

令和 2 年 7 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11454

研究課題名(和文) 運動野からのトップダウン的痛覚抑制機序の解明：三叉神経痛の治療法開発へ向けて

研究課題名(英文) Topdown signaling from the motor cortex for pain inhibition

研究代表者

倉本 恵梨子 (KURAMOTO, Eriko)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：60467470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：三叉神経痛の治療法として、大脳皮質運動野の電気刺激が行われている。運動野の電気刺激で、痛覚抑制が生じるメカニズムについて、解剖学的、行動学的に明らかにすることを目指した。ウイルスベクターによるトレーシング実験により、運動野からの投射軸索が、感覚野と帯状野、前頭眼野に多く分布し、中脳水道周囲灰白質にはあまり分布しないことが分かった。そのため、運動野 帯状野 中脳水道周囲灰白質 青斑核という経路が痛覚抑制機能を発揮していることが示唆された。また、前頭眼野は痛覚抑制に関連のある視床の内側下核に強く投射しているため、運動野 前頭眼野 内側下核という経路も、痛覚抑制に作用している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

三叉神経痛の中には、薬物や外科的療法により治療できない症例が少なからず存在する。こうした難治性の三叉神経痛の治療法として、大脳皮質 運動野の電気刺激療法がおこなわれて、一定の治療効果が得られている。しかしながら、運動野を刺激することで、なぜ、痛覚抑制の効果が得られるのか、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。このメカニズムの詳細を明らかにすることができれば、より効果的な治療方法への改善や、より効果的で侵襲性の低い治療法の開発の糸口にすることが可能である。三叉神経痛だけでなく、難治性の神経陰性疼痛の治療へ、広く適応できる可能性が高く、社会的意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：As a treatment for trigeminal neuralgia, it is recently reported that electrical stimulation of the motor cortical area is effective. We aimed to elucidate anatomically and behaviorally the mechanism of pain suppression by electrical stimulation of the motor cortex. Tracing experiments with viral vectors revealed that axons from the motor cortex were mostly distributed in the sensory, cingulate, and orbitofrontal cortices, but not in the periaqueductal gray. Therefore, it was suggested that the pathway of motor cortex cingulate cortex periaqueductal gray locus coeruleus exerts a pain suppressive function. In addition, since the orbitofrontal cortical area strongly projects to the submedial thalamic nucleus, which is related to pain suppression, it is suggested that the pathway of motor area orbitofrontal area submedial thalamic nucleus may also have an effect on pain suppression.

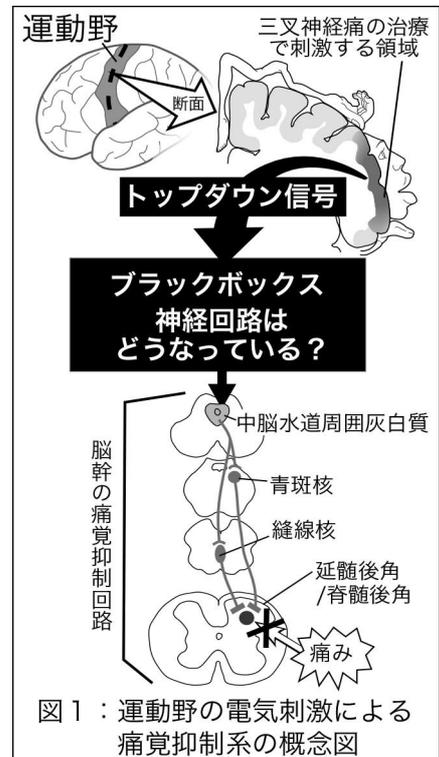
研究分野：神経解剖学

キーワード：三叉神経痛 大脳皮質 運動野 帯状野 中脳水道周囲灰白質 前頭眼野 視床 内側下核

## 1. 研究開始当初の背景

臨床現場において、難治性の神経性慢性疼痛、その中でも特に三叉神経痛の治療のために、頭頸部領域に相当する大脳皮質 運動野への電気刺激が行われている (図1)。頭頸部を支配する運動野は広い面積を占めるため刺激しやすく、治療成績がよいこともあり、三叉神経痛の治療法として近年急速に普及しつつある。しかし一部の症例では長期間の電気刺激により鎮痛効果の減弱が生じることや、さらには鎮痛効果が得られない症例が少なからず存在するなど問題もある。これらの問題を解決し、より効果的な治療法を開発するためには、運動野からのトップダウン的疼痛抑制の基盤となる神経回路と作用機序を理解し、論理的に戦略を立てる必要がある。

