

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 1 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293132

研究課題名(和文) 覚醒・意識レベルと疼痛の中枢関連機構の解明

研究課題名(英文) Central neuronal mechanisms for descending antinociception and arousal states in the brain

研究代表者

古江 秀昌 (FURUE, Hidemasa)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・准教授(兼任)

研究者番号：20304884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：意識と痛みの双方の調節に重要な役割を果たす青斑核に着目し、意識・覚醒レベルの脳機能と痛みの調節機構との中枢性の関連を明らかにする基盤研究を遂行することを研究目的とした。ウイルスベクターを用い、光遺伝学的(オプトジェネティック)に青斑核を選択的に賦活化し、in vivoパッチクランプ法などを用いて意識・覚醒や鎮痛の中枢機構を解析した。行動解析や組織化学的解析を併せて遂行し、関与する受容体や神経回路を同定する統合的研究を行った。

研究成果の概要(英文)：We have studied how noradrenergic neurons in the locus coeruleus in the brain stem act on descending antinociception and arousal levels in the brain. We used virus vectors to control noradrenergic neuronal activity by using optogenetic tools. Locus coeruleus neurons were successfully activated by optic stimulation and how the locus coeruleus activation changes nociceptive behaviors and arousal levels was examined. In vivo electrophysiological analysis was also studied, and the descending and ascending neuronal circuits were identified with immunohistochemical methods.

研究分野：生理学

キーワード：覚醒 鎮静 鎮痛 青斑核 チャンネルロドプシン

1. 研究開始当初の背景

生体は、生命が脅かされるなど特殊な状況において一時的に痛みを抑制し、闘争や逃避を可能にする防御システムを備えていることが広く知られている。戦場での負傷兵士の多くがまったく痛みを訴えない場合などがその例である。この系は大脳皮質、中脳中部などを介し、最終的に脳幹青斑核や縫線核から下行する線維によって、脊髄後角にて痛みの伝達が抑制される。一方で意識・覚醒レベルは、闘争や逃避のため逆に高まる。この系では脳幹毛様体系などが関与し、特に青斑核の大脳皮質など広範な上行性の投射により大脳皮質など脳全体の活動が高まると考えられてきた。このように最終的に青斑核などを起点に痛みと意識に対し異なるベクトルで作動する脳機能は、ヒトや動物に普遍的にみられる極めて重要な生体防衛システムであるにも拘わらず、疼痛分野ではこの意識・覚醒の機構はあまり着目されておらず、特に、痛みの抑制系との連関機構やその作動原理の詳細は未だ不明であった。

青斑核などを介した意識・覚醒や痛覚抑制機構の研究は主に、脳画像解析や特定の分子欠損動物を用いた行動薬理学的解析により進められてきた。しかし、生体の一部の神経核の活動を人為的にコントロールし、意識や覚醒レベルを維持することは難しく、更に、痛みの抑制と意識・覚醒との関連を同時に解析することは困難であった。また、それぞれの中核機構や作動原理の詳細はスライスパッチクランプ法により明らかにされてきたが、脳切片では上行や下行性の経路が保存されない為、観察された現象が実際の覚醒や痛みにもどの程度寄与するかを明確にすることは極めて難しかった。この問題を補うために、研究代表者は世界に先駆けて脊髄や大脳皮質に加え、青斑核からの *in vivo* パッチクランプ法を開発した。この手法は生理的条件下に青斑核の活動を捉え、その作動原理をシナプスレベルで詳細に解析できる手法である。更に、レンチウイルスベクターを用い、青斑核特異的プロモーター下に外来のイオンチャンネル(チャンネルロドプシン)を発現させ、青斑核の活動を光依存性に制御する手法(オプトジェネティクス)を確立したが、これらの手法を用い、青斑核など特定の神経核の活動を制御し、痛みの抑制と意識の連関を *in vivo* シナプスレベルで明確にする研究は国内外に見当たらなかった。

