

機関番号：63905

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20602003

研究課題名（和文） In vivo パッチクランプ法を用いた下行性痛覚抑制系可塑的变化の解析

研究課題名（英文） In vivo patch-clamp analysis of plastic changes in descending inhibitory system

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

研究成果の概要（和文）：生体防衛システムである下部脳幹から脊髄への下行性痛覚抑制作用の機序を解明するために、in vivo パッチクランプ法を用いてその抑制作用をシナプスレベルで詳細に解析した。正常では、青斑核を刺激すると脊髄抑制性シナプス応答が著明に増大することを見出した。神経因性疼痛モデル動物ではその青斑核を介した抑制系賦活化が減弱する傾向が得られるなど、本成果は今後の難治性疼痛の新たな治療薬の開発に大いに貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Descending noxious inhibitory system was studied by using in vivo patch-clamp recording technique. The present main finding is that stimulating the locus coeruleus enhances spinal inhibitory synaptic transmission.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：シナプス、感覚、ノルアドレナリン、鎮痛、青斑核

1. 研究開始当初の背景

脊髄における下行性痛覚抑制作用の詳細な機能解析は、*in vitro* の系を用いてスライス標本に作動薬を投与して解析を行ったものが主であり、下行性抑制系起始核の賦活化によって、実際に、如何にして痛みの伝達が選択的に抑制されるかなど、生理的条件下におけるシナプス・細胞レベルでの十分な機能解析は行われていなかった。したがって、現在まで分子生物学的研究や免疫組織学的研究、行動薬理学的解析から得られてきた成果を有機的に併せ、疼痛発現機序を統合的に明らかにすることが困難であった。

2. 研究の目的

本研究は下行性抑制系のノルアドレナリン

抑制系を対象に、起始核である青斑核刺激によって脊髄において如何なる鎮痛作用を示すかを *in vivo* シナプスレベルで詳細に解析し、神経因性疼痛モデルにおけるその抑制能の変調を検討した。

3. 研究の方法

生理的条件下に近い *in vivo* パッチクランプ法を主に用いて、脊髄後角細胞に誘起されるシナプス応答を詳細に定量解析した。

4. 研究成果

電流固定下に膠様質細胞から膜電位を記録すると、 -70 mV付近に静止電位を有し、自発性の興奮性シナプス後電位 (EPSP) が誘起された。青斑核を電気刺激すると、EPSP

の発生頻度や振幅に変化が見られたが、緩徐な膜電位の変化は観察されなかった。また、-70 mVの電位固定下で青斑核刺激を行っても同様に、緩徐なシナプス電流は発生しなかった。次に、0 mVの電位固定下で記録を行うと、膠様質細胞は自発性の抑制性シナプス後電流 (IPSC) を誘起した。青斑核刺激を行うと、 $\alpha 1$ 受容体を介して、IPSCの発生頻度と振幅が著明に増大し、そのIPSCの増強作用は青斑核の電気刺激の強度に依存した。脊髄表面からノルアドレナリンを直接投与すると、予想外に膠様質細胞は電流固定下に10 mV程度過分極した。-70 mVの電位固定下ではノルアドレナリンによる緩徐な外向き電流が発生した。この外向き電流の逆転電位は K^+ イオンの平衡電位である-90 mVと一致し、電極内液に加えた Cs^+ やGDP- β -Sにより抑制された。また、0 mVでは、ノルアドレナリンによるIPSCの発生頻度と振幅の著明な増大が、青斑核刺激の時と同様に観察された。脊髄スライス標本でも同様に、ノルアドレナリンは膠様質細胞に外向き電流を発生させる事、IPSCの発生頻度を増大する事が観察されている。以上より、脊髄表面に投与したノルアドレナリンの作用とは異なりin vivoでは、青斑核刺激により膠様質細胞に緩徐なシナプス応答や過分極は発生しない、一方で、抑制性のシナプス伝達を増強して痛覚伝達を抑制する事が示唆された。

次いで、記録電極に予めneurobiotinを加えておき、記録終了後に標本の固定を行って組織化学的解析を併せて行い、基盤となる神経回路の同定を行った。形態学的特徴からGABAなどを含有する抑制性介在ニューロンであるislet細胞、その他脊髄第II層、膠様質細胞において、抑制性シナプス応答の増大が観察された。また、小脳を一部除去した後、刺激電極を背側より青斑核へ定位に刺入・留置して青斑核刺激を行った。その結果、脊髄において抑制性シナプス応答が著明に増大した。更に、神経因性疼痛モデルとして坐骨神経を結紮したモデル動物を作製し、痛覚過敏の程度を解析した。後肢への機械的刺激に対する逃避行動の解析から、モデル動物にアロディニア (異痛症) が観察された。これらの動物から記録を行うと、ノルアドレナリンを介した抑制性シナプス応答が減弱する傾向が観察された。以上より、青斑核—脊髄への下行性抑制系の神経回路を同定し、その抑制能の減弱が痛覚過敏発症に寄与することが示唆さ