ヒトで運動野電気刺激による痛覚抑制時に活動性が上昇する脳領域として、大脳皮質の帯状野と眼窩野、視床、中脳水道周囲灰白質、脳幹などが報告されている。また運動野電気刺激の動物モデルにおいても同様の脳領域が活動することが報告されている。しかし、これらの領域と運動野がどのような神経回路を形成し、どの回路が実際に鎮痛効果をもたらすのか、ほとんどわかっていない。



## 2. 研究の目的

本研究課題では、運動野からのトップダウン信号が、脳幹に存在する痛覚抑制の回路を賦活化することで鎮痛効果を発揮しているという仮説を立て、この詳細な神経回路と、その作動原理を明らかにする。すなわち、図1で、“ブラックボックス”となっている神経回路と、その作動原理を明らかにすることを目的とした。

本研究は以下の2点の解明を目指して行った。

### (1) 運動野からのトップダウン信号が伝達される神経回路の解剖学的解明

運動野からのトップダウン信号が中脳以下の痛覚抑制回路へ伝達される神経回路として、以下の2つの回路を想定した。これらの回路が実在するかどうか、形態学的に解析する。

間接的経路: 運動野 前頭前野 (眼窩野または帯状回) 中脳水道周囲灰白質

直接的経路: 運動野 中脳水道周囲灰白質

### (2) どの神経回路が痛覚抑制に働くのか、光遺伝学と行動実験・電気生理学実験により検証する

上記の解剖学的運動野から脳幹へと至る神経回路の候補のうち、どの回路が痛覚抑制の効果をもたらすのか、*in vivo* の行動実験により検証する。眼窩下神経の結紮により、三叉神経痛のモデル動物を作製し、さらに、この動物にウイルスベクターを用いて光遺伝学を導入して、トップダウン痛覚抑制の候補となる神経回路を特異的に賦活または抑制する。そして、神経回路を賦活または抑制したときに、動物の三叉神経痛に対する反応がどのように変化するか、行動解析を行う。神経活動を賦活したときに痛覚に対する反応が抑制され、逆に抑制したときに痛み反応が増強する神経回路を明らかにする。

### 3. 研究の方法

運動野からのトップダウン信号が伝達される神経回路の解剖学的解明のために、蛍光タンパク質を発現する、アデノ随伴ウイルスベクターまたはシンドビスウイルスを、大脳皮質 運動野に注入した。アデノ随伴ウイルスベクターは、細胞毒性が非常に低く、長期間の安定した遺伝子導入・発現が可能である。シンドビスウイルスベクターは、導入遺伝子の発現効率が非常に高く、単一細胞レベルでの形態解析に適している。アデノ随伴ウイルスベクター注入後2週間、シンドビスウイルス注入後2日間経過したのち、動物の脳を採取し、蛍光タンパク質陽性細胞を蛍光顕微鏡下で観察した。また、軸索の投射先の解析のため、蛍光タンパク質に対する免疫組織化学染色を行い、シグナルを増強して明視野顕微鏡下で観察した。

