

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：32203

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07355

研究課題名(和文) 前頭連合野によるマウス痛み情動伝染制御の神経機構の解明

研究課題名(英文) Anterior cingulate cortex regulates emotional contagion of pain in mice

研究代表者

野元 謙作 (Nomoto, Kensaku)

獨協医科大学・医学部・講師

研究者番号：30786976

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：痛みを受けた同種他個体を観察した動物がすくみ行動などの痛み関連行動を示す現象は痛み情動伝染と呼ばれ、ヒトで高度に発達した「共感性」の起源的機能と考えられている。我々は野生由来系統であるMSMとC57BL/6Jのハイブリット系統を使って、痛み情動伝染が再現性よく惹起できる実験系を確立した。さらに痛み情動伝染中のマウスからファイバーフォトメトリーによる神経活動計測を行い、マウスが他個体の痛み行動を観察時に前部帯状皮質が活性化することを見出した。さらに薬理遺伝学を使って、前部帯状皮質から水道周囲灰白質への投射が痛み情動伝染に重要な役割を果たす予備的結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は前部帯状皮質、さらに前部帯状皮質から水道周囲灰白質への投射が痛み情動伝染に重要な役割を果たすことを見出した。これは高次連合野による本能行動のトップダウン制御に関わっていると考えられる。痛み情動伝染は、ヒトにおける「共感性」の起源的機能とも考えられており、その神経機構の解明は、「共感性」の機能障害を伴う精神疾患、また、他者信号を上手く行動選択に活かさない精神疾患の病態生理の理解に役立ち、有用な介入方法の開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Animals that observe other individuals of the same species in pain exhibit pain-related behaviors such as freezing. This phenomenon is called emotion contagion of pain, and is thought to be the precursor of empathy. We have established an experimental system that can reproducibly induce pain-emotion contagion using the hybrid strain of MSM, a wild-derived strain, and C57BL/6J. Next, we measured neural activity by using fiber photometry from mice undergoing emotional contagion of pain. We found that the anterior cingulate cortex was activated when mice observed pain behavior of other individuals. Using pharmacogenetics, we obtained preliminary results that the projection from the anterior cingulate cortex to the periaqueductal gray played an important role in emotion contagion of pain.

研究分野：システム神経科学

キーワード：情動伝染 共感 マウス 神経活動計測 前部帯状皮質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痛みを受けた同種他個体を観察した動物がすくみ行動などの痛み関連行動を示す現象が知られており、痛み情動伝染あるいは観察恐怖と呼ばれている。情動伝染は、ヒトで高度に発達した「共感性」の起源的機能と考えられており、ヒトの「共感性」の十分な理解のために、情動伝染の神経基盤を解明する必要がある。Jeon らは、痛み情動伝染の学習が前部帯状皮質 (ACC)、視床 MD 核、束傍核の不活性化で減弱すること、ACC と扁桃体の機能カップリングが起きていることを示した (Jeon et al., 2010)。さらに、オキシトシンが痛み情動伝染を増強することも分かっていた (Pisansky et al., 2007)。

### 2. 研究の目的

研究開始当初は、痛み情動伝染中の動物からのリアルタイム神経活動計測は行われておらず、その詳細な神経メカニズムについては不明であった。そこで、ファイバーフォトメトリーを用い、痛み情動伝染中のマウス ACC からリアルタイム神経活動計測を行い、痛み情動伝染において ACC の果たす機能の解明を目的とした。さらに予備的実験により、水道周囲灰白質 (PAG) において、痛み情動伝染中の最初期遺伝子タンパク質 c-Fos が増えていること、ACC から PAG に神経連絡があることを見出ししていた。PAG はすくみ行動の制御中枢と考えられることから、ACC、PAG が痛み情動伝染に重要な役割を果たしているという作業仮説を立てた。研究目的遂行のため、

- (1) 頑健に痛み情動伝染を呈する動物モデルの開発
- (2) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動の観察
- (3) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動阻害の影響の検討

という3つの目標を立てた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 痛み情動伝染について頑健な動物モデルの開発