れた。これらの成果は神経因性疼痛など難治性疼痛の新たな治療薬の開発に貢献することが大いに期待された。

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13件)

- ① Sugiyama D, Imoto K, Kawamata M, Furue H., In vivo patch-clamp analysis of descending noradrenergic controls of spinal nociceptive transmission., Pain Research, 査読有, 2011, in press
- ② Hachisuka J, Furue H., Furue M and Yoshimura M., Responsiveness of C neurons in rat dorsal root ganglion to 5-hydroxytryptamine-induced pruritic stimuli in vivo., Journal of Neurophysiology, 査読有, 104(1): 271-279, 2010
- ③ Yanagisawa Y, Furue H., Kawamata T, Uta D, Yamamoto J, Furuse S, Katafuchi T, Imoto K, Iwamoto Y and Yoshimura M.. Bone cancer induces a unique central sensitization through synaptic changes in a wide area of the spinal cord., Molecular Pain, 査読有, 6:38, 2010
- ④ 古江秀昌, 歌 大介, 局所麻酔薬光学異性体の痛覚伝達選択的な遮断効果-基礎生理学的な検討-, 日本臨床麻酔学会誌, 査読無, 30(4): 535-544, 2010
- ⑤ Georgiev SK, Furue H., Baba H and Kohno T., Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons., Molecular Pain, 査読有, 6:25, 2010
- ⑥ Uta D, Furue H., Pickering AE, Rashid MH, Mizuguchi-Takase H, Katafuchi T, Imoto K and Yoshimura M., TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord., European Journal of Neuroscience, 査読有, 31(11): 1960-1973, 2010
- ⑦ Takazawa T, Furue H., Nishikawa K, Uta D, Takeshima K, Goto F and Yoshimura M., Actions of propofol on substantia gelatinosa neurones in rat spinal cord revealed by in vitro and in vivo patch-clamp recordings., European

