

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24792257

研究課題名(和文) 島皮質におけるプロポフォールの局所神経回路制御メカニズムの解析

研究課題名(英文) Pre- and post-synaptic cell type dependent modulation of GABAergic synaptic transmission by propofol in rat insular cortex

研究代表者

小柳 裕子 (KOYANAGI, Yuko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：20609771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、大脳皮質におけるプロポフォールの作用について、ニューロンの組み合わせに着目し、単一シナプス応答性抑制性シナプス後電流の解析を行なった。その結果、(1)プロポフォールは、シナプス後細胞のGABA(A)受容体に作用し、抑制性介在ニューロンよりも錐体細胞を強く抑制する、(2)プロポフォールは大脳皮質において、抑制性シナプスのうち、シナプス前細胞がfast-spiking細胞、シナプス後細胞が錐体細胞のシナプスに対して最も強く作用することを見いだした。以上の結果からプロポフォールは、錐体細胞を選択的に抑制することにより、皮質からの出力を抑制して鎮静作用を発揮している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined whether propofol differentially regulates inhibitory postsynaptic currents (IPSCs) depending on the pre- and postsynaptic cell subtypes in rat insular cortex. Propofol (10 μ M) consistently prolonged decay kinetics of unitary IPSCs (uIPSCs) in all types of inhibitory connections without changing paired-pulse ratio or failure rate. The fast-spiking (FS) to Pyr connections exhibited greater enhancement of uIPSC charge transfer compared to that of FS to FS/non-FS connections, whereas the enhancement of charge transfer in non-FS to Pyr/FS/non-FS connections was smaller than those in FS to Pyr/FS/non-FS. The principal inhibitory connections (FS to Pyr) are the most sensitive to propofol-induced facilitation of uIPSCs, which is likely mediated by postsynaptic mechanisms. This preferential uIPSC enhancement in FS to Pyr connections may result in suppressed neural activities of projection neurons, which in turn reduces excitatory outputs from cortical local circuits.

研究分野：麻酔学

キーワード：プロポフォール 抑制性シナプス伝達 大脳皮質 fast-spiking細胞

1. 研究開始当初の背景

歯科治療中の過度の精神的緊張状態や口腔・咽頭部への侵害刺激などは、ストレスアースとして、迷走神経反射に基づく神経性ショックや過換気発作などの全身的偶発症の原因になる。さらに、循環系疾患や脳血管障害患者、臓器予備力の低下した高齢者などでは、重篤な合併症の誘引としても働く。したがって、歯科治療時の全身的偶発症・合併症を予防するには、確実な無痛の処置もさることながら、ストレス緩和のための管理が必要となる。歯科領域では、これらを解決する一手段として精神鎮静法が発達してきた。精神鎮静法とは、完全な意識消失、不動化、疼痛抑制をはかる全身麻酔とは異なり、患者の意識を消失させない程度に中枢神経系を抑制して、歯科治療に対する不安感や恐怖心を取り除き、精神的な安静状態をもたらすことを期待した手段である。

Propofol は全身麻酔の導入および維持に使用されている静脈麻酔薬である。また、歯科治療における精神鎮静法においても、調節性の良さから頻用されている薬物である。Propofol は、電気生理学的研究から中枢神経系に対して、GABA_A 受容体の活性時間を延長することで鎮静作用を発揮することがすでに報告されている (Hara et al., 1994; Sanna et al., 1995)。一方、侵害刺激に対しては、鎮痛効果がないとする報告 (Nicol et al., 1991; Kubota et al., 2007; Shoda et al., 2009) と弱い鎮痛効果があるとする報告 (Anker-Moller et al., 1991; Jewett et al., 1992) が混在しているのみならず、精神鎮静法で用いられる濃度において痛覚過敏を引き起こすとの報告 (Petersen-Felix et al., 1996; Hofbauer et al., 2004) もある。このように propofol の痛みに対する最終的な影響については、いまだ定説を見ない。精神鎮静法では、患者の意識は保たれるため、痛みの認知や侵害刺激に対する生体反応は維持されている。そのため propofol の痛みに対する効果は、快適かつ安全な歯科治療を目的とする精神鎮静法の質を大きく左右する。

侵害刺激情報は、視床を介して大脳皮質一次および二次体性感覚野へ送られると同時に、前帯状皮質、島皮質を賦活化することが解剖学的・生理学的に明らかにされている (Coghill et al., 1999)。島皮質は体性感覚野、視覚野あるいは聴覚野と異なり、明確な6層構造を持たず、層を欠く不全あるいは無顆粒皮質と6層構造を持つ顆粒皮質から構成される。無顆粒皮質は痛みに応答するニューロンが存在し、高次痛覚中枢として、痛みの質の判断や感受性の調節といった疼痛認知に関与する (Jasmin et al., 2003, 2004)。一方顆粒皮質は、視床核を介して内臓からの入力を受けており、心肺機能や心血管機能を含む体内恒常性の調節に関与していることが知られている (Allen et al., 1991; Augustine, 1996)。このような知見から、麻