2. 研究の目的

意識と痛みの双方の調節に重要な役割を果たす青斑核に着目し、意識・覚醒レベルの脳機能と痛みの調節機構との中枢性の連関を明らかにする基盤研究を遂行することを

研究目的とした。ウイルスベクターを用い、光遺伝学的(オプトジェネティック)に青斑核を選択的に賦活化し、*in vivo* パッチクランプ法などを用いて意識・覚醒や鎮痛の中核機構を解析した。行動解析や組織化学的解析を併せて遂行し、関与する受容体や神経回路を同定する統合的研究を行った。

3. 研究の方法

オプトジェネティックに青斑核の活動を制御するため、ChR2(チャンネルロドプシン)、mCherry などの蛍光タンパク質を組み込んだレンチウイルスベクターを青斑核に導入した動物を作出した。この動物の覚醒下における意識・覚醒レベルや痛覚抑制能を行動解析などにより解析した。次いで、麻酔下で青斑核や脊髄から *in vivo* パッチクランプ記録や細胞外記録を行い、ノルアドレナリン神経の作動原理や抑制効果を単一ニューロン・シナプスレベルで解析した。発現する傾向タンパク質を増感し、青斑核ニューロンやその軸索の投射様式や両側性を免疫組織化学的に調べた。脊髄における抑制機能の更なる解析や抑制を担う GABA ニューロンの同定は *in situ* ハイブリダイゼーション法などを用いた。意識・覚醒レベルの解析は大脳皮質の活動を指標に解析を行った。

4. 研究成果

(1) 青斑核ニューロンの賦活化法とその賦活化が個体に与える影響の解析

ノルアドレナリンの合成酵素のプロモーター下にチャンネルロドプシンや蛍光タンパク質を組み込んだウイルスベクターを作製し、青斑核ニューロンにチャンネルロドプシンを発現させた。光ファイバーを留置して青斑核を光刺激すると、脳幹スライスにおいて青斑核に位置する大型のニューロンは光依存性にその活動が高まった。また、*in vivo* では、自発性発火の頻度や感覚刺激に対する応答特性から青斑核ニューロンを同定し、光による活動電位の発生頻度を増加させ、賦活化されることが確認できた。また、光刺激の間中青斑核ニューロンの賦活化は持続した。一方、*in vivo* の青斑核ニューロンは吸入麻酔を加えるとその発火頻度が麻酔深度に依存して完全に抑制され、鎮静作用がみられた。この状態で光刺激を行うと青斑核ニューロンは活動電位を発生した。次いで行動を観察すると、青斑核の賦活化により覚醒が高まる一方で、逃避の行動解析から鎮痛効果が現れた。

(2) 青斑核ニューロンの両側性投射

ウイルスベクターによるチャンネルロドプシンの発現が青斑核ニューロンに選択的であ

るか免疫組織化学的手法により確認した。ノルアドレナリン合成酵素であるチロシンヒドロキシラーやドパミン水酸化酵素と共染色を行うと、チャンネルロドプシン(蛍光タンパク質)を発現する細胞は青斑核ニューロンとよく一致した。また、その投射は下行性に脊髄後角表層に下行すること、ウィルスベクターにより一側の青斑核に蛍光タンパクを発現したニューロン群は両側の脊髄に軸索を投与したことを観察するなど、鎮痛を担う青斑核ニューロンの両側性の神経網の同定を行った。

(3)脊髄痛覚抑制を担う神経回路の同定

これまで研究代表者は脊髄痛覚抑制にはGABAニューロンが関与することを明らかにしてきた。免疫染色やin situハイブリダイゼーションからこれらのGABAニューロンには1受容体が発現し、また、遺伝子操作動物を用いた電気生理学的解析から脊髄GABAニューロンはその活動がノルアドレナリンにより亢進することが確認できるなど、痛覚抑制の基盤となる神経回路の同定を行った。