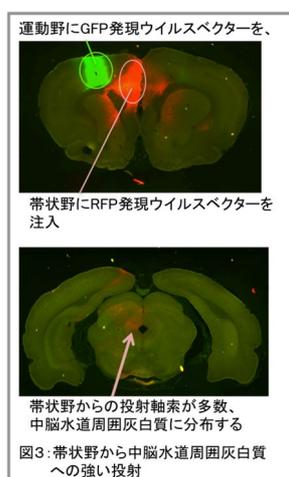
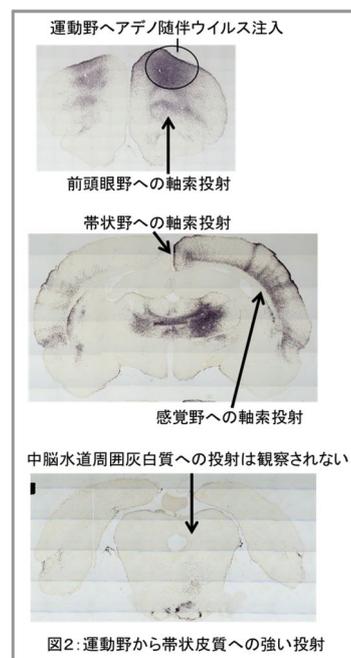
ウイルスベクターを用いた形態学的解析により、運動野から帯状野と眼窩前頭皮質への軸索投射が、多く存在することが明らかになった。そのため、眼窩前頭皮質へ入力しており、痛覚抑制にも関連のある、視床の内側下核ニューロンについても、ウイルスベクターを用いて、形態学的な解析を行った。

形態学的に明らかになった、運動野を中心とした痛覚抑制に関わる神経回路について、その機能を検証するため、三叉神経痛モデルマウスを作製し、そのマウスについて光遺伝学によるニューロン活動のコントロールを行い、さらに行動解析と脳波記録を同時に行うことで、痛覚に対する反応性の評価を試みた。

### 4. 研究成果

(1) 蛍光タンパク質発現アデノ随伴ウイルスベクターを用いた、大脳皮質運動野の軸索投射先の形態学的解析

ラットおよびマウスの大脳皮質 運動野にアデノ随伴ウイルスを注入した結果、中脳水道周囲灰白質へは、あまり軸索投射しないことがわかった(図2)。そのため、運動野から、別の脳領域を介して、間接的に中脳水道周囲灰白質へ入力する可能性が高いと考えた。大脳皮質では、運動野からの投射軸索が、感覚野と帯状野、前頭眼野へ多く分布していた(図2)。感覚野を電気刺激しても、痛覚抑制効果はほとんど得られないと言われているため、運動野から感覚野への神経回路が痛覚抑制に関係しているとは考え難い。そこで次に、帯状野と前頭眼野にウイルスレーザーを注入し、中脳水道周囲灰白質へと軸索投射していないかどうか調べた。その結果、帯状野



が強く、中脳水道周囲灰白質へと軸索投射していることが明らかになった(図3)。一方で、前頭眼野から中脳水道周囲灰白質への軸索投射は観察されなかった。これらの結果は、逆行性トレーサーの中脳水道周囲灰白質への注入実験でも再現された。以上の結果から、間接的経路である、大脳皮質 運動野 帯状野 中脳水道周囲灰白質 青斑核から脊髄後角 / 三叉神経脊髄路核へノルアドレナリン放出、という経路が、痛覚抑制機能を発揮していることが示唆された。運動野から帯状野への投射軸索は、ほとんどが皮質1層に分布していた(図2)。皮質1層には、5層錐体ニューロンの先端樹状突起が多く存在しているため、運動野からの投射軸索は、帯状野の5層錐体ニューロン

に入力する可能性が高い。一般的に5層の錐体ニューロンは、皮質下へ投射するといわれている。そのため、皮質運動野からの投射軸索は、帯状野から中脳水道周囲灰白質へ投射する5層の錐体ニューロンを効率良く活性化する可能性がある。

一方で、運動野から前頭眼野への投射軸索は、6層に多く分布していた。6層には、皮質-皮質投射錐体ニューロンと皮質-視床投射錐体ニューロンが存在する。前頭眼野は、視床の内側下核と相互結合していることが知られている。内側下核が活性化すると、痛覚抑制の効果が得られるとの報告があるため、内側下核の神経回路を形態学的に詳しく調べた。

