

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：33303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24241

研究課題名(和文) 疼痛治療新規ターゲットとしての縫線核ドパミンニューロン群

研究課題名(英文) The dorsal raphe-periaqueductal grey dopamine transporter neurons as a new target for pain control

研究代表者

堀 佳江 (HORI, Yoshie)

金沢医科大学・医学部・特定技術員

研究者番号：00845068

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：申請者が、縫線核領域DAニューロンのマーカーとしてDATransporter (DAT)を用いて細胞群の特定を行ったところ、縫線核領域におけるDAT陽性神経群はチロシンヒドロキシラーゼ(TH)陽性神経と血管作動性腸管ペプチド(VIP)陽性神経の二群から構成されることが分かった。これらの二群の神経群はCeAとBNSTへ相同の投射を持っていた。またCeAとBNST以外への投射はほぼなく、CeAとBNSTにおけるDAT陽性神経終末の多くは縫線核領域を起始としていることが明らかになった。以上の結果から、縫線核領域DAT神経群はCeAとBNSTに対して複雑な活動調節を行っていることが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、疼痛治療新規ターゲットとしての縫線核領域DATニューロン群の特徴解析を行った。その結果、DATニューロンは多くがDAニューロンであるが、この縫線核領域においてはTH陽性群とVIP陽性群に分けることが可能であり、VIP陽性群はDAニューロンではないと推察される。この結果は、縫線核領域DATニューロンによるCeAとBNSTの活動調節が単純なものではなく、複数の要因からなるものであることを示している。この多様なニューロン群の機能をさらに詳細に検討していくことで、疼痛制御機構を明らかにし、新たな疼痛治療戦略を生み出すことができると考えている。

研究成果の概要(英文)：We used DAT as a DA neuron marker. It was revealed that the DR-PAG DAT neurons consisted of TH-positive neurons and VIP-positive neurons. Also, it was confirmed that these neurons exclusively innervate onto the CeA and BNST, and the majority of DAT fiber terminals in the CeA and BNST arise from the DR-PAG region. These results implied that the DR-PAG DAT neurons might have functional heterogeneity on pain control via modulation of the CeA and BNST activities.

研究分野：神経科学

キーワード：dopamine transporter dorsal raphe periaqueductal grey pain dopamine

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

疼痛を制御する機構は末梢性調節と中枢性調節がある。縫線核が疼痛を抑制することは中枢性調節の一つである。縫線核はセロトニン作動性の核とされているが、実は縫線核にはドパミン (DA) ニューロンも密に存在する (本研究では縫線核 DA ニューロンと呼称する)。その機能は余り調べられていなかったが、近年になって温痛覚や恐怖条件づけを調節する事が報告された (Li et al. 2016; Groessl et al. 2018)。縫線核領域が疼痛を調節していること (Mayer et al. 1971; Akaike et al. 1978)、DA 作動系が疼痛を調節していること (Tykocki et al. 2013) と合わせて考えると、縫線核 DA ニューロンは縫線核セロトニンニューロンと同様に疼痛の制御を行っていることが示唆される。

さて、この縫線核 DA ニューロンがどのように疼痛を調節するのか? を考える上で、その投射先が重要となる。予備実験データによれば、その投射先は扁桃体中心核 (CeA) の外側部 (CeL) と分界条核 oval 核 (BNSTov) である。CeA は腕傍核 (PBN) から痛覚情報を受けとっており、縫線核から DA 入力を受ける CeL が CeA 活動をどのように調節するのかを精査する事が中枢性の疼痛調節の神経基盤を解明するための重要な足掛かりとなる。また BNST も痛覚受容への関与が報告されており (Tran et al. 2014; Minami & Ide 2015)、縫線核 DA ニューロンが投射する BNSTov は BNST の主要な核である。つまり、この投射経路も疼痛の調節に重要な役割を果たしていることが想像できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、縫線核ドパミンニューロンが中枢性に疼痛をどのように調節しているのかを明らかにし、新たな疼痛治療法を開発する事である。縫線核 DA ニューロンの機能はそれ程注目されてこなかったが、縫線核領域が疼痛制御に関係するという過去の報告や、申請者らが見出した、縫線核 DA ニューロンは痛覚関連部位である CeA 及び BNST に特に密に投射を持つという事実を合わせれば、縫線核 DA ニューロンを研究する事が新たな疼痛制御機構の解明及び新たな疼痛治療戦略に繋がると考えられる。この縫線核 DA ニューロン群が痛覚を調節するとされる CeA と BNST それぞれの局所回路レベルでの活動にどのような影響を及ぼすかに注目し、新たな疼痛制御システムを探る。

3. 研究の方法

縫線核 DA ニューロンが CeL 及び BNSTov を介して中枢性に疼痛をどのように調節しているのかを縫線核 DA ニューロンの特徴解析を通じて明らかにする。当初は 1 - 2) の実験を行う予定であったが、前段階として 3) の実験を主に行った。