(4)意識・覚醒との関連解析

光遺伝学的あるいは電気刺激によって青斑核ニューロンを賦活化させると、下行性の脊髄における抑制作用とは対照的に、大脳皮質などでは神経活動が亢進した。これらの神経は電気生理学的解析から錐体細胞と推定され、青斑核の活動後長時間にわたり活動の亢進することが明らかになるなど、大脳皮質の活動との関連が明らかになった。

(5)慢性疼痛を発症するモデル動物におけるノルアドレナリン鎮痛作用

触刺激や温度刺激により逃避行動を呈する神経障害性モデル動物を作製した。これらのモデルでは触刺激や温度刺激など非侵害性の刺激に対する逃避行動の閾値が正常に比べて低下する異痛症が観察された。このモデルに対するノルアドレナリン神経を介した効果に可塑的变化が見られ、特に痛みの抑制作用に変化が生じた。モデル動物では脊髄における非侵害性の刺激に対する活動電位の発火が異常に持続した。この持続性の応答に対し、ノルアドレナリンは抑制作用を示し、その鎮痛効果は1や2受容体を介し、受容体は介さなかった。一方、正常では2受容体を介した抑制効果が高かった。行動薬理的解析においてもモデル動物で同様に1や2受容体を介した抑制作用が観察された。これらの結果は、異痛症など非侵害性刺激に対する下行性抑制系に可塑的变化が生じることを示している。特に1受容体を介した作用は青斑核ニューロンの賦活化

に伴って脊髄GABAニューロンが賦活化されることから、異痛症などの慢性疼痛の鎮痛には1受容体を介した下行性抑制系の増強が重要であることが示唆された。

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)

御領憲治, 古江秀昌. 脳幹における痛みの抑制と慢性疼痛発現の機構、医学のあゆみ 260(2):144-148, 2017 (査読無)

Erami E, Azhdari-Zarmehri H, Imoto K, Furue H. Characterization of Nociceptive Behaviors Induced by Formalin in the Glabrous and Hairy Skin of Rats. *Basic Clin Neurosci* 8(1):37-42, 2017. (査読有) doi: 10.15412/J.BCN.03080105

Takayama Y, Furue H, Tominaga M. 4-isopropylcyclohexanol has potential analgesic effects through the inhibition of anoctamin 1, TRPV1 and TRPA1 channel activities. *Sci Rep.* 7:43132. 2017 (査読有) doi: 10.1038/srep43132.

Choi S, Yamada A, Kim W, Kim SK, Furue H. Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments. *J Physiol Sci.* May;67(3):431-438. 2017 (査読有) doi: 10.1007/s12576-016-0505-9.

Katano T, Fukuda M, Furue H, Yamazaki M, Abe M, Watanabe M, Nishida K, Yao I, Yamada A, Hata Y, Okumura N, Nakazawa T, Yamamoto T, Sakimura K, Takao T, Ito S. Involvement of Brain-Enriched Guanylate Kinase-Associated Protein (BEGAIN) in Chronic Pain after Peripheral Nerve Injury. *eNeuro.*3(5). 2016 (査読有) doi:10.1523/ENEURO.0110-16.2016

Kozuka Y, Kawamata M, Furue H, Ishida T, Tanaka S, Namiki A, Yamakage M. Changes in synaptic transmission of substantia gelatinosa neurons after spinal cord hemisection revealed by analysis using in vivo patch-clamp recording. *Mol Pain.*2016 (査読有) doi:10.1177/1744806916665827.

Kurabe M, Furue H, Kohno T. Intravenous administration of lidocaine directly acts on spinal dorsal horn and produces analgesic effect: An in vivo patch-clamp analysis. *Sci Rep.* 18;6:26253. 2016 (査読有) doi: 10.1038/srep26253.

