

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K06518

研究課題名(和文) 痛覚刺激による注意干渉の回路メカニズム：マウス皮質イメージングを用いた解析

研究課題名(英文) Circuit mechanisms of attentional interference by pain stimuli: analysis using mouse cortical imaging

研究代表者

菱田 竜一 (Hishida, Ryuichi)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号：90313551

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)：痛覚刺激が注意という高次機能に干渉することは知られていたが、その神経回路メカニズムは不明であった。そこで、「痛覚情報を処理する連合野ネットワークから全感覚野には密な抑制性投射が存在し、その逆行性投射による感覚野抑制が、痛覚刺激による注意干渉のメカニズムである」という仮説を立て、麻酔下マウスの皮質イメージングという手法を用いて解析を進めた。そして、頭頂連合野は定常的に体性感覚野の痛覚応答を抑制している、頭頂連合野による感覚野抑制の効率はモダリティによって異なり、抑圧メカニズムが異なることが示唆される、前頭連合野も定常的に体性感覚野の痛覚応答を抑制している、等の結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトは不意に足の小指をぶつけると、突然の痛みにより注意が奪われてしまう。痛覚は生存にとって極めて重要な情報なので、注意を強烈に引き付けて現在行っている認知活動を中断し、痛みへの対応を最優先にするような仕組みが進化したと考えられる。では一体、いかなる神経回路メカニズムによって痛覚刺激は注意を奪うのだろうか？本研究では、仮説「痛覚情報を処理する連合野ネットワークから全感覚野には密な抑制性投射が存在し、その逆行性投射による感覚野抑制が、痛覚刺激による注意干渉のメカニズムである」の検証を試み、頭頂連合野や前頭連合野が定常的に体性感覚野の痛覚応答を抑制していることなど、仮説を支持する結果が得られた。

研究成果の概要(英文)：Although it is known that pain stimuli interfere with the higher-order function of attention, the neural circuit mechanism of this interference is unknown. Therefore, we hypothesized that "there is a dense inhibitory projection from the association area network that processes pain information to each sensory cortex. And the sensory cortex inhibition by the retrograde projection is the mechanism of attentional interference by pain stimuli," and proceeded with the analysis using a technique called cortical imaging in anesthetized mice. The results showed that (1) the parietal association cortex routinely suppresses the somatosensory cortex's pain response, (2) the efficiency of sensory cortex suppression by the parietal association cortex varies according to modality, suggesting that the suppression mechanism differs, and (3) the frontal association cortex also routinely suppresses the somatosensory cortex's pain response.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 脳・神経 生理学 可視化 認知科学 痛覚 フラビン蛋白質イメージング マウス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトは不意に足の小指をぶつけると、突然の痛みにより注意が奪われてしまう。痛覚は生存にとって極めて重要な情報なので、注意を強烈に引き付けて現在行っている認知活動を中断し、痛みへの対応を最優先にするような仕組みが進化したと考えられる。では一体、「いかなる神経回路メカニズムによって痛覚刺激は注意を奪うのだろうか？」

これまで研究代表者は、麻酔下マウスでのフラビン蛋白蛍光イメージング(ミトコンドリア酸素代謝と共役したフラビン自家蛍光を利用する脳機能イメージング法)を主要な研究手段として、大脳皮質高次領野の機能とそのメカニズムの解明に取り組んできた。そして、マウス頭頂連合野が視覚野の神経活動を抑制することを見出し、その抑制性投射が視覚的注意のメカニズムの一端である事を明らかにした。

この麻酔下マウスでのイメージング法を用いて、ヒゲを振動させる触覚刺激では大脳皮質バレル野だけに神経応答が見られたが、ヒゲ直下の皮膚に痛覚刺激(反復電気刺激)を与えると、刺激部位に対応した体性感覚野領域が応答した一方で、視覚野・聴覚野などが抑制されることを研究代表者は見出した。この結果は、認知活動の入り口である感覚野の神経活動が抑制されていることから、「痛覚刺激による注意干渉が、麻酔下マウスでのフラビン蛋白蛍光イメージングにより可視化できた」と解釈できた。

