様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２７ 年　 ６ 月　 ８ 日現在

機関番号：６３９０５
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2013～2014
課題番号：２５６７０２８９

研究課題名（和文）霊長類を用いたGABA抑制能を指標とする新規疼痛評価系の確立

研究課題名（英文）In vivo patch-clamp analysis of spinal GABA-mediated 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,000,000円

研究成果の概要（和文）：霊長類における疼痛発現機構の詳細。特に齧歯類で報告されている脊髄GABA抑制性シナプスや下行性抑制系に着目し、霊長類における抑制系の実態を明確にした。In vivoパッチクランプ法などによる解析から、脊髄後角表層において機械的刺激にともなう興奮性シナプス応答や活動電位が観察され、これらの細胞がカプサイシン感受性のシナプス入力を密に受けることが示された。また、触刺激に伴う脊髄抑制系の実態を捉えることに成功し、霊長類においてもGABAを介した抑制機構を明らかにした。得られた成果や解析法は、新規治療法の開発や鎮痛薬の薬効評価に極めて有用であり、今後の臨床研究に寄与するなど成果を広く社会に還元できる。

研究成果の概要（英文）：Plastic changes in pain modulatory system mediated by spinal GABAergic interneurons are known to have an important role to induce chronic pain. The inhibitory system has been detected mainly in rodents. It's still unknown whether such GABA-mediated inhibitory system is also utilized for analgesic in primate. In the present study, we analyzed nociceptive responses and GABA-mediated inhibitory responses evoked in spinal superficial dorsal horn neurons in marmosets. In vivo patch-clamp and extracellular recordings were made from superficial dorsal horn neurons under deeply anesthetized conditions. Mechanical sensory stimulation evoked excitatory postsynaptic responses and the responses were sensitive to capsaicin. GABA-mediated inhibitory responses were also evoked. These results indicate that capsaicin-sensitive nociceptive circuit and GABAergic inhibitory system exist in the spinal superficial dorsal horn. The present results are useful for the development of new analgesic agents.

研究分野：神経生理

キーワード：鎮痛　疼痛　シナプス　in vivo パッチクランプ　GABA　青斑核　脊髄

１．研究開始当初の背景

ヒトを含めた霊長類と齧歯類では、脳の構造に加え痛覚などの伝達路が一部異なることが知られている。特に霊長類では末梢で痛みを受容する無髄Ｃ線維の数が多く、これに起因するためか脊髄から視床への投射部位、視床内側腹側核には霊長類特有の核が存在する。従って、痛み刺激に対し、霊長類は固有の感受性を持ち、慢性疼痛の発現機構や痛みの調節系は齧歯類と異なるものと推測される。しかしながら、その詳細は未だ不明である。

研究代表者は世界に先駆けて齧歯類からの in vivo パッチクランプ法を開発し[1)]、従来の手法では困難な生理的な痛みの伝達機構の詳細をシナプスレベルで明らかにしてきた[2,3)]。また、外来遺伝子を導入し光刺激によって下行性痛覚抑制能をコントロールする手法を開発した[4)]。これらの手法を霊長類に適用することに挑戦すれば、霊長類固有の疼痛発現機構を明確にでき、新規治療法の開発や新規鎮痛薬候補化合物の薬効評価に極めて有用な評価法の１つを開発できるものと考えられ、その成果は広く社会へ貢献できる。

引用文献
1) Furue H, Narikawa K, Kumamoto E, Yoshimura M. J. Physiol-Lond. 521(pt2): 529-535, 1999
2) Furue H. In vivo patch-calmp recording technique. In: Patch Clamp Techniques: From Beginning to Advanced Protocols. Springer, pp.171-182, 2012
3) Kato G, Yasaka T, Katafuchi T, Furue H, Mizuo M, Iwamoto Y, Yoshimura M. J. Neurosci., 26(6):1787-1794, 2006
4) 古江秀昌,杉山大介,川真田樹人舟井優介. 下行性ノルアドレナリン痛覚抑制機構とその活動制御. 麻酔, 麻酔 61(増刊): S30-40, 2012

２．研究の目的

無髄Ｃ線維の多い霊長類における疼痛発現機構の詳細。特に齧歯類で報告されている脊髄 GABA 抑制性シナプスや下行性の抑制系に着目し、霊長類における抑制系の実態を明確にした。更に、霊長類の痛覚抑制系を制御する手法の確立にも挑戦した。