Naitou K, Nakamori H, Shiina T, Ikeda A, Nozue Y, Sano Y, Yokoyama T, Yamamoto Y, Yamada A, Akimoto N, Furue H, Shimizu Y. Stimulation of dopamine D2-like receptors in the lumbosacral defaecation centre causes

propulsive colorectal contractions in rats. *J Physiol.* 594(15):4339-50. 2016 (査読有)
doi: 10.1113/JP272073. Epub 2016 Apr 28.
Tonomura S, Ebara S, Bagdasarian K, Uta D, Ahissar E, Meir I, Lampl I, Kuroda D, Furuta T, Furue H, Kumamoto K. Errata to "Structure-function correlations of rat trigeminal primary neurons: Emphasis on club-like endings, a vibrissal mechanoreceptor". *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*;92(2):76. 2016 (査読有)
doi:10.2183/pjab.92.76.

Tonomura S, Ebara S, Bagdasarian K, Uta D, Ahissar E, Meir I, Lampl I, Kuroda D, Furuta T, Furue H, Kumamoto K. Structure-function correlations of rat trigeminal primary neurons: Emphasis on club-like endings, a vibrissal mechanoreceptor. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.*;91(10):560-76. 2015 (査読有)
doi: 10.2183/pjab.91.560.

Takayama Y, Uta D, Furue H and Tominaga M. Pain-enhancing mechanism through interaction between TRPV1 and anoctamin 1 in sensory neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*(IF 10.3) 112(16): 5213-5218, 2015 (査読有)
doi:10.1073/pnas.1421507112

山田彬博, 古江秀昌. 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* 22: 130-132, 2015 (査読無)

Nishida K, Matsumura S, Taniguchi W, Uta D, Furue H and Ito S. Three-dimensional distribution of sensory stimulation-evoked neuronal activity of spinal dorsal horn neurons analyzed by in vivo calcium imaging. *PLoS One*(IF 3.5) 9(8): e103321, 2014 (査読有)

doi: 10.1371/journal.pone.0103321.

[学会発表](計 27 件)

山田彬博, 大澤匡弘, 桑和彦, 井本敬二, 古江秀昌. 覚醒下前帯状回皮質感応答の In vivo 解析. 第 94 回日本生理学会大会, 2017.3.30, アクトシティ浜松 (静岡県浜松市)

古江秀昌. ノルアドレナリン神経による上行性および下行性の痛覚調節機. 第 90 回日本薬理学会年会, 招待講演, 2017.3.17, 長崎ブリックホール (長崎県長崎市)

N. Akimoto, A. Hakozaki, M. Kawatani, K. Imoto, M. Kawatani, H. Furue. Spinal Nociceptive Transmission from the Lower Urinary Tract. *International Association for the Study of Pain (IASP)* 2016.9.26 - 30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

A. Yamada, M. Ohsawa, K. Kume, K. Imoto, H. Furue. Effects of ethanol on GABAergic synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn. *International Association for the Study of Pain (IASP)* 2016.9.26 - 30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

S. Choi, S. Kim, S. Oh, H. Furue. Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: Electrophysiological and behavioral assessments. *International Association for the Study of Pain (IASP)* 2016.9.26 - 30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

D. Uta, M. Yoshimura, R. Kawatsu, K. Imoto, H. Furue. Electrophysiological analysis of local anesthetic actions on nociceptive synaptic transmission in the adult rat spinal cord. *International Association for the Study of Pain (IASP)* 2016.9.26 - 30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

H. Furue, L. Hickey, Y. Li, A. Pickering, K. Imoto. Spinal GABAergic Synaptic Responses Elicited by Optogenetic Activation of Descending Noradrenergic System. *International Association for the Study of Pain (IASP)* 2016.9.26 - 30, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

山田彬博, 大澤匡弘, 桑和彦, 井本敬二, 古江秀昌. In vivo 細胞外記録およびパッチクランプ法を用いた前帯状回皮質感応答の解析. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.23, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

秋元望, 箱崎敦志, 河谷正仁, 井本敬二, 古江秀昌. 下部尿路カプサイシン刺激に対する in vivo 髄後角痛覚感応答. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.23, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

古江秀昌. 顔面領域刺激による青斑核ノルアドレナリンニューロンの賦活化と痛み伝達の調節. 第 93 回日本生理学会大会, 企画シンポジウム, 2016.3.24, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