### 2. 研究の目的

以上より次のような仮説を研究代表者は考えた。『(1)痛覚情報を処理する連合野ネットワークから全感覚野には密な抑制性投射が存在する。(2)この逆行性投射による感覚野抑制が、痛覚刺激による注意干渉のメカニズムである。』本研究課題の目的は、この仮説の検証を通して、痛覚刺激による注意干渉のメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

本研究は、新潟大学動物実験指針に基づいておこなった。

#### (1) 手術

マウスの麻酔には、ウレタン(1.6~1.7 g/kg, i.p.)を使用した。十分に麻酔されていることを確認後、局所麻酔(bupivacaine)を頭皮下に注入し、頭蓋骨上の皮膚と左側側頭筋を切除した。頭部を固定するため、歯科用レジンで右頭蓋骨に金具を接着した。経頭蓋電気刺激を行う実験では、歯科用ドリルの刃で左頭蓋骨を削り、わずかな力で歪曲するまで薄くした。頭蓋骨表面を流動パラフィンで覆って乾燥を防ぎ、頭蓋骨の透明度を維持した。およそ3~4時間で実験が終わり次第、マウスは麻酔薬の過剰摂取や頸椎脱臼により速やかに安楽死させた。

#### (2) 麻酔下マウスのフラビン蛋白蛍光イメージング

麻酔開始から1時間以上経過してからイメージングを開始した。励起光としてLED光源(UHP-Mic-LED-475, Optoline)が発する青色光( $\lambda = 470 \sim 490$  nm)を用い、マウス大脳皮質が発する緑色自家蛍光( $\lambda = 500 \sim 550$  nm)を、冷却CCDカメラ(浜松ホトニクス ORCA-ER)で撮影した(128 x 168 pixels、毎秒7コマの速度で60コマ)。5 x 5 pixelの空間フィルターを用いて、取り込んだ画像を滑らかにした。精緻な画像を得るため、20~50セットの画像を20~60秒間隔で取り込み、それらを平均加算した。蛍光強度変化を算出するため、刺激直前の3枚の画像の平均画像で、全ての画像をピクセル毎に割って比率を計算するという正規化を行った。

#### (3) マウス大脳皮質の電気刺激

経頭蓋電気刺激法(Hishida et al 2011, J Neurosci Meth, 201:315-321)により麻酔下マウスの大脳皮質を電気刺激した。刺激には2相性電流を用い、電流の強度は100-500  $\mu$ A、持続時間は200  $\mu$ sに設定した。刺激電極には、先端を鈍らした縫い針を用いた。側頭筋もしくは背側皮下に、グラント電極を設置した。

#### (4) マウス大脳皮質のグルタミン酸刺激

0.1-0.2  $\mu$ lの10 mM MNI-ケージド-L-グルタミン酸を、ガラスピペット(先端径約10  $\mu$ m)を用いて、麻酔下マウスの大脳皮質に注入した(脳表下300  $\mu$ m)。その後、注入部位に紫外線フラッシュ光を照射し(持続時間は100 ms)、ケージド化合物からグルタミン酸を放出させた。UV光源には、FLOS-01-365nm with a 600- $\mu$ m output fiber (Craft Center SAWAKI Inc.)を使用し、これにコア径200  $\mu$ mの光ファイバーを接続して照射部位を限局させた。

#### (5) マウス後肢皮膚の電気刺激

皮膚の電気刺激は、ウレタンで十分に麻酔したマウスの右後肢に対して行った。右後肢の表裏皮膚表面を生体信号モニタ用皮膚前処理剤・スキンプュア(YZ-0019、日本光電)で処理した後、足