代表的な実験室系統 C57BL/6J は痛み情動伝染を示しにくいことが予備実験で分かった。一方、野生由来系統 MSM は易刺激性が高く、痛み情動伝染が強いが、小型で敏捷性が極めて高く、神経科学実験に使用しにくいという問題があった。そこで我々はハイブリッド系統 B6MSMF1 を用いた。オス MSM とメス C57BL/6J を繁殖ペアとし、その F1 仔を実験に用いた。3 週齢で離乳し、離乳後は同性グループで飼育した。7-8 週齢で同性ペアでの飼育を開始し、少なくとも 2 週間の同居期間の後で、行動実験を行った。痛み情動伝染の行動実験では、2 部屋の片方はフットショック (電撃) が流せるグリッドの床で demonstrator のマウスが入れられた。もう片方の部屋には、observer のマウスが入れられた。2 つの部屋は小さな穴の開いた透明の仕切りで分けられていた。11 分の行動テストでは、5 分後から 20 秒おきに 1.0mA のフットショックが 12 発 demonstrator に与えられた (4 分)。その 2 分後にテストは終了した。行動実験はビデオ録画され、オフラインで Event recorder によって、demonstrator と observer それぞれのすくみ行動の時間を解析した。

#### (2) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動の観察

繁殖・飼育方法は(1)と同様に行った。7-8 週齢にイソフルラン麻酔下で ACC にウイルス注入・ファイバー留置手術を行った。ウイルスとして、AAV1.Syn.Flex.GCaMP6s と AAV1.CAG.Cre を 1:1 で片側 ACC に 600nL 混注し、ACC に GCaMP6s を導入した。実験当日、ファイバーフォトメトリー記録装置に光ファイバーで接続した後、行動実験は(1)と同様に行った。行動実験はビデオ録画され、フットショックの入った時間、すくみ行動の時間はオフラインで Boris によって注釈づけされた。神経活動解析としては、すくみ行動前後の PETH を作成した (Matlab)。GCaMP6s の発現範囲は、実験終了後、組織学的に検討した。動きによるアーチファクトの影響をみるため、陰性対照群として、AAV1.Syn.Flex.GCaMP6s の代わりに AAV1.Syn.Flex.EGFP を注入したマウスを用いた。

#### (3) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動阻害の影響の検討

繁殖・飼育方法は(1)と同様に行った。薬理遺伝学タンパク質導入のためのウイルスベクターとしては、AAV8.Syn.DIO.hM4D(Gi).mCherry、陰性対照として AAV8.Syn.DIO.mCherry を用いた。局所機能操作の場合には、ACC に前述のウイルスと AAV1.CAG.Cre を混注し、経路選択的機能操作の場合には、ACC に前述のウイルス、PAG に AAV1.CAG.Cre を注入した。ウイルス注入手術から最低でも 4 週間おいて行動実験を行った。行動実験としては、痛み情動伝染実験、音による恐怖条

件づけ試験、オープンフィールド試験、本能的な忌避物質である 2MT 曝露試験を行った。実験当日、行動実験 1 時間前に CNO を腹腔内注射した。その他の手順・解析は(1)と同様に行った。導入タンパク質の発現範囲は、実験終了後、組織学的に検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 痛み情動伝染について頑健な動物モデルの開発

ハイブリッド系統 B6MSMF1 は、MSM と C57BL/6J の中間程度の体重およびすくみ行動率を示すことが分かった。したがって、以後の実験では、B6MSMF1 を使用した。

##### (2) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動の観察

観察恐怖中のマウスより神経活動記録実験を実施し(図 1A)、他個体マウスがフットショックを受け、痛み情動を表出した時に ACC ニューロンが活性化していることを見出した(図 1B)。一方、すくみ行動そのものに関連した ACC ニューロンの活性は認められなかった(図 1C)。また、動きによるアーチファクトを統制するため、GCaMP6s の代わりに EGFP を発現させ、同様の実験をしたところ、他個体マウスへのフットショックに伴う活動上昇は見られなかったため、この活動上昇は動きによるものではないと結論づけた。

##### (3) 痛み情動伝染中の ACC 神経活動阻害の影響の検討

行動実験として、通常の情動伝染試験、音による恐怖条件づけ試験、オープンフィールド試験、本能的な忌避物質である 2MT 曝露試験を行った。まだ個体数が不十分であるが、ACC の不活性化はオスマウスにおいて、情動伝染によるフリージング行動を減らし、他の行動試験には影響を与えないという結果を得ている(図 2)。

我々の結果は、ACC が痛み情動伝染表出に重要な役割を果たすことを示唆している。予備の結果から、これは PAG への投射を介している可能性が高い。これは高次連合野による本能行動のトップダウン制御に関わっていると考えられる。痛み情動伝染は、ヒトにおける「共感性」の起源的機能とも考えられており、その神経機構の解明は、「共感性」の機能障害を伴う精神疾患、また、他者信号を上手く行動選択に活かせない精神疾患の病態生理の理解に役立ち、有用な介入方法の開発につながる可能性がある。

#### < 引用文献 >

Jeon, Daejong, Sangwoo Kim, Mattu Chetana, Daewoong Jo, H. Earl Ruley, Shih-Yao Lin, Dania Rabah, Jean-Pierre Kinet, and Hee-Sup Shin. 2010. "Observational Fear Learning Involves Affective Pain System and Cav1.2 Ca<sup>2+</sup> Channels in ACC." *Nature Neuroscience* 13 (4): 482-88.