酔薬は下位中枢への作用のみならず、疼痛認知処理を行う島皮質をはじめとした高次中枢における神経活動を調節することによって、その鎮痛効果や意識消失効果を発揮している可能性が高い。

以上のように、島皮質の局所神経回路に対する propofol の修飾作用を明らかにすることは、精神鎮静法施行中の侵害刺激に対する生体の反応や心血管機能の恒常性への影響を明らかにする極めて重要な問題であるにも関わらず、その詳細はほとんど分かっていない。

2. 研究の目的

そこで本研究は、島皮質における興奮性および抑制性神経回路に対する propofol の修飾作用について明らかにすることを目的として、以下の実験を行った。

(1) ホールセル・パッチクランプ法によって、興奮性細胞である錐体細胞 (グルタミン酸作動性ニューロン) および抑制性細胞である介在ニューロン (GABA 作動性ニューロン) から記録を行い、細胞内通電に対する発火パターンと膜電位応答から、ニューロンのサブタイプを分類する。

(2) 各タイプのニューロンに対する propofol の効果について、細胞内通電に対する発火パターンと膜電位応答の変化を検討する。

(3) シナプス結合を有する複数のニューロンから同時ホールセル記録を行い、シナプス伝達に対する propofol の効果について、ニューロンの種類の組み合わせに着目し、発火同期性の解析および興奮性シナプス後電流 (EPSC)・抑制性シナプス後電流 (IPSC) の解析を行う。

(4) 記録電極内液中に biocytin を入れておき、記録したニューロンを ABC 法によって可視化して、その軸索投射様式を解析し、電気生理学的解析と併せてニューロンのサブタイプ同定を行う。

3. 研究の方法

(1) 脳スライス標本の作製

実験には VGAT-Venus ラットを用いる。これは GABA 作動性ニューロンに Venus 蛍光タンパクを発現させたラットで、蛍光顕微鏡観察下で抑制性ニューロンを容易に同定できる (Nagai et al., 2002; Uematsu et al., 2008)。Pentobarbital によって深麻酔した 2~5 週齢の VGAT-Venus ラットを断頭し、氷冷した人口脳脊髄液中で脳を摘出する。取り出した脳は、中大脳動脈の前後 3 mm の部分を含むブロックとなるようトリミングし、マイクロスライサーで前頭断の島皮質を含む脳スライス標本 (厚さ 350 μm) を作製する。

(2) 発火パターンおよび膜電位応答の記録

ノマルスキー微分干渉顕微鏡に CCD カメラを組み合わせ赤外光にて脳スライス標本を観察し、島皮質 層に存在する細胞からホー

ルセル・パッチクランプ記録を行う。この際、VGAT-Venus ラットから脳スライス標本を作製することにより、抑制性介在ニューロンと興奮性錐体細胞の区別を容易に行うことができる。すなわち、蛍光顕微鏡観察下で発光している Venus 陽性ニューロンは抑制性ニューロンであり、発光していない Venus 陰性ニューロンは錐体細胞と判断できる。Venus 発現の有無に加えて、電流固定モードで静止膜電位、発火閾値、発火パターンを参考に、記録ニューロンの電気生理学的分類を行う。記録ニューロンのタイプを同定した後、propofol を灌流投与し、発火パターンおよび膜電位応答に対する propofol の作用および濃度依存性を検討する。

さらに複数のニューロンから同時にホールセル記録を行い、記録するニューロン同士でシナプス結合を有するニューロンを見つける。シナプス結合が存在する場合、シナプス前細胞に相当するニューロンに脱分極パルスを与えて活動電位を発生させた時に、シナプス後細胞に相当するニューロンから興奮性あるいは抑制性シナプス後電位が記録できる。これらシナプス結合を有するニューロンに対して、同時に脱分極パルスを与えて活動電位を発生させ、活動電位の同期性に対する propofol の作用を検討する。

(3) IPSC および EPSC の記録

前述の方法によって VGAT-Venus ラットから島皮質を含む脳スライス標本を作製する。複数のニューロンから同時にホールセル・パッチクランプ記録を行い、記録ニューロンのタイプを同定した後、電位固定モードでシナプス結合を有するニューロンを見つける。シナプス結合が存在する場合、シナプス前細胞に相当するニューロンに脱分極パルスを与えて活動電位を発生させた時に、シナプス後細胞に相当するニューロンから単一シナプス応答性抑制性シナプス後電流 (IPSC) あるいは興奮性シナプス後電流 (EPSC) が記録できる。

シナプスを形成するニューロンのタイプに着目し、propofol 灌流投与による IPSC および EPSC の振幅、振幅比、持続時間の変化を解析し、シナプス伝達におよぼす propofol の影響を検討する。記録終了直前に GABAA 受容体アンタゴニスト bicuculline ならびに AMPA 受容体アンタゴニスト DNQX を投与し、IPSC もしくは EPSC の成分を薬理学的手法によって同定する。

(4) 記録細胞の形態学的解析

ホールセル記録のパッチ電極内液に 0.3 % biocytin を入れておき、HRP-ABC 法により記録ニューロンを可視化できるようにしておく。電気生理学的記録終了後、脳スライスは 4 %パラホルムアルデヒドにて固定し、記録ニューロンの樹状突起・軸索の分枝パターンおよび細胞体の位置・大きさを免疫組織化学

