

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09251

研究課題名（和文）大規模脳活動記録とイメージングによる痛み認知の脳内情報伝達回路の解明

研究課題名（英文）Large-scale brain activity recording and imaging to elucidate the signaling circuitry in the brain for pain perception

研究代表者

田中 基（Tanaka, Motoshi）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：20303787

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、遺伝子工学による特定神経回路の人為的機能調節技術を用いて、視床背内側核（MD）から前帯状回皮質（ACC）へ投射する神経回路のみの機能調節を興奮性のデザイナー受容体であるhM3Dqならびに抑制性のデザイナー受容体であるhM4Diにより行い、慢性疼痛への関与を検討した。MDからACCへ投射する神経回路の活性化を単回行うと、一過性の痛覚感受性の亢進が見られ、繰り返し活性化すると長期にわたる痛覚感受性の亢進が見られた。また、神経障害により痛みを感じやすくした際に、MDからACCへ投射する神経回路を長期的に抑制すると痛み閾値の低下が消失した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢社会になり、慢性的な痛みで悩まされる人たちが増加している。特に、既存の鎮痛薬によっては緩和できない痛みである神経障害による痛みは、患者の生活の質を著しく低下し、労働生産性についても甚大な影響を与える。本研究では、慢性的な痛みが脳内の特定の神経回路の異常により誘発されることを明らかにし、さらに神経障害による病的な痛みに関わる神経回路を明らかにしたことから、社会的意義は高い。また、遺伝子工学とデザイナー受容体の技術を組み合わせることで、特定の神経回路のみの機能調節を行い、慢性疼痛に関与する神経回路を明らかにしたことから、学術的意義も高い。

研究成果の概要（英文）：In this study, using genetic engineering techniques for artificially modulating the function of specific neural circuits, we investigated the involvement of the excitatory designer receptor hM3Dq and the inhibitory designer receptor hM4Di in chronic pain by modulating the function of only the neural circuit projecting from the dorsomedial thalamic nucleus (MD) to the anterior cingulate cortex (ACC). Single activation of the neuronal circuitry projecting from MD to ACC resulted in a transient increase in pain sensitivity, whereas repeated activation resulted in a long-term increase in pain sensitivity. In addition, the long-term inhibition of the neural circuitry project from MD to ACC abolished the decrease in pain threshold when pain sensitivity was increased due to neuropathy.

研究分野：麻酔科学

キーワード：疼痛 大規模脳活動記録 カルシウムイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

本研究では、痛み情報が脳内の多領域をどのように伝わり、情報処理され、意識上に表出し、表象されるのかという学術的「問い」を明らかにする。痛みの感受性は、過去の経験や現在の情動に影響される。気持ちが昂る状態では痛みを感じにくい一方、落ち込んでいる時には些細な刺激も苦痛に感じられる。また、過去に痛みを経験した場所では、痛み刺激を受けなくても、その状況に置かれるだけで痛みを感じる。このように、心(脳)の状態や過去の経験により痛みの感受性が大きく変わることは、経験上よく知られているが(Melzack and Cassey, 1968)、その脳内情報処理機構はわかっていない。また、刺激のない状態でもヒトは痛みを表象できるが、その機序も不明である。

疼痛を生じる刺激は、体性感覚を認知する脳領域に加え、負の情動を引き起こす脳領域も活性化することが、ヒトの functional Magnetic Resonance Imaging (fMRI) の研究結果から明らかにされている。負の情動が亢進している動物モデル(うつ病モデル)において、疼痛に対する感受性が亢進していることが明らかになっている。また、急性痛と慢性疼痛における脳活動の違いを明らかにするため、Activation- Induced Manganese- enhanced MRI (AIM-MRI)法で検討を行った。AIM-MRI 法では、fMRI では不可能な無拘束・無麻酔動物の脳活動を測定し、抑制性および興奮性神経の活性化も測定できる。AIM-MRI 法により、神経障害性疼痛時の脳活動は急性炎症性疼痛時と比べ、島皮質や側坐核といった情動に関わる脳領域において、より活性化していることが分かった。この結果から、急性痛が慢性痛に遷移するには、情動に関わる脳領域の持続的な賦活化が必要である可能性が示された。