内側下核(Sm)は、三叉神経脊髄路核または脊髄後角の侵害受容ニューロンから、直接的に痛覚入力を受ける背側部と、入力を受けない腹側部という機能的に異なる2つの領域に分けられる。三叉神経脊髄路核または脊髄後角の痛覚ニューロンからの軸索終末は内側下核の背側部に選択的に分布し、VGlut2(小胞性グルタミン酸輸送体2)陽性であることを利用して、形態学的に内側下核を2つの領域に分類した(図4)。これらの2つの領域のニューロンの軸索投射について、シンドビスウイルスを用いて単一細胞レベルで形態学的に解析した結果、内側下核の背側部ニューロンは大腦皮質の前頭前野の一部、眼窩野腹外側部(VLO)に限局して軸索投射すること(図5)。内側下核の腹側部ニューロンはむしろ、眼窩野腹外側部を避けるようにして、その周囲に軸索投射し、そして離れた2か所に軸索bushを形成すること(図6)が明らかになった(Kuramoto et al., 2017)。この特異的な神経回路が、痛覚抑制の作用をどのようなメカニズムで発現するのかについては、さらなる解析が必要である。

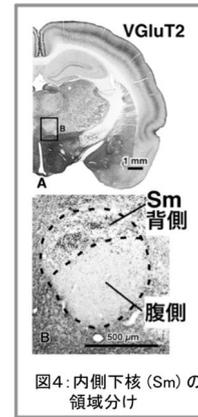


図4: 内側下核 (Sm) の領域分け

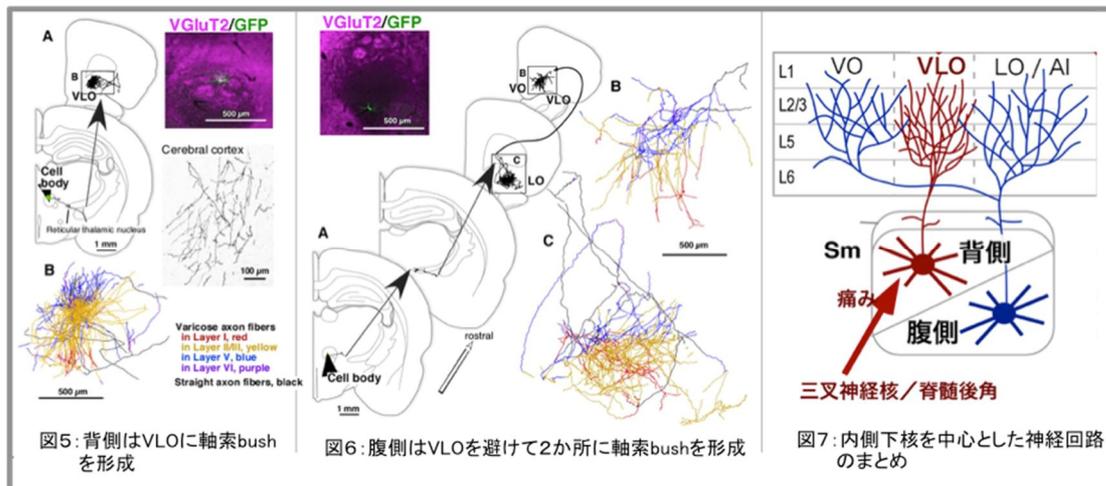


図5: 背側はVLOに軸索bushを形成

図6: 腹側はVLOを避けて2か所に軸索bushを形成

図7: 内側下核を中心とした神経回路のまとめ

## (2) 光遺伝学と行動実験・電気生理学実験により、痛覚抑制に働く神経回路を探索する

光遺伝学と、行動実験・電気生理学実験を同時に行うためには、高度な実験技術を必要とする。この技術を習得するために、本研究を一年間中断し、ハンガリーの研究所 Institute of Experimental Medicine Hungarian Academy of Sciences, Thalamus Laboratory に滞在し、客員研究者として共同研究を行った。共同研究を通して、光遺伝学と、行動実験・電気生理学実験を融合した実験システムの構築法を習得することができ、研究代表者が所属する研究室において、同様の実験系を立ち上げることができた。今後は、このシステムを用いて、形態学的に解明した痛覚抑制関連の神経回路を光遺伝学により操作し、行動や脳波がどのように変化するかを測定することで、その神経回路の機能を解明していく。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Eriko Kuramoto	4. 巻 100
2. 論文標題 Method for Labeling and Reconstruction of Single Neurons Using Sindbis Virus Vectors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Chemical Neuroanatomy	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.05.002">https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2019.05.002</a>	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 Kawasaki Y, Saito M, Won J, Bae JY, Sato H, Toyoda H, Kuramoto E, Kogo M, Tanaka T, Kaneko T, Oh SB, Bae YC, Kang Y.	4. 巻 12
2. 論文標題 Inhibition of GluR Current in Microvilli of Sensory Neurons via Na+-Microdomain Coupling Among GluR, HCN Channel, and Na+/K+ Pump.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Cell Neurosci.	6. 最初と最後の頁 113
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncel.2018.00113. eCollection 2018.	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 該当する
1. 著者名 Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Seki H, Tanaka YR, Furuta T, Hioki H, Goto T	4. 巻 525
2. 論文標題 Dorsal and ventral parts of thalamic nucleus submedialis project to different areas of rat orbitofrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 3821-3839
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1002/cne.24306.	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 Morita-Isogai Y, Sato H, Saito M, Kuramoto E, Yin DX, Kaneko T, Yamashiro T, Takada K, Oh SB, Toyoda H, Kang Y	4. 巻 222