的に解析する。

4. 研究成果

(1) 本研究は、大脳皮質において、シナプス結合を有する複数のニューロンから同時ホールセル記録を行い、抑制性シナプス伝達に対する propofol の効果について、ニューロンの組み合わせに着目し、単一シナプス応答性抑制性シナプス後電流 (uIPSC) の解析を行ない、以下の結果を得た。

propofol は、シナプス後細胞の GABAA 受容体に作用し、抑制性介在ニューロンである fast-spiking 細胞 (FS) ならびに non-FS よりも錐体細胞を強く抑制した。

propofol は大脳皮質において、抑制性シナプスのうち、シナプス前細胞が FS、シナプス後細胞が錐体細胞のシナプスに対して最も強く作用した。

propofol は、大脳皮質の FS-FS の電気的シナプスに対して調節作用を示さなかった。

以上の結果から、propofol は、抑制性介在ニューロンと比較して錐体細胞を強く抑制することにより、皮質からの output を抑制する事でその鎮静作用を発揮している可能性が考えられる。これらの結果は論文にまとめられ、麻酔学分野で世界的に最も著名である *Anesthesiology* 誌に掲載された (Koyanagi et al., 2014)

(2) Propofol は、脳波を覚醒時の低振幅速波から高振幅・徐波化させ、アルファ周波数帯を増強することで意識消失をひき起こす可能性が近年になって複数示された (Feshchenko et al., 2004; Ching et al., 2010; Andrada et al., 2012)。脳波は大脳皮質における錐体細胞の活動性を反映していると考えられていることから、propofol は、錐体細胞に対する抑制性シナプス伝達を増強することで、錐体細胞の発火タイミングを調節し、結果としてアルファ周波数帯を増強することで意識消失をひき起こす、という仮説が考えられる。この仮説を証明するために、ホールセル・パッチクランプ法を用いて、同一の抑制性介在ニューロンから投射を受ける2つ以上の錐体細胞の発火タイミングに対する propofol の影響を検討した。その結果、propofol 適用により、シナプス後細胞に相当する錐体細胞は、シナプス前細胞である FS からの抑制性入力を受けることで同期性発火を示すことを見出した。この成果は、国際学会である第9回麻酔と意識国際シンポジウムでポスター発表を行った。

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 2件)

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, 65-77 (2015) 査読有

DOI:

10.1016/j.neuroscience.2014.09.062.

Koyanagi Y, Oi Y, Yamamoto K, Koshikawa N, Kobayashi M. Fast-spiking cell to pyramidal cell connections are the most sensitive to propofol-induced facilitation of GABAergic currents in rat insular cortex. Anesthesiology 121, 68-78 (2014) 査読有

DOI: 10.1097/ALN.0000000000000183

[学会発表](計 7件)

Koyanagi Y, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Propofol preferentially enhances fast-spiking interneuron connections to pyramidal neurons in rat insular cortex. Anesthesiology 2014, 2014年10月11日, New Orleans (The US)

Koyanagi Y, Oi Y, Koshikawa N, Kobayashi M. Propofol induced spike synchrony of pyramidal cells in rat cerebral cortex. MAA9, 2014年7月21日, Tokyo (Japan)

小柳裕子, 内田琢也, 高田耕司, 岡 俊一, 見崎 徹, 大井良之. プロポフォールの単一抑制性シナプス伝達増強作用はシナプスを形成するニューロンサブタイプにより異なる. 第41回日本歯科麻酔学会学術集会, 2013年10月4日, 新横浜国際ホテル(神奈川県横浜市)

小柳裕子, 小林真之, 越川憲明, 大井良之. Propofolによる抑制性入力の増強効果は抑制性介在ニューロンより錐体細胞において強い. 日本麻酔科学会第60回学術集会, 2013年5月23日, 札幌プリンスホテル(北海道札幌市)

小柳裕子, 一杉 岳, 内田琢也, 金 博和, 高田耕司, 岡 俊一, 見崎 徹, 大井良之. プロポフォールによる抑制性シナプス伝達修飾作用はシナプス前細胞の抑制性介在ニューロンサブタイプにより異なる. 第40回日本歯科麻酔学会学術集会, 2012年10月5日, アクロス福岡(福岡県福岡市)

小柳裕子, 大井良之, 越川憲明, 小林真之. プロポフォールは大脳皮質錐体細胞におけるアルファ周波数帯での発火を促

進する. 第6回三叉神経領域の感覚 運動統合機構研究会, 2012年7月8日, 日本大学歯学部(東京都千代田区)

小柳裕子, 小林真之, 越川憲明, 大井良之. 多チャンネル同時ホールセル記録による propofol の抑制性シナプス伝達に対する修飾作用の検討. 日本麻酔科学会第59回学術集会, 2012年6月7日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)

[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:

出願年月日:

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

小柳 裕子 (KOYANAGI, Yuko)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号: 20609771

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: