

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K23120

研究課題名（和文）社会的ストレスを起因とする疼痛下行抑制系経路の変調

研究課題名（英文）Modulation of descending pain system due to social stress

研究代表者

川崎 詩織 (KAWASAKI, Shiori)

日本大学・歯学部・専修研究員

研究者番号：30876397

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：我々は中脳水道周囲灰白質（PAG）に着目し本研究を行った。PAGには高頻度に自発性発火を示すコリン作動性ニューロンが存在した。このコリン作動性ニューロンはムスカリン性受容体作動薬により、ムスカリン2（M2）受容体が活性化しGタンパク質活性化型内向き整流性カリウム（GIRK）チャンネルの開口が生じて急速な過分極を引き起こすことが示された。また高頻度にコリン作動性ニューロンを発火させることで急速な過分極が起きたため、コリン作動性ニューロンはアセチルコリンの自己分泌もしくは傍分泌によるM2受容体の活性化を介したGIRKチャンネルの開口により自己興奮性を調節している可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中脳水道周囲灰白質のコリン作動性ニューロンに発現するムスカリン2（M2）受容体がアセチルコリンの自己分泌もしくは傍分泌によって活性化し、受容体に共役するGタンパク質活性化型内向き整流性（GIRK）カリウムチャンネルが開口して過分極することで自己興奮を制御している可能性について示した。中脳水道周囲灰白質は疼痛制御の要衝であり、本研究で得られた成果は既存の疼痛治療に対して抵抗性のものに対して新たな創薬ターゲットとして期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on the periaqueductal gray (PAG) which is a pivotal area to regulate pain. Cholinergic neurons at PAG showed high-frequency spontaneous firing. Application of a muscarinic agonist to cholinergic neurons in PAG induced rapid hyperpolarization by opening G protein-activated inwardly rectifying potassium (GIRK) channels through muscarinic 2 (M2) receptors. Additionally, neostigmine, an inhibitor of choline esterase, which indirectly increases acetylcholine in the synaptic cleft, also evoked rapid hyperpolarization. These results suggested that cholinergic neurons in PAG regulate neural excitability via M2 receptors, which link to GIRK channels and autocrine or paracrine of acetylcholine are likely involved in this cholinergic regulation of neural firing.

研究分野：神経科学

キーワード：中脳水道周囲灰白質 コリン作動性ニューロン ムスカリン受容体 GIRKチャンネル

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛患者では末梢神経の異常のみならず、中枢神経系の疼痛制御に関する神経回路に変調をきたしている可能性があるがいまだに不明な点が多い。中脳水道周囲灰白質は疼痛制御の中枢を担っており、中脳水道周囲灰白質腹外側(vIPAG)に存在するドーパミン作動性ニューロンを刺激すると機械・熱刺激に対して鎮痛効果が得られると明らかにされている(Taylor et al., eNeuro, 2019)。また慢性疼痛の増悪には心理社会的ストレスが大きく影響する。強制水泳試験によりうつ病状態となったラットでは、三叉神経領域の侵害情報が入力する三叉神経脊髄路核尾側亜核の神経活動が亢進すると考えられている(Nakatani et al., Exp Brain Res, 2018)。したがって、ストレスが疼痛制御に関与する中枢神経回路に変調を引き起こすことによって疼痛が増悪する可能性がある。そこで、脳のストレス関連領域とvIPAG間に形成される局所神経回路と疼痛制御機構を解明することで疼痛抑制系を賦活する慢性疼痛の新規治療開発につながる考えた。

### 2. 研究の目的

vIPAGに投射するストレス関連脳領域を同定し、同領域の選択的刺激することでvIPAGニューロンの応答性について明らかにする。そして慢性ストレス負荷ラットのvIPAGニューロンに対するストレス関連領域からの投射がシナプス応答に与える影響について検索することによって中脳水道周囲灰白質のストレスによる痛み調節機構の一端を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### (1) vIPAGに投射するストレス関連領域の同定

動物は抑制性ニューロンが緑色蛍光タンパク質Venusによって標識されているVGAT-Venusラットを用いた。VGAT-VenusラットのvIPAGに逆行性トレーサーであるコレラトキシンB(CTB)を注入した。3週間後に4%PFAで灌流固定し、脳標本を40 $\mu$ mの厚みで作成した。すべての観察は共焦点レーザー顕微鏡(FV-1000, Olympus)を用いて行い、ストレス負荷時に(vIPAG)に投射している脳領域および抑制性ニューロンとの共存について検索した。