これらの研究結果より、痛みの認知には、「負の情動を生み出す脳領域」と「体性感覚を処理する脳領域」の双方の活性化が必要であることがわかった。つまり、難治性と急性の痛みの違いは、負の情動を生み出す脳領域の活性化の違いによることが明らかになった。しかし、それぞれの脳領域の機能的な繋がりや、痛み情報の処理の流れ、そして、痛みの表象に関わる脳内回路を明らかにするには、より高解像度かつ高速処理が可能な測定技術を用いる必要がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、痛み刺激により活性化する多数の脳領域の間の情報伝達のメカニズムを明らかにし、その際に活動する神経細胞を人為的に操作することで痛み知覚を操作できるかを検証する。時間分解能が高く、広範囲・複数領域の測定が可能な高密度多点電極を用いた電気生理学的手法で、痛み認知の神経回路を明らかにした後、痛みの慢性化に関わる神経回路をアデノ随伴ウイルスベクター (AAV) と化学遺伝学的手法を組み合わせることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験動物

12週齢の Long Evans ラットならびに8週齢の C57BL/6J マウスを用いた。飼育環境は、温度  $23 \pm 2$ 、湿度  $50 \pm 10\%$  に維持し、12時間の明暗サイクルに設定した。

### (2) 神経障害性疼痛モデルの作製

イソフルラン(導入4%、維持1.8%)により麻酔したラットまたはマウスの坐骨神経を露出し、坐骨神経のうち腓腹神経のみを残して、残りの神経を切断する Partial Sciatic Nerve Ligation (PSNL) モデルを使用した。

### (3) 行動解析

機械的刺激に対する反応閾値(機械痛覚閾値)は、von Frey filament を用いて測定した。ラットの足蹠へ、圧力を調整されている太さの異なるフィラメントを押し当て、逃避行動が認められる重さ(g)から評価した。

### (4) 大脳における大規模多点同時電気生理記録と脳内 in vivo イメージング

イソフルラン(導入4%、維持1.8%)麻酔下のラットに複数のタングステン電極を埋植し、ラットの頭上に銅メッシュを用いて固定した。電気生理記録については256チャンネルの同時記録が可能であるシステム(Ampliplex: 電極、プレアンプ、増幅器、記録ソフトウェア)を用いた。

また、GCaMP7 をアストロサイトと神経細胞に発現するマウスの脳深部領域に GRIN レンズを埋植し、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

### (5) アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) の処置

マウスにペントバルビタールナトリウム (60mg/kg) を腹腔内投与した。マウスの頭部を脳定位固定装置で固定して頭皮を切開し、目的の脳領域の直上に位置する頭蓋骨を穿孔した。AAV で満たしたガラスキャピラリーを脳内に刺入し、各脳領域に  $0.2 \sim 0.3 \mu\text{L}$  の AAV を  $0.05 \mu\text{L}/\text{min}$  の速度で注入し、5分間以上の静置の後、ガラスキャピラリーを抜去して切開部位を縫合した。

### (6) クロザピン N-オキシド (CNO) 処置

CNO は名古屋市立大学大学院薬学研究科精密有機化学分野の樋口恒彦先生・梅澤直樹先生の研究室で合成・精製したものを使用した。 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度でマウスの飲用水に溶解させ、自由飲水で投与を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 大規模脳活動同時記録と脳内 in vivo イメージング

神経障害性疼痛モデルラットの脳内へ多数の電極を埋植し、無麻酔・無拘束(自由行動)下のラットの脳活動を測定した。この神経障害性モデルラットの脳活動を一次体性感覚野(S1)、補足運動野(M2)、前帯状回皮質(ACC)、前頭前皮質、島皮質、側坐核、淡蒼球、視床背内側核(MD)、扁桃体、海馬から多点電気生理記録を行った。神経障害性疼痛の持続により、脳活動の変化が顕著な領域が複数同定された。また、脳活動の周波数依存的な解析を行った。手術前、手術後1週間、2週間、および2ヶ月後における局所地場電位(LFP)を、一次体性感覚野、補足運動野、前帯状回皮質、後帯状回皮質、前頭前皮質、島皮質、側坐核、淡蒼球、外側視床核のそれぞれの領域で記録し、これらの領域の経時的なLFPの変化を周波数依存的な解析法により解析した。その結果、側坐核と前頭前皮質の領域で、帯域脳活動(40-120Hz)が神経障害の処置後より持続して増加していた。