高山靖規, 秋元望, 古江秀昌, 富永真琴. ANO1 阻害剤の検討とその TRPV1 関連疼痛に対する効果. 第 93 回日本生理学会大会, 2016.3.24, 札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

古江秀昌. 脊髄ノルアドレリンネットワーク人為的操作と鎮痛機構の解析. 第 89 回日本薬理学会, 特別講演, 2016.3.10, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

歌大介, 井本敬二, 古江秀昌. 成熟ラット脊髄膠様質における TRPA1 及び

TRPV1 作動薬の作用比較-電気生理学的及び形態学的解析を用いて-. 第 37 回脊髄機能診断研究会 (旧 脊髄電気診断研究会), 2016.2.6, イイノホール&カンファレンスセンター (東京都千代田区)

Furue H. Descending pain modulatory system and its activation by systemic alpha 2 agonist. 12th World congress of Veterinary Anaesthesiology, Symposium, 2015.9.1, Kyoto International Conference Center ICC Kyoto (京都府京都市)

歌大介, 井本敬二, 古江秀昌. ラット脊髄における TRPA1 発現線維からの入力を受ける膠様質細胞の発火パターンについて - in vitro 及び in vivo パッチクランプ解析を用いて -. 第 37 回日本疼痛学会, 2015.7.4, 市民会館崇城大学ホール (熊本県熊本市)

秋元望, 箱崎敦志, 河谷正仁, 井本敬二, 古江秀昌. 下部尿路から脊髄に入力する痛覚伝達機構の in vivo 解析. 第 37 回日本疼痛学会, 2015.7.4, 市民会館崇城大学ホール (熊本県熊本市)

山田彬博, 大澤匡弘, 桑和彦, 井本敬二, 古江秀昌. 脊髄後角シナプス伝達に対するエタノールの作用. 第 37 回日本疼痛学会, 2015.7.4, 市民会館崇城大学ホール (熊本県熊本市)

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, 2015.3.21, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)

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, 2015.3.21, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)

秋元 望, 箱崎 敦志, 井本 敬二, 古江 秀昌. In vivo 解析を用いた脊髄内臓感覚伝達の解明第 92 回日本生理学会大会, 2015.3.23, 神戸国際会議場・展示場 (兵庫県神戸市)

- ⑳ Uta D, Imoto K and 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, 2015.3.20, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

- ㉑ 古江秀昌. 痛みシグナルの揺らぎと、その中枢性制御機構. 自然科学研究機構「脳神経情報の階層的研究, 機能生命科

学における揺らぎと決定」合同シンポジウム. 2015.3.11, 岡崎カンファレンスセンター (愛知県岡崎市)

- ㉒ 歌大介, 吉村恵, 井本敬二, 古江秀昌. 成熟ラット脊髄後角膠様質ニューロンへの後根刺激誘起のシナプス伝達に対する TRPA1 作動薬の応答. 第 36 回脊髄機能診断研究会. 2015.2.7, イイノホール&カンファレンスセンター (東京都千代田区)

- ㉓ Uta D, Andoh T, Kuraishi Y, Imoto K and 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, 2014.9.12, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

- ㉔ Furue H. Mechanism for spinal antinociceptive action of descending noradrenergic neuron in the locus coeruleus. 第 36 回日本疼痛学会, シンポジウム, 2014.6.20, KKR ホテル大阪 (大阪府大阪市)

- ㉕ 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, 2014.6.20, KKR ホテル大阪 (大阪府大阪市)

- ㉖ 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, 教育講演, 2014.6.7, 信州大学 (長野県松本市)

【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・基盤神経科学研究領域
准教授 (兼任)
研究者番号: 20304884

(2) 研究分担者

神野 尚三 (JINNO, Shozo)
九州大学・医学研究院・教授
研究者番号: 10325524

深澤 有吾 (FUKAZAWA, Yugo)
福井大学・医学部・教授
研究者番号: 60343745

(3)連携研究者

井本 敬二 (IMOTO, Keiji)

生理学研究所・ 所長

研究者番号 : 00176512