#### (2) vIPAGに存在するニューロンのタイプング

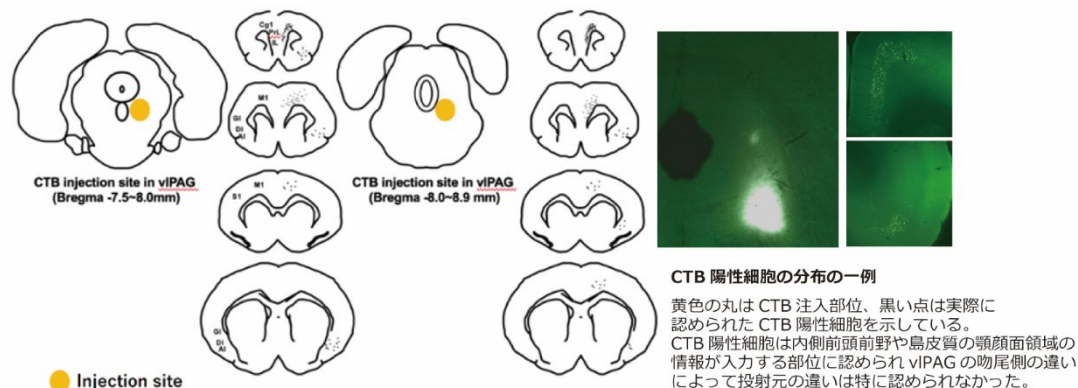
動物はVGAT-Venusとコリン作動性ニューロンが標識されたChAT-TdTomatoとのハイブリッドである、VGAT-Venus-ChAT-TdTomatoトランスジェニック・ラットを用いた。抑制性ニューロンとコリン作動性ニューロンおよびどちらにも標識されない興奮性ニューロンから電流固定下でホールセル・パッチクランプ記録を行い静止膜電位および発火特性について電気生理学的特性を解析した。

#### (3) vIPAGに存在する各種ニューロンタイプにおけるムスカリン性受容体作動薬の影響

ストレス関連脳領域からの投射による影響を受けるvIPAG内のターゲットを考慮した際に、過去の報告からアセチルコリン受容体が疼痛制御に関与していることが知られているため(Ibora C. Umana et al., 2017, Pain)。まずはvIPAGにおける神経活動にアセチルコリンの受容体の一つであるムスカリン受容体が関与しているのかについて検索を行った。実験にはVGAT-Venus-ChAT-TdTomatoトランスジェニック・ラットを用いた。ムスカリン受容体の活性化にはcarbachol(10 $\mu$ M)を用い、遮断薬にはpirenzepine(M1拮抗薬;2 $\mu$ M)、gallamine(M2拮抗薬;10 $\mu$ M)、J104129(M3拮抗薬;50nM)、AF-DX387(M2/4拮抗薬;1 $\mu$ M)、PD102807(M4拮抗薬;5 $\mu$ M)を用いた。静止膜電位、入力抵抗、発火頻度を記録し、上記作動薬および拮抗薬の作用を評価した。すべての記録はホールセル・パッチクランプ法を用いて電流固定下で行った。

## 4. 研究成果

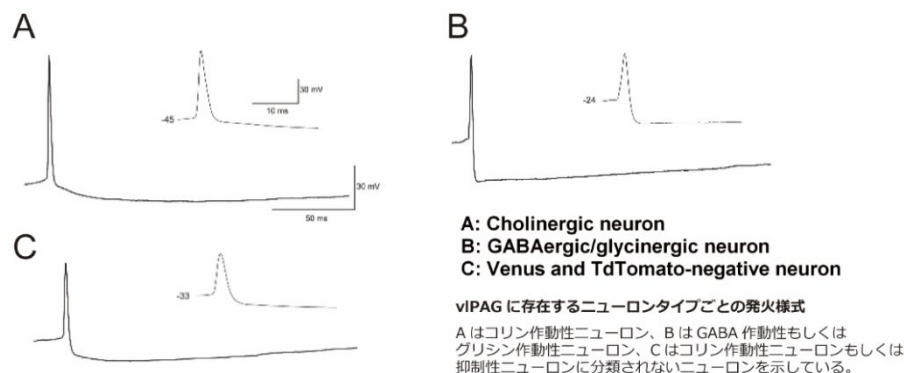
### (1) vIPAG に投射するストレス関連領域の同定



CTB 陽性細胞が観察される脳領域について網羅的に検索し投射ニューロンの形態学的特性を解析した。CTB 陽性細胞は視床下部腹側核と扁桃体中心核のほか、島皮質、前頭前野および一次体性感覚野に分布が認められた。これら大脳皮質の CTB 陽性細胞は主に b 層に分布する大型錐体細胞が大部分を占めていた。