次に、脳内 in vivo イメージングで、脳深部の神経系細胞の活動の可視化を試みた。GCaMP7をアストロサイトと神経細胞に発現するマウスの脳深部領域にGRINレンズを埋植し、蛍光顕微鏡を用いて観察したところ、刺激によりアストロサイトや神経細胞の活動変化を観察することができた。(論文公表ができていないため、脳領域については特定領域の表記はできない。)

### (2) 神経障害性疼痛モデルの痛覚過敏に対するMD-ACC経路の持続的抑制による影響

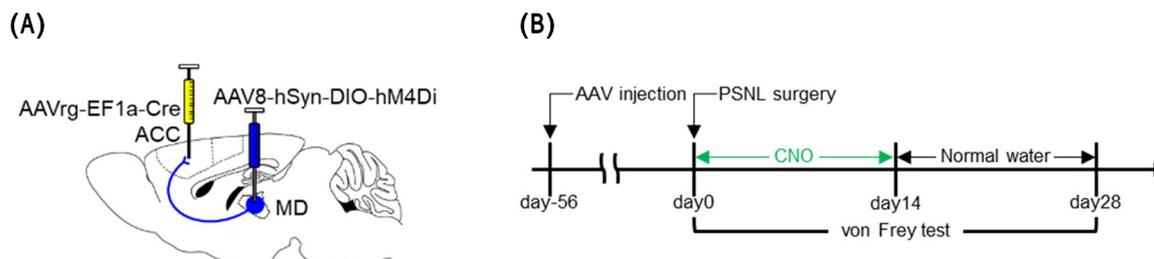
MD-ACC経路を数週間にわたり持続的に機能調節した例は報告されていない。まず、神経障害性疼痛におけるMD-ACC経路の役割を明らかにするため、MD-ACC経路を持続的に抑制した際の神経障害性疼痛モデル動物の機械痛覚閾値への影響を検討した。ACCにはAAVretrograde-EF1-mCherry-IRES-Creを局所投与し、神経細胞に逆行性にCre recombinaseを発現させた。MDにはCre recombinase存在下でのみhM4Diを発現するAAVベクターであるAAV8-hSyn-DIO-hM4D(Gi)-IRES-mCitrineを投与し、MD-ACC経路にのみ特異的にhM4Diを発現させた(図1A,C)。コントロールには、ACCにAAVretrograde-EF1-mCherry-IRES-Creを、MDにhSynプロモーター下流にEGFPのみを発現するAAVであるAAV5-hSyn-EGFPを投与した動物を用いた。

AAVの投与から8週間の感染期間の後、マウスの左後肢に神経障害の手術を施しPSNLモデル、または偽手術を施しSham群とした。CNOを50µg/mLの濃度でマウスの飲用水に溶解させて、PSNLモデルの作成日から2週間自由飲水で投与した。2週間のCNO投与の後、マウスの飲用水を通常の水に変更した(図1B)。