３．研究の方法

全身深麻酔下に循環系など全身状態を管理できる状態でマーモセットからの in vivo パッチクランプや細胞外記録を行った。吸入麻酔を用い人工呼吸下に置いて呼吸を管理し、心電図や動脈血溶存酸素濃度は経皮的にモニターした。脊髄痛覚伝達や GABA を介した脊髄抑制性シナプス応答を解析した。

霊長類の下行性痛覚抑制系を制御する系を起ち上げるため、まず、外来遺伝子であるチャネルロドプシンをウィルスを用いて齧歯類青斑核に導入した。留置した光ファイバーで青斑核を選択的に刺激・興奮させ、下行性抑制系賦活化による鎮痛やその他の作用を検討した。また、触刺激による脊髄抑制系の存在を確認するため、患部周辺に加えた触刺激による抑制の機構を解析した。

実験に際して動物愛護・生命倫理の観点に十分配慮し、感覚刺激法など動物に対する苦痛の軽減、及び、使用する動物数の軽減などに配慮した実験計画を策定して、大学共同利用機関法人自然科学研究機構動物実験規程や国立精神・神経医療研究センター神経研究所霊長類実験倫理指針に基づいて研究を遂行した。

４．研究成果

(1) 霊長類における脊髄痛覚回路の同定

生理的な痛み刺激によって誘起されるシナプス応答や神経応答を定量解析する in vivo パッチクランプ法や in vivo 細胞外記録法を確立し、痛みの伝達機構の詳細を明らかにした。全身深麻酔下にマーモセットを人工呼吸下に置いて呼吸を管理し、心電図や動脈血溶存酸素濃度を経皮的にモニターし、ホールセルモードで脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行った。その結果、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の記録に成功した。下肢皮膚へ生理的な感覚刺激を加え、誘起される応答を定量解すると、刺激に伴って、興奮性シナプス後電流の振幅や発生頻度が著明に増大し、刺激の間中その応答は持続した。この手法は、痛みの入り口である脊髄後角における神経応答を定量解析できたため、疼痛の程度や製剤による鎮痛作用の評価に有用であることが示された。

次いで、痛覚回路を同定するために、脊髄スライス標本を作製し、脊髄後角細胞からパッチクランプ記録を行った。電位固定下に脊髄後角細胞は自発性の興奮性シナプス後電流を発生した。カプサイシンを投与すると自発性興奮性シナプス後電流の発生頻度が著明に増大した。微小興奮性シナプス後電流でも同様の反応がみられ、組織化学的研究などからも、これらカプサイシン反応性の細胞は後角表層の多くの細胞で観察された。カプサイシン感受性Ｃ線維が密に投射するこれらの細胞が痛覚伝達を担うことが示されるなど、

霊長類においても脊髄痛覚伝達系の実態を明らかにした。

(2) チャネルロドプシンや触刺激による内因性痛覚抑制系の賦活化とその鎮痛効果

チャネルロドプシンを青斑核に発現させ行動解析を行った。まず齧歯類を用いて青斑核を光依存性に賦活化すると、逃避行動の閾値が上昇するのみならず、低下するケースが見受けられた。青斑核の賦活化は下行性に鎮痛作用を呈するが、一方で上行性に皮質の活動も高めて覚醒が高められるためと考えられた。これら齧歯類から得られた検討を元に霊長類への適用を慎重に検討した結果、この手法では純粋な鎮痛効果のみ発揮することは困難であると判断した。

そこで、もう一つの内因性の鎮痛作用として知られる、触刺激による鎮痛効果の解析を遂行した。In vivo 脊髄後角表層から記録を行い、全身深麻酔下に皮膚への機械的刺激に対する活動電位を記録した。機械的刺激の周囲に触刺激を加えると、活動電位は完全に抑制され、強い鎮痛効果が得られた。またその受容野は同側の広い領域に亘り、この触刺激による内因性の脊髄抑制系が霊長類においても強い鎮痛を発揮することが明確となった。

得られた成果や解析法は、新規治療法の開発鎮痛薬の薬効評価に極めて有用であり、また、高次脳機能解明に向けた研究にも大きく寄与できる。神経科学の基礎研究から臨床研究に至る今後の研究発展にも貢献できるなど、広く社会に還元できる。

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 Takayama Y、Uta D、<u>Furue H</u>、Tominaga M、Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons、Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA、査読有、112(16)、2015、5213-8、DOI: 10.1073/pnas.1421507112

② Yaguchi H、Takei T、Kowalski D、Suzuki T、Mabuchi K、<u>Seki K</u>、Modulation of spinal motor output by initial arm postures in anesthetized monkeys、Journal of Neuroscience、査読有、35(17)、2015、6937-45、DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3846-14.