Pisansky, Marc T., Leah R. Hanson, Irving I. Gottesman, and Jonathan C. Gewirtz. 2017. "Oxytocin Enhances Observational Fear in Mice." *Nature Communications* 8 (1): 2102.

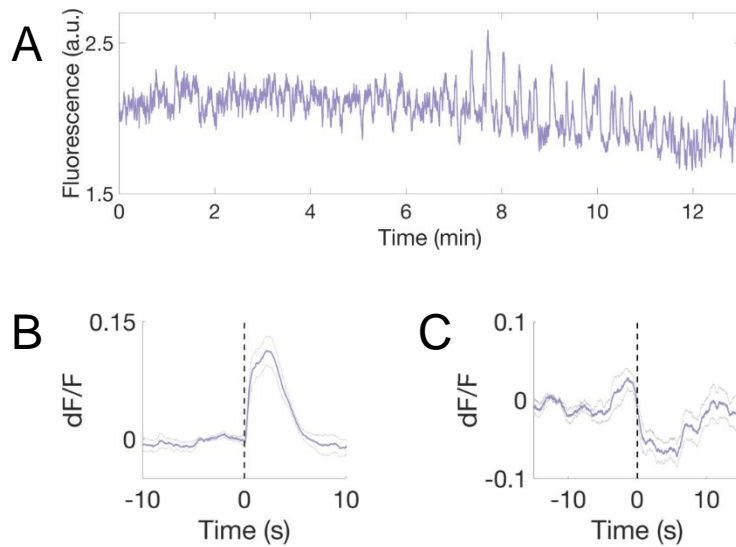
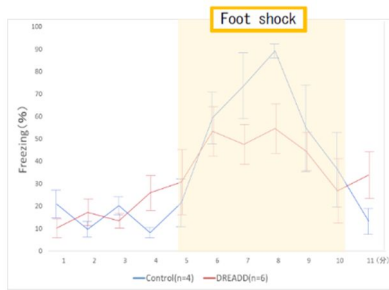


図 1A 痛み情動伝染行動実験中のカルシウムシグナル信号。7-11 分に神経活動活性化が認められる。B demonstrator にフットショックが入った時点で合わせた PETH。有意な活動の活性化を認める。C observer 自身のすくみ行動に合わせた PETH。有意な活動変化を認めない。

オス



メス

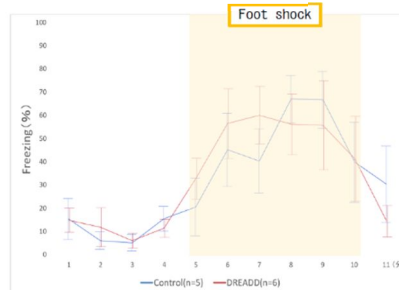


図 2 薬理遺伝学的手法による痛み情動伝染の抑制。オスでより顕著に抑制の効果が認められる。青線：対照群、赤線：DREADD 群。折れ線は平均値、エラーバーは標準誤差を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Horii-Hayashi Noriko, Nomoto Kensaku, Endo Nozomi, Yamanaka Akihiro, Kikusui Takefumi, Nishi Mayumi	4. 巻 24
2. 論文標題 Hypothalamic perifornical Urocortin-3 neurons modulate defensive responses to a potential threat stimulus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101908 ~ 101908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101908	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 Katayama Maki, Kubo Takatomi, Yamakawa Toshitaka, Fujiwara Koichi, Nomoto Kensaku, Ikeda Kazushi, Mogi Kazutaka, Nagasawa Miho, Kikusui Takefumi	4. 巻 10
2. 論文標題 Emotional Contagion From Humans to Dogs Is Facilitated by Duration of Ownership	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Psychology	6. 最初と最後の頁 1678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpsyg.2019.01678	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野元謙作ほか
2. 発表標題 Anterior cingulate cortex regulates the expression of observational fear
3. 学会等名 第42回 日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野元謙作ほか
2. 発表標題 Anterior cingulate cortex regulates the expression of observational fear
3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野元謙作
2. 発表標題 前部帯状皮質によるマウス観察恐怖制御の神経機構
3. 学会等名 日本行動神経内分泌研究会 (JSBN2018)
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
---------	---------