

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08943

研究課題名(和文) 光遺伝学を利用した青斑核ニューロン制御による全身麻酔薬作用機序の解明

研究課題名(英文) Mechanism of general anesthetic action by controlling locus coeruleus using optogenetics.

研究代表者

倉部 美起 (Kurabe, Miyuki)

新潟大学・医歯学系・講師

研究者番号：30635579

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)：本研究の目的は全身麻酔の導入・維持・覚醒、一連の流れにおいて、青斑核NA/GABAニューロンの活動が果たす機能的役割とそれぞれの神経の相互関連性を、光遺伝学的手法を用いて解明することである。青斑核NAニューロンを特異的に操作するためにDbh-Creマウスを用い、Cre依存性にChRあるいはArchRを発現するAAVを青斑核に投与し、特定の波長の光をあてることで、NAニューロンを特異的に操作可能になった。さらに青斑核スライス標本からNAニューロンを同定してパッチクランプ記録を行いプロポフォールのシナプス応答に対する影響を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回導入する光遺伝学的手法によってリアルタイムに目的のニューロンの活動をon/offすることが可能となる。これまでのin vitro, in vivoの実験系での問題点を克服し、無麻酔(覚醒)下動物に全身麻酔薬を投与し、リアルタイムに特定のニューロンを操作した際の機能的変化を解析することが可能となる。これらの新たなツールを組み合わせることによって、研究の幅が飛躍的に広がり、従来との知見とは異なる新たな全身麻酔薬の作用機序を見出せると考える。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to elucidate the functional role of the activities of NA/GABA neurons in the locus coeruleus and their interaction during the induction, maintenance, and arousal of general anesthesia, using optogenetic techniques. To specifically manipulate the locus coeruleus NA neurons, Dbh-Cre mice were used, and AAVs expressing Cre-dependently ChR or ArchR were injected into the locus coeruleus. This enabled us to specifically manipulate NA neurons by exposing the locus coeruleus to specific wavelengths of light. In addition, NA neurons were identified from locus coeruleus slice preparations and patch clamp recordings were performed to examine the effects of propofol on synaptic transmission.

研究分野：電気生理学

キーワード：青斑核 全身麻酔薬 パッチクランプ法

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全身麻酔薬の作用機序は現代においても未解明である。解明が進まない理由として、組織標本や遺伝子解析などを用いた *in vitro* の実験系では、意識や覚醒といった機能的な評価が不可能であること、生体を用いた *in vivo* の実験系では、無麻酔下で特定の神経ネットワークの活動を解析するという点では限界があること、などが挙げられる。

青斑核 (LC; locus coeruleus) は中枢神経系に広く分布する NA (noradrenaline) ニューロンの起始核であり、全身麻酔時の意識消失や覚醒にも深く関与していると考えられている。しかし、全身麻酔薬がどのように LC の活性を制御しているのかについての詳細はわかっていない。近年、LC には NA ニューロンのみでなく GABA (gamma-Aminobutyric acid) ニューロンも存在し、相互作用していることが報告され、より複雑なその役割の解明に注目が集まっている。もともと、全身麻酔薬は GABA 受容体に作用し、その感受性を高めることで抑制性神経伝達を促進して鎮静作用を発揮すると考えられていることから、新たに発見された LC の GABA ニューロンと NA ニューロンとの相互の関係性が、全身麻酔薬の作用機序に大きく関与している可能性がある。そのためには、自由行動下マウスを用いて、光遺伝学的に NA/GABA ニューロンをそれぞれ操作した際の機能的変化(行動・脳波)を解析することが必要となる。

今回導入する光遺伝学的手法によってリアルタイムに目的のニューロンの活動を on/off することが可能となる。これまでの問題点を克服し、無麻酔(覚醒)下動物に全身麻酔薬を投与し、リアルタイムに特定のニューロンを操作した際の機能的変化を解析することが可能となる。これらの新たなツールを組み合わせることによって、研究の幅が飛躍的に広がり、従来の知見とは異なる新たな全身麻酔薬の作用機序を見出せると考えた。

2. 研究の目的

全身麻酔の導入・維持・覚醒、一連の流れにおいて、青斑核 NA/GABA ニューロンの活動が果たす機能的役割とそれぞれの神経の相互関連性を、光遺伝学的手法を用いて解明する。

・自由行動下の動物から、光遺伝学的手法を用いて、NA/GABA ニューロンをそれぞれ活性化あるいは不活性化することで、全身麻酔薬の作用がどのように変化するかを明らかにする。

・青斑核スライスから、パッチクランプ法と光遺伝学的手法を組み合わせることで、NA/GABA ニューロンの相互的なシナプス伝達機構の詳細を明らかにする。

3. 研究の方法

光遺伝学的手法の導入：LC-NA ニューロンを特異的に操作するために、Dbh-Cre マウスを用い、Cre 依存性に ChR あるいは ArchR を発現する AAV を青斑核に投与する。LC に光ファイバーを埋め込み、特定の波長の光をあてることで、NA ニューロンをそれぞれ特異的に操作可能となる。

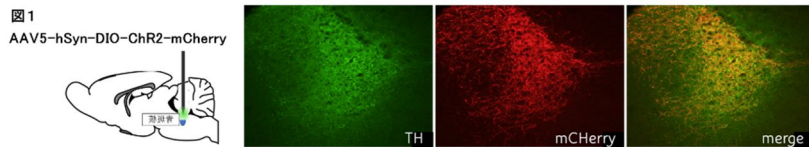
自由行動下マウスを用いた光刺激によるニューロンの制御と脳波解析：このマウスを用いて、自由行動下に全身麻酔導入・維持・覚醒までの一連の脳波とそれぞれのニューロンを操作した際の脳波をリアルタイムに解析する。あらかじめマウス LC に光刺激用のファイバーと脳波解析用電極を埋め込み、NA ニューロンに特定の波長(470 nm)の光をあてることで操作する。操作した際の機能的変化(脳波と行動)を解析することで、それぞれのニューロンが実際

の全身麻酔の導入・維持・覚醒にどのように関与しているかを確認する。全身麻酔薬としてプロポフォールを用いる。

LCスライス標本からパッチクランプ記録を行い、全身麻酔薬投与時のNAニューロンのシナプス伝達の詳細を明らかにする： のマウスから LC を含むスライス標本を作製し近赤外線微分干渉顕微鏡を用いて可視下にホールセルパッチクランプ記録を行う。NA ニューロンを選択的に光刺激によって on/off した際のトランスミッターの放出頻度や、ニューロン間の相互作用（フィードバック機構）を確認する。

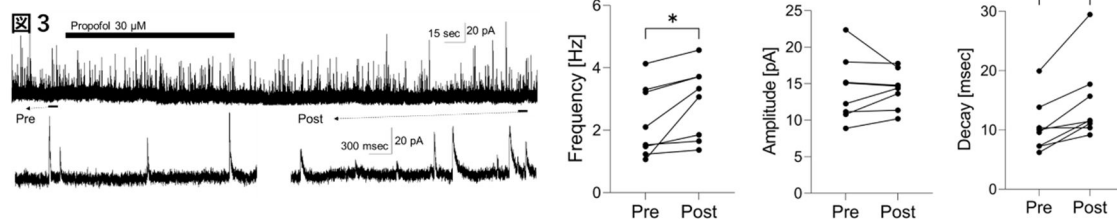
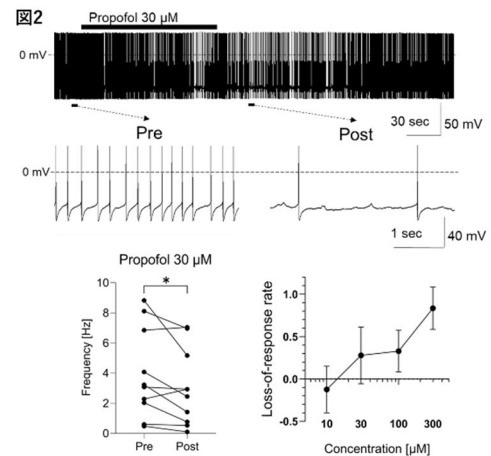
4. 研究成果