2. 論文標題 A distinct functional distribution of and motoneurons in the rat trigeminal motor nucleus.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 3231-3239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.1007/s00429-017-1400-8	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 Tetsuya Goto, Eriko Kuramoto, Ashis Dhar, Rachel P-H. Wang, Haruka Seki, Haruki Iwai, Atsushi Yamanaka, Shin-Ei Matsumoto, Hiromitsu Hara, Makoto Michikawa, Yasumasa Ohyagi, Wai K. Leung and Raymond C-C.	4. 巻 -
2. 論文標題 Neurodegeneration of trigeminal mesencephalic neurons by the tooth loss triggers the progression of Alzheimer's disease in 3xTg-AD model mice.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Alzheimer's Disease	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Kuramoto E, Hioki H, Tanaka YR, Iwai H, Yamanaka A, Goto T, Kaneko T
2. 発表標題 Local connections of excitatory neurons to parvalbumin-containing interneurons in motor-associated cortical areas of mice
3. 学会等名 FENS regional meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuramoto E
2. 発表標題 Local connections of excitatory neurons to parvalbumin-containing interneurons in motor-associated cortical areas of mice
3. 学会等名 Gordon Research Conference "Thalamocortical interaction" (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 倉本恵梨子
2. 発表標題 視床-前頭皮質投射の神経回路：ウイルスベクターを用いた単一細胞標識法による研究
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会全国学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 倉本恵梨子、岩井治樹、山中淳之、大野幸、千堂良造、小柳宏太郎、豊留宗一郎、古田貴寛、日置寛之、後藤哲哉
2. 発表標題 Dorsal and ventral part of the rat thalamic submedial nucleus provide two independent inputs to different areas of orbital cortex
3. 学会等名 第122回日本解剖学会総会全国学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 E. KURAMOTO, H. IWAI, A. YAMANAKA, S. OHNO, T. FURUTA, H. HIOKI, T. GOTO
2. 発表標題 Dorsal and ventral parts of the thalamic nucleus submedius provide two independent inputs to different areas of the rat orbitofrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors
3. 学会等名 46th Annual Meeting of the Society for Neuroscience (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Eriko Kuramoto, Hajnelka Bokor, Nora Hadinger, Emilia Bosz, Boglarka Toth, Csaba David, Gergely Komlosi, Gordon Shepherd, Naoki Yamawaki, Tetsuya Goto, Laszlo Acsady.
2. 発表標題 Distinct functional and morphological properties of the frontal and parietal layer 5 corticothalamic pathways.
3. 学会等名 Gordon Research Conference (国際学会)
4. 発表年 2020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	桑木 共之  (KUWAKI Tomoyuki)  (80205260)	鹿児島大学・医歯学域医学系・教授    (17701)	

## 6. 研究組織(つづき)

	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	齋藤 充  (SAITO Mitsuru)  (50347770)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授    (17701)	
研究分担者	柏谷 英樹  (KASHIWADANI Hideki)  (70328376)	鹿児島大学・医歯学域医学系・講師    (17701)	
研究分担者	大野 幸  (OHNO Sachi)  (00535693)	鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師    (17701)	