③ 古賀啓祐、<u>古江秀昌</u>、髄節を越えた脊髄鎮痛回路の実態、ペインクリニック、査読無、36(5)、2015、585-91

④ 山田彬博、<u>古江秀昌</u>、神経障害性疼痛で生じる Cl⁻イオン濃度勾配は GABA で痛みが生じるほど大きな変化でしょうか、LiSA、査読無、22、2015、130-132

⑤ Puentes S、<u>Seki K</u>、Internal capsule stroke in the common marmoset、Neuroscience, 査読有、284、400-411、2015

⑥ <u>古江秀昌</u>、歌　大介、秋元　望、脊髄における侵害受容機構、ファインケミカル、査読無、43(1)、2014、17-21、http://ci.nii.ac.jp/ncid/AN00015672

⑦ <u>古江秀昌</u>、下行性制御機構：セロトニン系、 ノルアドレナリン系、日本医師会雑誌、査読無、14(特別号 1)、2014、42-43、https://www.med.or.jp/cme/jjma/

⑧ Hickey L、 Li Y、 Fyson S、 Watson T、 Perrins R、 Hewinson J、 Teschemacher A、 <u>Furue H</u>、 Lumb B、 Pickering AE、 Opto-activation of locus coeruleus neurons evokes bidirectional changes in thermal nociception in rats、Journal of Neuroscience、査読有、34(12) 、2014、4148-4160、DOI : 10.1523/JNEUROSCI.4835-13.2014

⑨ Nishida K、 Matsumura S、 Taniguchi W、 Uta D、 <u>Furue H</u>、Ito S、Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsahorn neurons analyzed by in vivo calcium imaging、PLoS One、査読有、9(8)、2014、e103321、DOI : 10.1371/journal.pone.0103321

⑩ Funai Y、 Pickering AE、 Uta D、 Nishikawa K、 Mori T、 Asada A、 Imoto K、<u>Furue H</u>.、Systemic dexmedetomidine augments inhibitory synaptic transmission in the superficial dorsal horn through activation of descending noradrenergic control: an in vivo patch-clamp analysis of analgesic mechanisms、Pain、査読有、155(3)、2013、617-628、DOI : 10.1016/j.pain.2013.12.018

⑪ <u>古江秀昌</u>、中枢性の痛覚抑制機構、Pain Clinic、査読無、34(8)、2013、1091-1099

⑫ Hakozaki A、Imoto K、Hayashi Y、Kawatani M、<u>Furue H</u>、In vivo patch-clamp analysis of visceral spinal sensory synaptic transmission and spinal control of lower urinary tract function、Pain Research、査読有、28(3)、2013 、155-165、

https://www.jstage.jst.go.jp/article/pain/28/3/28_2/_pdf

⑬ Funai Y、Nishikawa K、Mori T、Asada A、Imoto K、Furue H、Systemic alpha-2 agonist administration facilitates inhibitory synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn mediated through alpha-1 adorenoceptors、Pain Research、査読有、28(3)、2013、145-153、DOI: 10.1016/j.pain.2013.12.018

〔学会発表〕（計 41 件）

① Akimoto N、Hakozaki A、 Imoto K、Furue H 、In vivo analysis of afferent pathways to the spinal cord from the bladder and urethra、第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 23 日、神戸交際会議場・展示場（兵庫県神戸市）

② 古江秀昌、カプサイシン感受性（TRPV1 発現）求心性線維による in vivo 感覚シナプス伝達の調節機構、第 92 回日本生理学会大会、シンポジウム、2015 年 3 月 21 日、神戸交際会議場・展示場（兵庫県神戸市）

③ 古江秀昌、青斑核ノルアドレナリン神経による感覚シナプス伝達の調節、第 92 回日本生理学会大会、ランチョンセミナー（招待講演）、2015 年 3 月 21 日、神戸交際会議場・展示場（兵庫県神戸市）

④ Uta D、Imoto K、Furue H、Selective excitatory effect of TRPA1 agonists on synaptic transmission in superficial spinal dorsal horn neurons of the adult rat、The 88th Annual Meeting of the Japan Pharmacological Society、2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場（愛知県名古屋市）

⑤ Uta D、Andoh T、Kuraishi Y、 Imoto K、Furue H、Electrophysiological analysis of spinal dorsal horn neurons receiving pruriceptive afferents in the adult rat spinal cord、The 37th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、2014 年 9 月 12 日、パシフィコ横浜（神奈川県横浜市）