首をイメージング用マウス固定台にユーティリティワックス(GC)で固定した。後肢皮膚両面を2個の刺激電極はさみ、ユーティリティワックスで固定した。刺激電極は SMALL TESTING ELECTYRODES (0.4 x 0.5 cm, STE-0405-8, Neurotron Inc.)を使用し、脳波用電極ペースト・エレフィックス(Z-181BE、日本光電)を予め貼付した。自作したLabVIEWプログラムで生成した正弦波(5, 250 or 2000 Hz)をAnalog Stimulus Isolator Model 2200 (A-M Systems)に入力し、接続した刺激電極に出力させた。電流の強度は300  $\mu$ A、持続時間は0.5-1.0 sに設定した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 「感覚野抑制に働く神経経路の同定」

頭頂連合野から一次視覚野への皮質内経路の切断したマウスの頭頂連合野にMNI-ケージド-L-グルタミン酸を注入し、UVフラッシュ光照射によるグルタミン酸放出で同領域を賦活させた。その効果をフラビンイメージングにより解析したところ、一次視覚野の抑制応答が消失することを見出し、頭頂連合野から一次視覚野への皮質内経路が抑制応答に必要であることを明らかにした。

##### (2) 「注意干渉関連領域の賦活と感覚野抑制の程度との関係の解析」

強弱2種の電流強度により頭頂連合野を電気刺激し、各々について一次視覚野の神経活動が抑制される様子をフラビンイメージングによって測定した。その結果、電気刺激の強度が強ければ、頭頂連合野の興奮は大きくなるとともに、一次視覚野がより強く抑制されることが観測され、両領域間の定量的な関係を明らかにした。

##### (3) 「注意緩衝領域が視覚コントラスト感受性に及ぼす影響の解析」

注意緩衝領域として同定したマウス頭頂連合野と、視覚のコントラスト感受性に関する解析を麻酔下フラビンイメージングによって解析した。頭頂連合野から一次視覚野への抑制投射経路を皮質切断により遮断したマウスに異なるコントラストの視覚刺激を与え、視覚野応答を切断前後で比較した。低コントラストの視覚刺激に対しては皮質の視覚応答が抑制されるだけでなく、興味深いことに、高コントラストの視覚刺激に対しては皮質の視覚応答が増強するという現象を見出し、頭頂連合野が視覚野の興奮・抑制バランスの制御に関与しているとの示唆を得た。この結果は、刺激強度の強い感覚刺激に対しては過剰な皮質応答を押しさえ、強度の弱い刺激に対しては応答を底上げし、皮質回路において適切なダイナミックレンジ内に感覚応答を納めるべく頭頂連合野が機能していると解釈される。

(4) 「2光子顕微鏡によるカルシウムイメージングの結果を解析し、頭頂連合野が視覚野の細胞応答に及ぼす効果を調べた。4方位・8方向の線分刺激をマウスに提示し、一次視覚野の興奮性細胞および抑制性細胞が示す視覚応答を、コントロールマウス、頭頂連合野から一次視覚野への抑制投射経路を皮質切断により遮断した直後のマウス(急性遮断マウス)、遮断から3週間以上の回復期を経たマウス(慢性遮断マウス)の3群で比較した。方向選択性に対する効果を解析したところ、急性および慢性遮断マウスにおいて、方向選択性の低下が見られていた。より詳細なメカニズムを調べるため、方向選択性の低下の時間的経過を解析したところ、急性遮断マウスと慢性遮断マウスで差異が見られた。急性遮断マウスでは、興奮の極初期での抑制が解除され、視覚野興奮性細胞の興奮性そのものが亢進していると解釈できた。一方、慢性遮断マウスでは、興奮の後半期での抑制が解除されており、方向選択性の生成メカニズムに抑制投射経路が関与しているとの示唆を得た。

