

令和 5 年 6 月 22 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09209

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領域ドパミン作動系の機能解析

研究課題名（英文）Dopaminergic system in the dorsal raphe region; a new target for pain treatment

研究代表者

堀 佳江 (HORI, Yoshie)

金沢医科大学・医学部・特定助教

研究者番号：00845068

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）：背側縫線核（DR）および中脳水道灰白質（PAG）には、ドパミン（DA）ニューロンとみなされるDA transporter（DATDR-PAG）陽性ニューロンが多く存在し疼痛の情動的側面を制御している可能性がある。本研究ではDATDR-PAGニューロンが疼痛をどのように制御しているのかを明らかにするため、その化学形態的特徴及び生理的特徴を精査した。疼痛刺激に対してDATDR-PAGニューロンは2峰性の反応を示した。またDATDR-PAGニューロンは2群のニューロン集団（TH陽性群とVIP陽性群）から構成されることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、縫線核および中脳水道灰白質領域に、侵害刺激に特に選択的に反応するDATニューロン群が存在することが明らかになった。またこれらのニューロンはTH陽性群とVIP陽性群の2群からなる事が明らかになった。この結果から、疼痛の情動的側面を調節するニューロン群の存在が示唆され、このDATニューロン群の活動を制御することで新たな疼痛治療方策の創出が期待される。

研究成果の概要（英文）：In the dorsal raphe (DR) and periaqueductal grey (PAG) regions, many DAT neurons, which are regarded as dopaminergic, exist and are supposed to modulate the emotional aspect of noxious stimuli. In this study, to elucidate the function of DATDR-PAG neurons on pain perception, we examined the response of those neurons to noxious stimuli and analyzed fine neurochemical characteristics. The DATDR-PAG neurons exhibited a bimodal response to noxious stimuli. Also, it turned out that the DATDR-PAG neurons are composed of 2 subpopulations; TH positive and VIP positive groups.

研究分野：神経科学

キーワード：疼痛 中脳水道灰白質 縫線核 ドパミン 扁桃核 分界条床核

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事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、実は背側縫線核 (DRN) とその周囲の中心灰白質 (PAG) や線状核 (CLi) を含む縫線核周辺領域にはドパミン (DA) ニューロンも密に存在する (本研究では縫線核領域 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事 (Mayer et al. 1971; Akaike et al. 1978)、DA 作動系が疼痛を調節している事 (Tykocki et al. 2013) と合わせて考えると、縫線核領域 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事が示唆される。

さて、この縫線核領域 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) と分界条床核 oval 核 (BNSTov) である。CeA は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 も痛覚受容及び慢性疼痛への関与が報告されており (Tran et al. 2014; Minami & Ide 2015; Takahashi et al. 2019)、縫線核領域 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事が想像できる。

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、代表者らが見出した、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。DA ニューロンの多くは DAT 陽性ニューロンであり、DAT ニューロンに注目することで DAT-cre マウスを用いて選択的にその機能を調べることができる。本研究では DAT^{DR-PAG} 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

縫線核領域 DA 系が 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、DAT-Cre マウスと各種遺伝学的技術を組み合わせて、DAT^{DR-PAG} ニューロンの特徴解析を通じて明らかにする。

- 1) 解剖学的アプローチを用いた DAT^{DR-PAG} ニューロンの特徴解析
- 2) 行動実験: 恐怖条件づけ中の DAT^{DR-PAG} ニューロン活動変化の解析
- 3) 行動実験: 恐怖条件づけ中の DAT^{DR-PAG} ニューロンファイバーの BNST/CeA における活動変化の解析

4. 研究成果

(1) DAT^{DR-PAG} 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末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 BNSTov 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 BNSTOV 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 神経入力である事を示している。

(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。

(4) 恐怖条件づけ中の DAT^{DR-PAG} ニューロンの活動変化

DAT-cre マウスの DAT^{DR-PAG} ニューロンに AAV を用いて GCaMP7f を導入し、頭部固定条件下で恐怖条件づけを行った。US には air puff を CS には 8 kHz tone を用いた。Fiber photometry を行って活動変化を計測した。この実験では fiber canula は縫線核領域に刺入しそこから記録を行った。当初、DAT^{DR-PAG} ニューロンは学習に伴い CS への反応を増強すると期待していたが、実際には CS への反応は形成されず、US のみに反応を示した。US への反応は二峰性であり、US 呈示に対応した早い反応と遷延する遅い反応との 2 種の反応で構成されていた。

次に、同様の実験を fiber canula を BNST/CeA に刺入して行った。この場合、BNST/CeA へ投射する DAT^{DR-PAG} ニューロンの軸索活動を計測できる。結果、細胞体での活動変化と同様の変化が BNST でも CeA でも確認された。DAT^{DR-PAG} ニューロンが主には DA 作動性であることを考えると、ドパミン濃度も二峰性に变化していることが想像される。

この二峰性の反応が疼痛制御にどのような役割を果たしているのかを今後の実験で解明していく。

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。また総体としての DAT^{DR-PAG} ニューロンは侵害刺激に特に選択的に反応し、その反応は二峰性であることが明らかになった。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 0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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	加藤 伸郎 (KATO Nobuo) (10152729)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	伊藤 哲史 (ITO Tetsufumi) (90334812)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究分担者	小野 宗範 (ONO Munenori) (30422942)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	
研究分担者	山本 亮 (YAMAMOTO Ryo) (30447974)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	

6. 研究組織（つづき）

	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	古山 貴文 (FURUYAMA Takafumi) (20802268)	金沢医科大学・医学部・講師 (33303)	

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