光刺激による LC-NA 神経の操作（図 1）： AAV の発現を免疫組織学的に、NA 神経のマーカーである TH (Tyrosine hydroxylase) との共発現を確認することで示した。また、光刺激によって発火が亢進することを確認した。



LC-NA ニューロンからのパッチクランプ

記録（図 2, 3）： 電流固定法で活動電位を記録した。LC-NA ニューロンはプロポフォールの濃度依存性に活動電位発火頻度を減少させた。特に 30 μ 以上の抑制が顕著であった。さらに電圧固定法で抑制性シナプス後電流に対するプロポフォール（30 μ M）の作用を解析したところ、頻度の増加と減衰時間の延長がみられた。活動電位および抑制性シナプス後電流へのプロポフォールの作用は GABAA 受容体拮抗薬である Bicuculine によっていずれも拮抗された。つまり、プロポフォールは LC-NA ニューロンの GABAA 受容体に作用することが示された。



LC 制御が麻酔作用に与える影響： 電気生理学劇解析の結果、プロポフォールが LC-NA ニューロンの GABAA 受容体を介して作用することがわかったため、GABAA 受容体拮抗薬である Bicuculine を LC に投与し、実際に麻酔作用に影響があるかを行動実験によって解析した。あらかじめ Bicuculine 投与用のカニューレを LC に埋め込み、Bicuculine を投与した際のプロポフォール麻酔時の就眠までの時間と覚醒までの時間を計測した。その結果、就眠までの時間は Bicuculine 投与によって変化しなかったが、覚醒までの時間は著明に延長した。つまり、プロポフォールは LC-NA の GABAA 受容体に作用することで麻酔からの覚醒を制御している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Kurabe Miyuki, Sasaki Mika, Furutani Kenta, Furue Hidemasa, Kamiya Yoshinori, Baba Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Structural and functional properties of spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury change overtime via astrocyte activation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 105555 ~ 105555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.105555	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 Nakamura Yuka, Kurabe Miyuki, Matsumoto Mami, Sato Tokiharu, Miyashita Satoshi, Hoshina Kana, Kamiya Yoshinori, Tainaka Kazuki, Matsuzawa Hitoshi, Ohno Nobuhiko, Ueno Masaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid-contacting neuron tracing reveals structural and functional connectivity for locomotion in the mouse spinal cord	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e83108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.83108	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 Sasaki Mika, Kamiya Yoshinori, Bamba Keiko, Onishi Takeshi, Matsuda Keiichiro, Kohno Tatsuro, Kurabe Miyuki, Furutani Kenta, Yanagimura Harue	4. 巻 22
2. 論文標題 Serotonin Plays a Key Role in the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 715 ~ 729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2020.12.008	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Tomohiro, Kurabe Miyuki, Kamiya Yoshinori	4. 巻 35
2. 論文標題 A mechanism of re-sedation caused by remimazolam	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 467 ~ 468
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-021-02930-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyuki Kurabe
2. 発表標題 Functional and structural changes in spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury are long term regulated by astrocytes
3. 学会等名 Neuroscience 2022 San Diego (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 倉部美起
2. 発表標題 痛み研究に関する電気生理学的実験手技
3. 学会等名 生理研痛み研究会2022シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 倉部美起
2. 発表標題 脊髄後角 in vivo 標本からの電気生理学的記録 ~ 臨床医の視点からの痛みメカニズムへのアプローチ ~
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 倉部美起
2. 発表標題 全身麻酔時に青斑核ニューロンが果たす役割についての検討-プロポフォルとセボフルランの比較
3. 学会等名 日本麻酔科学会第70回学術集会
4. 発表年 2023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 分担者	佐々木 美佳 (Sasaki Mika) (20774061)	岐阜大学・大学院医学系研究科・特任講師 (13701)	
研究 分担者	上野 将紀 (Ueno Masaki) (40435631)	新潟大学・脳研究所・教授 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------