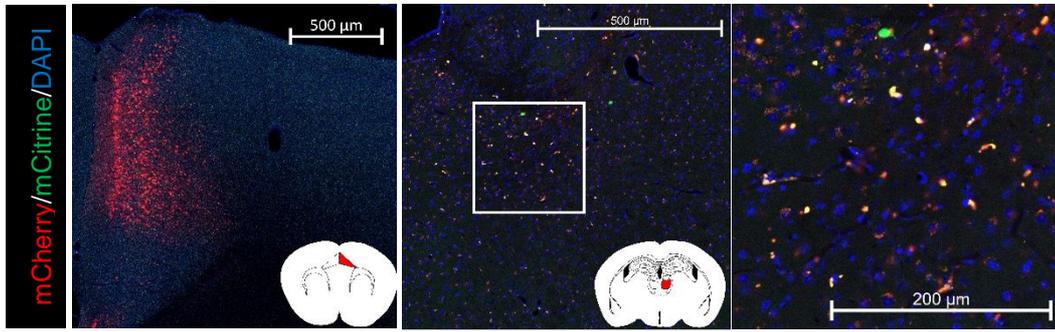
von Frey testの結果、CNOの飲水投与によりMD-ACC経路が持続的に抑制されるhM4Di-PSNL群では機械痛覚閾値の低下が抑制されたが、MD-ACC経路が抑制されないMock-PSNL群では機械痛覚閾値が低下したままであった。二元配置分散分析の結果、各群間( $F_{3,330} = 201.3, P < 2.2 \times 10^{-16}$ )および経時変化( $F_{14,330} = 4.0, P = 2.4 \times 10^{-6}$ )に有意な変化が認められた。post-hock検定(Tukey-Kramer)を行うと、CNOの飲水投与開始後3、5、7、9、11、14、15、17、19、21、23、25、28日において、hM4Di-PSNL群の機械痛覚閾値はMock-PSNL群の機械痛覚閾値と比較して有意に上昇していた( $\dagger P < 0.05, \dagger\dagger P < 0.01$ )。また、神経障害性疼痛モデルマウスの機械痛覚閾値の低下に対するMD-ACC経路の抑制による影響は、CNOの飲水投与を中止しMD-ACC経路の抑制を解除した後にも継続していた(図1D)。

次に、神経障害性疼痛モデル動物の痛覚閾値の低下が形成された状態において、MD-ACC経路を抑制した際の痛覚閾値への影響を検討した。PSNLモデルマウスの作成日を0日目(Pre)として、手術後14日まで通常水による飼育を行い痛覚閾値の低下を確認した後、CNOを自由飲水により投与した(図1E)。von Frey testの結果、通常水を与えた時には神経障害性疼痛モデルの2群(hM4Di-PSNL、Mock-PSNL)において機械痛覚閾値の低下が観察された。二元配置分散分析の結果、各群間( $F_{3,285} = 523.2, P < 2.2 \times 10^{-16}$ )および経時変化( $F_{14,285} = 9.8, P < 2.2 \times 10^{-16}$ )に有意な変化が認められた。post-hock検定(Tukey-Kramer)を行うと、PSNLモデルマウスの作成後1、3、5、7、9、11、14、15、17、19、21、23、25、28日において、機械痛覚閾値の有意な低下が認められた(Mock-Sham vs Mock-PSNL;  $**P < 0.01, hM4Di-Sham vs hM4Di-PSNL; \#\#P < 0.01$ )。また、CNOを飲水投与し、PSNLマウスのMD-ACC経路を抑制しても機械痛覚閾値の低下に対して影響は認められなかった(図1F)。

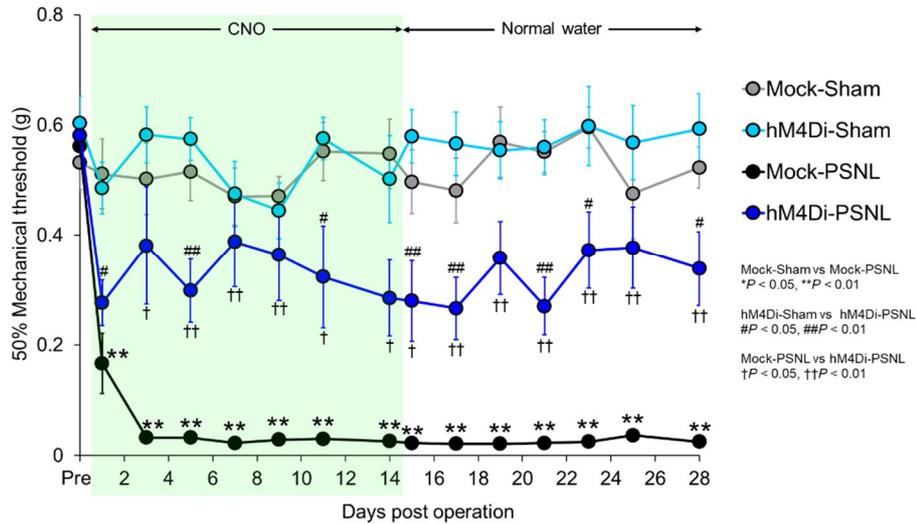
図1 神経障害性疼痛に対するMD-ACC経路の持続的抑制の影響



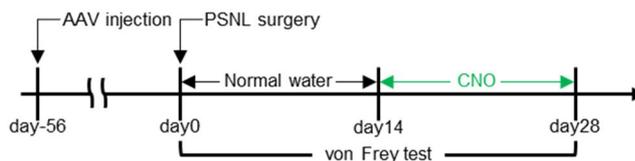
(C)