⑥ Akimoto N、Uta D、Honda K、Takano Y、Imoto K、Noda M、Furue H、Action of Chemokine (C-C motif) ligand 1 on synaptic transmission in the spinal superficial dorsal horn、2014NIPS-KU/YU Symposium、2014 年 7 月 1 日、Okazaki Conference Center (Aichi、 Japan)

⑦ Uta D、Imoto K、Furue H、Effects of TRPA1 and TRPV1 agonists on synaptic transmission evoked in morphologically distinct cell types in the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord (電気生理学的及び形態学的解析を用いたラット脊髄膠様質における TRPA1 及び TRPV1 作動薬の作用比較)、第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 21 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑧ 古江秀昌、下行性疼痛制御機構解明のためのマイルストーン研究、第 36 回日本疼痛学会（招待講演）、2014 年 6 月 20-21 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑨ 高山靖規、歌 大介、古江秀昌、富永真琴、末梢神経における TRV1 とアノクタミン１の相互作用による疼痛とその抑制、第 36 回日本疼痛学、2014 年 6 月 21 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑩ 舟井優介、井本敬二、古江秀昌、低用量デクスメデトミジンは逆説的にノルアドレナリン下行性抑制系を賦活化する、第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 21 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑪ 秋元 望、歌 大介、本多健治、高野行夫、井本敬二、野田百美、古江秀昌、脊髄後角シナプス伝達に対する CCL-1 の作用と疼痛発現機構、第 36 回日本疼痛学会 2014 年 6 月 20 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑫ 古賀啓祐、津田 誠、井上和秀、井本敬二、古江秀昌、ラット脊髄後角表層 GABA ニューロンへの興奮性シナプス入力に対する P2X3 受容体の役割、第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 20 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑬ Uta D、Imoto K、Furue H、Effects of TRPA1 and TRPV1 agonists on synaptic transmission evoked in morphologically distinct cell types in the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord、第 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 20 日、KKR ホテル大阪（大阪府大阪市）

⑭ 古江秀昌、生理学からみた内因性の鎮痛メカニズム、第６回信州 Opioid 研究会、特別講演（招待講演）、2014 年 6 月 7 日、信州大学医学部旭総合研究棟（長野県松本市）

⑮ 古江秀昌、歌 大介、痒みの脊髄シナプス伝達と下行性抑制機構、第 87 回日本薬理学会年会、シンポジウム、2014 年 3 月 19-21 日、東北大学百周年記念会館川内萩ホール仙台国際センター（宮城県仙台市）

⑯ Furue H 、Descending modulation of nociceptive synaptic transmission: *in vivo* electrophysiological (patch-clamp) and optogenetic approaches 、Korea Pain Research Consortium 2014, Special lecture （招待講演）、2014 年 2 月 20-23 日、RiCHEL HOTEL （Seoul、 Korea）

⑰ Furue H、Spinal GABAergic excitation by optogenetic activation of descending noradrenergic system 、5th Asian Pain Symposium(招待講演)、2013 年 12 月 18-20 日、Okazaki Conference Center（Okazaki、Japan）

⑱ 古江秀昌、生理学からみた鎮痛・発痛メカニズム、第６回日本運動器疼痛学会(ランチョンセミナー)(招待講演)、2013 年 12 月 7-8 日、神戸国際会議場（兵庫県神戸市）

⑲ Furue H、Imoto K、Endogeneous control of pain transmission、1st CU-NIPS Symposium (招待講演)、2013 年 10 月 21-22 日、Chulalongkorn University (Bangkoh 、Thailand）

⑳ Furue H、Koga K、Imoto K、In vivo spinal inhibitory synaptic responses evoked by optoactivation of descending noxious inhibitory system、The 11th Korea-Japan Joint Symposium of Brain Sciences、 and Cardiac and Smooth Muscle Sciences (シンポジウム)、 2013 年 9 月 5 日、Act City Congress Center（Hamamatsu,Shizuoka）

〔その他〕
ホームページ等
http://www.nips.ac.jp/huinfo/

６．研究組織
(1)研究代表者
古江　秀昌（Furue, Hidemasa）
生理学研究所・生態情報研究系・准教授
研究者番号：20304884

(2)研究分担者
関　和彦（Seki, Kazuhiko）
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・部長
研究者番号：00226630

(3)研究協力者
井本　敬二（Imoto, Keiji）
生理学研究所・所長
研究者番号：00176512