##### (5) 「注意干渉関連領域・頭頂連合野が痛覚に及ぼす機能的効果の解析(1)」

皮質イメージングにより既に注意干渉関連領域として同定・解析をおこなってきた頭頂連合野と、痛覚との関係について解析した。頭頂連合野を電気刺激等により賦活すると、一次視覚野の視覚応答や聴覚野の聴覚応答は抑圧されることを示し、同領域には感覚野に対する応答抑制機能があることを明らかにしてきた。ところが、体性感覚野の応答に対しては必ずしも同様の抑圧が働かない場合がある事を見出した。十分に麻酔したマウスの後肢足の裏に白金電極を設置し、アナログアイソレータを使用して250 Hzサイン波の電気刺激をおこなった。この周波数の電気刺激はA 繊維を活性化して一次痛覚を誘起するものであり、体性感覚野の後肢相当部位での痛覚応答はフラビンイメージングによって確認することができた。ところが、同刺激と同時に頭頂連合野を電気刺激しても、体性感覚野・後肢相当部位での痛覚応答は変化せず、応答の時間的空間的パターンや大きさは頭頂連合野の賦活の有無に影響されなかった。以上から、頭頂連合野の抑制機能にはモダリティによる差異があるかもしれないという可能性が示唆された。つまり、痛覚という生物個体の生存にとって極めて重要な感覚は他のモダリティとは異なり、安易に減弱されないように抑圧メカニズムが異なるか存在しないのかもしれない。また実体験から推測するに、極度の注意集中をおこなえば痛みを忘れることができることから、同実験においても頭頂連合野をもっと強く賦活すれば今回の痛覚応答も抑圧されるのかもしれないとの考察を得た。

##### (6) 「注意干渉関連領域・頭頂連合野が痛覚に及ぼす機能的効果の解析(2)」

頭頂連合野を注意干渉関連領域と同等し、その機能を痛覚への影響という観点から解析した。頭頂連合野を電気刺激等により賦活しても、体性感覚野の痛覚応答に対して抑圧が働かない場合がある事を見出したが、逆に頭頂連合野の機能を損傷した場合での応答の変化を調べた。深麻酔したマウスの後肢に設置した電極より、250 Hz サイン波の電気刺激をおこない、A 繊維を活性化して一次痛覚を誘起させ、体性感覚野・後肢相当部位の応答をフラビンイメージングによって計測した。その後、頭頂連合野と体性感覚野・後肢相当部位の間の大脳皮質に眼科用メスにより切れ目を入れ、両領野間の連絡を遮断した。続けて、同じ 250 Hz サイン波の電気刺激をおこなったところ、切断 5-10 分後には 76% の応答増強が観察された。この増強は素早く消失し、次の 5 分後には元の応答の 56% まで減衰した。この結果は、頭頂連合野が定常的に体性感覚野の痛覚応答を抑制していることを示すとともに、興奮 / 抑制のバランスが大きく変動した際には皮質応答を早期にバランスさせる機構が存在するらしいことを示唆している。