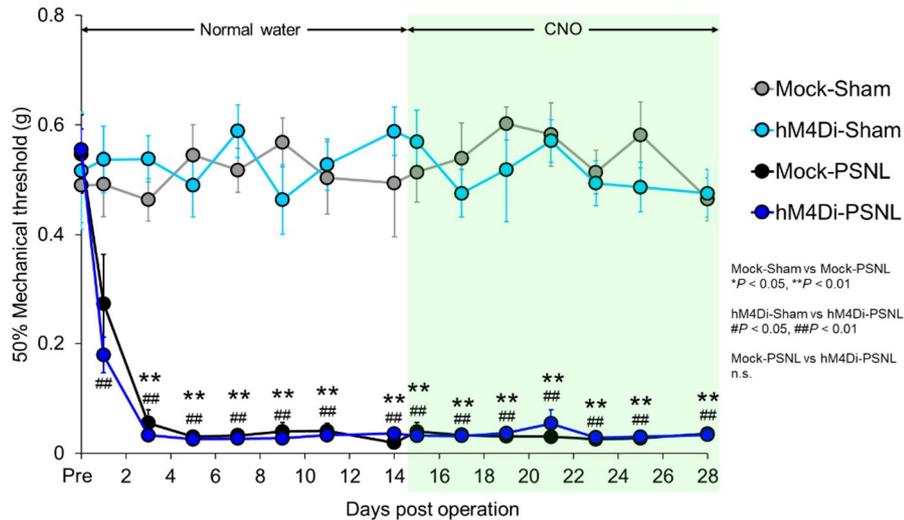
(D)



(E)



(F)



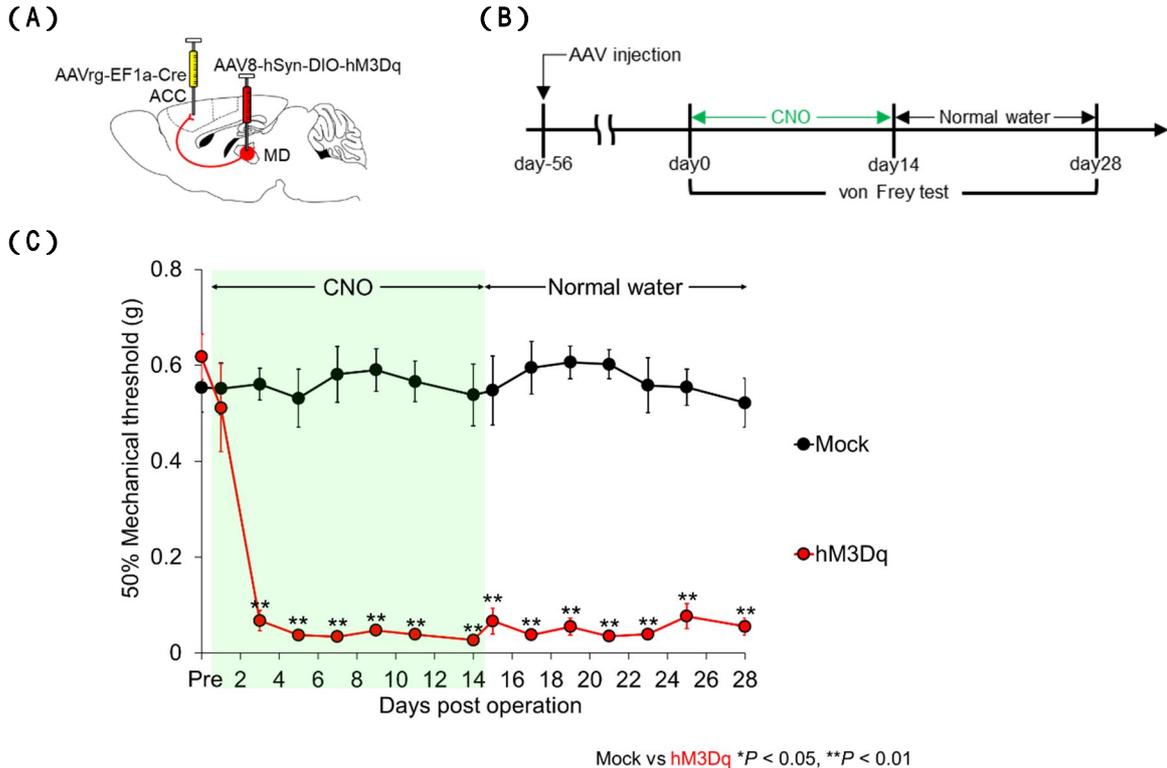
### (3) MD-ACC 経路の持続的活性化による健常動物の機械痛覚閾値に対する影響