- 1) 行動実験: 縫線核 DA ニューロンによる疼痛調節作用の検証
- 2) 縫線核 DA ニューロンからの入力による CeA/BNST ニューロン活動性変化の精査
- 3) 解剖学的アプローチを用いた縫線核領域 DA ニューロンの特徴解析

4. 研究成果

縫線核 DA ニューロンの特徴解析を行うため、本研究では解剖学的アプローチを用いて、その特徴を精査した。縫線核領域 DA ニューロンのマーカーとして本研究では DA トランスポーター (DAT) を用いた。また、DAT を可視化するために、DAT の下流に Cre-recombinase の発現する DAT-ires-Cre マウスと Cre-recombinase 依存的に TdTomato が発現する Ai14 マウスを交配した F1 である DAT-Cre::Ai14 マウスを用いた。

(1) 縫線核領域 DAT ニューロンと tyrosine hydroxylase (TH) 及び vasoactive intestinal peptide (VIP) の共存

DAT-Cre::Ai14 マウスの縫線核領域で DAT シグナル、TH シグナル、VIP シグナルをそれぞれ抗体を用いて標識し、その共存を確認した。その結果、縫線核領域 DAT ニューロンは大きく分けて TH+/VIP- と TH-/VIP+ の 2 群からなることが明らかになった。つまり、縫線核領域 DAT ニューロンは均一な集団ではなく、少なくとも 2 群からなる神経集団であることが明らかになった。当初はほぼ全ての DAT ニューロンが TH 陽性 (つまりドパミン作動性) であると予測していたためこの結果は意外なものであった。

(2) 縫線核領域 DAT ニューロン神経投射パターンの解析

DAT-cre マウスの縫線核領域に AAV5-EF1 α -DIO-ChR2-eYFP を導入して anterograde tracing を行った。その結果、CeL と BNSTov に多くの神経線維が確認できたが、一方で、DAT 陽性神経線維が多数存在することが報告されている線条体や海馬、扁桃体外側基底核にはほとんど神経終

未が確認できなかった。この結果は、縫線核領域 DAT ニューロンが CeL と BNST_{OV} に特に選択的に投射していることを示している。また CeL と BNST_{OV} への DAT 神経線維の起始を確認するために、マウスの縫線核領域へ 6-OHDA を注入し、DA ニューロンを ablation してその効果を確認した。6-OHDA 注入群では対照群と比較して、CeA と BNST での DAT 陽性神経線維が有意に減少していた。この結果は縫線核領域 DAT 陽性神経が CeA と BNST への主な DAT 神経入力であることを示している。

(3) CeA 及び BNST からの逆行性標識と DAT・TH・VIP シグナルの共存確認

CeA 及び BNST に逆行性トレーサーである Fluoro Gold (FG) を注入し、縫線核領域のニューロンで CeA もしくは BNST に投射を持つニューロンを標識した。FG で標識されたニューロンと DAT&TH もしくは DAT&VIP の共存を確認した。その結果、DAT ニューロンのうち TH 陽性群も VIP 陽性群も CeA と BNST に同様に投射を持っていた。また FG と TH&VIP の共存を確認したところこの結果も同様に、各ニューロンサブグループは CeA と BNST に投射を持っていた。以上の結果は、縫線核領域 DAT ニューロンを構成する 2 群 TH+群と VIP+群はその投射パターンにおいては大きな差がないことを示している。

以上の結果から、代表者は、疼痛制御に大きな役割を果たすことが想定される縫線核領域 DAT ニューロンが 2 群からなることを明らかにした。この 2 群は同様に CeA と BNST に投射を持つ。TH+群と VIP+群は機能的に異なると考えられるので、それぞれ CeA と BNST に対して異なる影響を及ぼし、疼痛制御に異なる作用を持つことが推察される。今後はより機能的な側面からの縫線核領域 DAT ニューロンの特徴解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Zhao Qin, Ito Tetsufumi, Soko Chika, Hori Yoshie, Furuyama Takafumi, Hioki Hiroyuki, Konno Kohtarou, Yamasaki Miwako, Watanabe Masahiko, Ohtsuka Satoshi, Ono Munenori, Kato Nobuo, Yamamoto Ryo	4. 巻 9
2. 論文標題 Histochemical characterization of the dorsal raphe-periaqueductal grey dopamine transporter neurons projecting to the extended amygdala	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eneuro	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） 10.1523/ENEURO.0121-22.2022	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本亮, 古山貴文, 趙駿, 益岡尚由, 伊藤哲史, 堀佳江, 小野宗範, 加藤伸郎
2. 発表標題 恐怖条件付け中の縫線核領域DAT陽性ニューロンの活動変化
3. 学会等名 第68回中部日本生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小野宗範, 伊藤哲史, 堀佳江, 山木幸子, 許峰, 馬蘭蘭, 加藤伸郎
2. 発表標題 3xTgアルツハイマーモデル動物脳内のアミロイド 蓄積パターンの免疫組織学的解析
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------