- Journal of Neuroscience, 査読有, 29(3):518-529, 2009
- ⑧ Abe K, Kato G, Katafuchi T, Tamae A, Furue H and Yoshimura M., Responses to 5-HT in morphologically identified neurons in the rat substantia gelatinosa in vitro., Neuroscience, 査読有, 159(1):316-324, 2009
- ⑨ Uta D, Furue H & Yoshimura M., Spinal modulation of nociceptive synaptic transmission via activation of TRPA1 and TRPV1., Pain Research, 査読有, 23(3):141-150, 2008
- ⑩ 岡井 恒、古江秀昌、吉村 恵., ノイロトロピンによるセロトニン下行性疼痛抑制系の賦活化と鎮痛作用. , Pain Research, 査読有, 23(1):11-18, 2008
- ⑪ Katano T*, Furue H*, Okuda-Ashitaka E, Tagaya M, Watanabe M, Yoshimura M & Ito S. (*contributed equally), N-Ethylmaleimide -sensitive fusion protein (NSF) is involved in central sensitization in the spinal cord through GluR2 subunit composition switch after inflammation., European Journal of Neuroscience, 査読有, 27(12) : 3161-3170, 2008
- [学会発表] (計 48 件)
- ① Furue H, Stimulation of the locus coeruleus modulates synaptic transmission in the rat superficial dorsal horn in vivo., 第 88 回日本生理学会大会, 2011 年 3 月, Journal of Physiological Sciences 誌上
- ② Kohno T, Gerorgiev SK and Furue H., Xenon inhibits excitatory but not inhibitory transmission in rat spinal cord dorsal horn neurons., The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010 年 11 月 13-17 日, San Diego, USA
- ③ Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Uta D, Imoto K, Iwamoto Y and Yoshimura M., The plastic changes of spinal excitatory synaptic transmission in a murine model of cancer-induced bone pain., The 40th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2010 年 11 月 13-17 日, San Diego, USA
- ④ Sugiyama D, Imoto K, Kawamata M and Furue H., In vivo patch-clamp analysis of synaptic responses evoked in the rat locus coeruleus neurons., The 33rd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2010 年 9 月 2-4 日, 神戸コンベンションセンター(兵庫県)
- ⑤ Yanagisawa Y, Furue H, Kawamata T, Imoto K and Yoshimura M., Changes in nociceptive behaviors and spinal excitatory synaptic transmission in an murine model of cancer-induced bone pain., 第 32 回日本疼痛学会, 2010 年 7 月 2 日, 京都国際会館(京都府)
- ⑥ 杉山 大介、井本敬二、川真田樹人、古江秀昌, ラット脳幹青斑核からの in vivo パッチクランプ記録法の開発, 第 32 回日本疼痛学会, 2010 年 7 月 2 日, 京都国際会館(京都府)
- ⑦ 歌 大介、井本敬二、古江秀昌, ラット後根神経節細胞 Na チャネルに対する各局所麻酔薬の効果について, 第 32 回日本疼痛学会, 2010 年 7 月 2 日, 京都国際会館(京都府)
- ⑧ Furue H., In vivo patch-clamp analysis of surround inhibition of nociceptive transmission in the superficial spinal dorsal horn., 1st Korean Pain Research Consortium (KRPC) Symposium, 2010 年 6 月 11 日, Seoul, Korea
- ⑨ Furue H, Imoto K and Yoshimura M., Inflammation triggers noxious synaptic alteration in the rat spinal dorsal horn in vivo., The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society, 2009 年 9 月 16-18 日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑩ Furue H, Ito A and Yoshimura M., Selective loss of presynaptic 5-HT inhibitory actions on spinal mechanical noxious synaptic transmission in ovariectomized rats in vivo., XXXVI International Congress of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009 年 7 月 27 日-8 月 1 日, Kyoto, Japan
- ⑪ 古江秀昌, 細胞接着因子と痛みのシナプス伝達., 日本ペインクリニック学会 第 43 回大会・第 31 回日本疼痛学会, 2009 年 7 月 16-18 日, 名古屋国際会議場(愛知県)
- ⑫ 古江秀昌, 生理学の立場から光学異性体の末梢神経(DRG)への作用の違い, 日本臨床麻酔学会第 28 回大会学術集会・総会, 2008 年 11 月 20-22 日, 国立京都国際会館(京都府)
- ⑬ Furue H and Yoshimura M., In vivo

patch-clamp analysis of nociceptive synaptic transmission through calcium-permeable AMPA receptors in substantia gelatinosa neurons of the rat spinal dorsal horn following inflammation., The 38th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, 2008年11月15-19日, Washington DC, USA

- ⑭ Furue H, Yoshimura M and Pickering AE., Stimulation of the locus coeruleus increases excitatory transmission onto dorsal horn neurons of the rat in vivo., 12th World Congress on Pain, 2008年8月17-22日, Glasgow, UK
- ⑮ Furue H and Yoshimura M., Plastic change in the spinal nociceptive transmission mediated by Ca²⁺-permeable AMPA receptors in vivo after inflammation., 第30回日本疼痛学会, 2008年7月19-20日, 福岡国際会議場 (福岡県)
- ⑯ Furue H, Suzuki S, Koga K, Nohmi M, Takeichi M and Yoshimura M., Functional loss of menthol-sensitive synaptic inputs to spinal dorsal horn neurons in cadherin-8 deficient mice., The 3rd Asian Pain Symposium, 2008年7月18-19日, Fukuoka, Japan
- ⑰ Furue H, Yoshimura M and Pickering AE., Enhancement of excitatory and inhibitory synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn by stimulation of the locus coeruleus in vivo., 第31回日本神経科学大会, 2008年7月9-11日, 東京国際フォーラム (東京都)

[図書] (計3件)

- ① Furue H, In vivo blind patch-clamp recording technique, Springer-Verlag, Modern Patch Clamp Techniques, 2011, in press
- ② 古江秀昌, In vivo ブラインドパッチ法, 吉岡書店, 最新パッチクランプ実験技術法, 2011, 115-120
- ③ 古江秀昌, 杉山大介, 生理学の立場から光学異性体の末梢神経 (後根神経節細胞) への作用の違い, 克誠堂出版, レボブピバカインの基礎と臨床, 2010, 51-64

[その他]

ホームページ等

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

吉村 恵 (YOSHIMURA MEGUMU)

九州大学・医学研究院・教授

研究者番号: 10140641

(H20→H21: 連携研究者)

(3) 連携研究者

吉村 恵 (YOSHIMURA MEGUMU)

熊本保健科学大学・保健科学部・教授

研究者番号: 10140641