### (2) vIPAG に存在するニューロンのタイプ

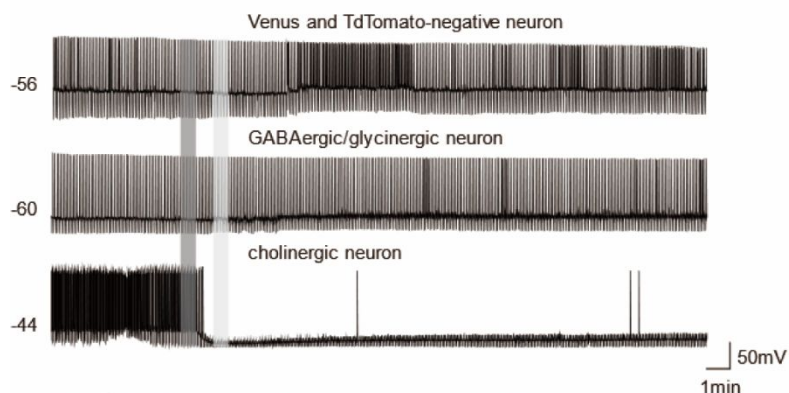
vIPAG に存在する抑制性ニューロン、コリン作動性ニューロン、そのどちらにも標識されない3タイプのニューロンは、それぞれ特異的な発火様式を示した。



さらに、静止膜電位に有意な差が認められ、vIPAG のニューロン全体の静止膜電位が、他の脳領域と比較して浅いことが示された。

### (3) vIPAG に存在する各種ニューロンタイプにおけるムスカリン性受容体作動薬の影響

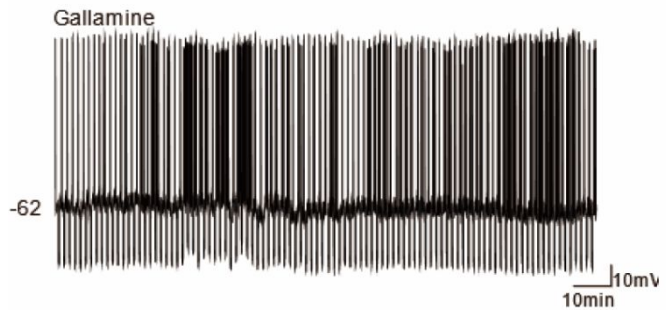
carbachol の投与は、入力抵抗及び発火頻度を減少とともに静止膜電位を急速に過分極させた。ムスカリン受容体のサブタイプごとの拮抗薬灌流投与後に carbachol を灌流投与すると、M2 受容体拮抗薬によって静止膜電位の過分極と入力抵抗の低下が抑制された。以上の結果から、vIPAG において M2 受容体がコリン作動性ニューロンの神経活動制御に関与している可能性が示唆



カルバコールを投与した際の静止膜電位の変化の一例

上段から抑制性ニューロンおよびコリン作動性ニューロンに分類されないもの GABA 作動性ニューロン、一番下段がコリン作動性ニューロンと並んでいる。コリン作動性ニューロンはムスカリン受容体作動薬であるカルバコールの投与（グレーのハイライト部分）により急速な過分極を示していることが分かる（白色のハイライト部分）。

された。また carbachol の投与により急速な過分極が引き起こされたことから G 蛋白質活性型内向き整流性カリウム (GIRK) チャンネルの関与が予測された。そこで GIRK チャンネル阻害剤を投与すると carbachol による過分極と入力抵抗の低下が抑制された。したがって、VIPAG のコリン作動性ニューロンは M2 受容体を自己受容体として発現しておりその活性化により GIRK チャンネルを開口させることで自



ムスカリン受容体拮抗薬とカルバコール投与による静止膜電位の変化  
カルバコール投与による急速な過分極は M2 受容体の拮抗薬である Gallamine の投与によって抑制された。

身の神経活動を抑制するメカニズムを有していると考えられた。さらにコリン作動性ニューロンをコリンエステラーゼ阻害剤であるネオスチグミンの灌流投与下で高頻度に発火させると、急速な過分極が生じたためコリン作動性ニューロンが自己分泌もしくは傍分泌による神経興奮制御機構を有していることが示された。以上より、コリン作動性ニューロンは M2 受容体の活性化を介した GIRK チャンネルの開口により自己興奮性を調節している可能性が示された。

#### < 引用文献 >

- Norman E. Taylor et. al, The Role of Glutamatergic and Dopaminergic Neurons in the Periaqueductal Gray/Dorsal Raphe: Separating Analgesia and Anxiety, eNeuro, 6(1)e0018-18.2019, 2019, 1-14
- Nakatani et. al, Inhibitory effects of fluoxetine, an antidepressant drug, on masseter muscle nociception at the trigeminal subnucleus caudalis and upper cervical spinal cord regions in a rat model of psychophysical stress, Exp Brain Res, 236(8), 2018, 2209-2221
- Iboro C. Umana et. al, Nicotinic modulation of descending pain control circuitry, Pain, 158, 2018, 1938-1950

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 川崎詩織, 中谷有香, 小林真之
2. 発表標題 中脳水道灰白質腹外側部へ投射するニューロンの解剖学的特性
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 川崎詩織, 中谷有香, 小林真之
2. 発表標題 ラット中脳水道灰白質腹外側部ニューロンの電気生理学的及び解剖学的特性
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川崎詩織, 中谷有香, 小林真之
2. 発表標題 中脳水道周囲灰白質腹外側部に位置するコリン作動性ニューロンに対するムスカリン受容体活性化の影響
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
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
---------	---------