式
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中谷有香, 山本 清文, 小林 真之
2. 発表標題 三叉神経脊髄路核尾側亜核の抑制性細胞 興奮性細胞間のシナプス特性の解明
3. 学会等名 第41回神経科学大会
4. 発表年 2018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
研究協力者	小林 真之 (KOBAYASHI Masayuki)		
研究協力者	山本 清文 (YAMAMOTO Kiyofumi)		