#### ( 7 ) 「前頭連合野が痛覚に及ぼす機能的効果の解析」

前頭連合野も注意干渉関連領域である可能性を検証するため、痛覚応答との関係を解析した。頭頂連合野での実験と同様に、体性感覚野・後肢相当部位の痛覚応答を記録した後、前頭連合野と体性感覚野の間の連絡路と思われる内側の大脳皮質に眼科用メスにより深く切れ目を入れ、両領野間の連絡を遮断、続けて 250 Hz サイン波の電気刺激に対する応答を計測した。切断 5-15 分後には 22% の応答増強が観察された。この増強は持続し、切断 30-40 分後にも 18 の増強が見られた。この結果は、前頭連合野も頭頂連合野と同じく、定常的に体性感覚野の痛覚応答を抑制していることを示している一方、興奮 / 抑制のバランス回復については頭頂連合野と性質が異なる機構を有している示唆している。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Tamai Y, Ito Y, Furuyama T, Horinouchi K, Murashima N, Michimoto I, Hishida R, Shibuki K, Hiryu S, Kobayashi KI	4. 巻 15
2. 論文標題 Auditory cortical activity elicited by infrared laser irradiation from the outer ear in Mongolian gerbils.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0240227
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0240227	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 Hishida R, Horie M, Tsukano H, Tohmi M, Yoshitake K, Meguro R, Takebayashi H, Yanagawa Y, Shibuki K	4. 巻 50
2. 論文標題 Feedback inhibition derived from the posterior parietal cortex regulates the neural properties of the mouse visual cortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Eur J Neurosci	6. 最初と最後の頁 2970-2987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ejn.14424	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 Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Horie M, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Takebayashi H, Baba H, Shibuki K	4. 巻 597
2. 論文標題 Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 3441-3455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1113/JP277615	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 Ogi M, Yamagishi T, Tsukano H, Nishio N, Hishida R, Takahashi K, Horii A, Shibuki K	4. 巻 14
2. 論文標題 Associative responses to visual shape stimuli in the mouse auditory cortex.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0223242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0223242	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 Tsukano H, Hou X, Horie M, Kitaura H, Nishio N, Hishida R, Takahashi K, Kakita A, Takebayashi H, Sugiyama S, Shibuki K	4. 巻 9
2. 論文標題 Reciprocal connectivity between secondary auditory cortical field and amygdala in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 19610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56092-9	査読の有無 無
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 Yamagishi T, Yoshitake K, Kamatani D, Watanabe K, Tsukano H, Hishida R, Takahashi K, Takahashi S, Horii A, Yagi T, Shibuki K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Molecular diversity of clustered protocadherin- required for sensory integration and short-term memory in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 9616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-28034-4.	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 Nishio N, Tsukano H, Hishida R, Abe M, Nakai J, Kawamura M, Aiba A, Sakimura K, Shibuki K.	4. 巻 8
2. 論文標題 Higher visual responses in the temporal cortex of mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 11136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-29530-3.	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 Ohga S, Tsukano H, Horie M, Terashima H, Nishio N, Kubota Y, Takahashi K, Hishida R, Takebayashi H, Shibuki K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Direct Relay Pathways from Lemniscal Auditory Thalamus to Secondary Auditory Field in Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cereb Cortex	6. 最初と最後の頁 4424-4439
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy234.	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 Mitsuhashi D, Hishida R, Oishi M, Hiraishi T, Natsumeda M, Shibuki K, Fujii Y	4. 巻 18
2. 論文標題 Visualization of cortical activation in human brain by flavoprotein fluorescence imaging.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurosurg	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2022.1.JNS212542	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 -

〔学会発表〕 計6件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 菱田竜一、澁木克栄
2. 発表標題 マウス頭頂連合野から一次視覚野への抑制投射は視覚野のコントラスト感受性制御に機能する
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉武講平、菱田竜一、八木健、澁木克栄
2. 発表標題 マウス後部頭頂連合野の機能解析
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菱田竜一、澁木克栄
2. 発表標題 痛みは一次感覚野のレベルで知覚応答を遮断する
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉武講平、西尾奈々、塚野浩明、菱田竜一、八木健、澁木克栄
2. 発表標題 後部頭頂連合野の高次機能：マウスモデルを用いた解析
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 塚野浩明、大賀慎平、堀江正男、寺島裕貴、西尾奈々、窪田和、高橋邦行、菱田竜一、竹林浩秀、澁木克栄
2. 発表標題 マウス大脳聴覚野のトノトピーの複雑性は視床皮質路の投射構造を反映する
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西尾奈々、塚野浩明、菱田竜一、阿部学、中井淳一、川村名子、饗場篤、崎村健司、澁木克栄
2. 発表標題 側頭皮質まで続くマウス視覚腹側経路の発見
3. 学会等名 日本神経科学会
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------