次に MD-ACC 経路のみを持続的に活性化した場合の機械痛覚閾値の変化を測定し、MD-ACC 経路の神経活動が痛覚感受性および疼痛の慢性化に与える影響を検討した。(2)で行った持続的抑制の検討と同様に神経細胞に逆行性に感染し、EF1 プロモーター下流に Cre recombinase を発現させる逆行性 AAV ベクターである AAVretrograde-EF1 -mCherry-IRES-Cre を ACC に投与することで、ACC に投射を持つ神経細胞に Cre recombinase を発現させた。MD には神経細胞のマーカ遺伝子である hSyn をプロモーターとし、Cre recombinase 存在下でのみ hM3Dq を発現させる順行性 AAV ベクターである AAV8-hSyn-DIO-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine を微量投与することで MD-

ACC 経路のみに hM3Dq を発現するマウスを作成した(図 2A)。Mock として ACC に AAVretrograde-EF1 -mCherry-IRES-Cre を、MD に AAV5-hSyn-EGFP を投与した動物を用いた。コントロールには、ACC に AAVretrograde-EF1 -mCherry-IRES-Cre を、MD に hSyn プロモーター下流に EGFP のみを発現する AAV である AAV5-hSyn-EGFP を投与した動物を用いた。AAV の投与から 8 週間の感染期間の後、CNO を 50  $\mu$ g/mL の濃度でマウスの飲用水に溶解させて自由飲水で 2 週間投与した。2 週間の CNO 投与の後、マウスの飲用水を通常の水に変更した(図 2B)。

von Frey test の結果、CNO の飲水により MD-ACC 経路を持続的に活性化すると機械痛覚閾値が低下した。また CNO の飲水の後、通常水に変更し MD-ACC 経路の活性化を中止しても機械痛覚閾値の低下が持続した。二元配置分散分析により各群間 ( $F_{1,150} = 853.1$ ,  $P < 2.2 \times 10^{-16}$ ) および経時的变化 ( $F_{14,150} = 9.3$ ,  $P = 1.7 \times 10^{-14}$ ) に有意な変化が認められ、post-hoc 検定 (Tukey-Kramer) を行ったところ、CNO の投与開始後 3、5、7、9、11、14、15、17、19、21、23、25、28 日において機械痛覚閾値が有意に低下した ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ) (図 2C)。

図 2 MD-ACC 経路の持続的活性化が機械痛覚閾値に与える影響



以上より、MD から ACC へ投射する神経回路は、痛みの感受性調節に重要な役割を果たしていることが示され、特に、その活性化が神経障害性疼痛の発症に重要な役割を果たしていることが明らかになった。また、特定の神経回路の活動変化が、様々な脳領域の活動へ影響を与えることで、疼痛の慢性化と難治化が進むと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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	志田 恭子  (Shida Kyoko)  (00381880)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・臨床研究医   (23903)	
研究分担者	大澤 匡弘  (Ohsawa Masahiro)  (80369173)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授   (23903)	
研究分担者	祖父江 和哉  (Sobue Kazuya)  (90264738)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授   (23903)	

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