

令和 5 年 6 月 4 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16938

研究課題名(和文) 光遺伝学的手法による島皮質から腕傍核への投射経路の機能解明

研究課題名(英文) An optogenetic approach to investigate functional profiles of projection from the insular cortex to the parabrachial nucleus

研究代表者

中谷 有香 (NAKAYA, Yuka)

日本大学・歯学部・助教

研究者番号：60781391

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔顔面領域における侵害情報は三叉神経脊髄路核尾側亜核に入力する。その後、腕傍核や視床を介して一次体性感覚野、島皮質そして扁桃体など様々な神経核に情報が伝達される。一方、島皮質は腕傍核に下行性投射することが解剖学的に報告されているが、実際にその機能については不明である。そこで本研究では、光遺伝学的手法を用いて腕傍核に対する島皮質の役割を解析することを目的とした。研究成果として、島皮質からの下行性投射線維はSp5Cから投射を受ける腕傍核腹外側部におけるニューロンとシナプス形成していることを認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛みは傷害から身体を守るために必須の感覚で、組織損傷が正常に治癒するにしたがって消失する。しかし、一部の患者においては器質的な問題がないにも関わらず、慢性痛と呼ばれる有害な痛みや不快な感覚が持続することがある。歯科医療において埋伏智歯の抜歯などによって生じた下歯槽神経の損傷によって気質的变化を伴わない慢性痛を訴えて来院する患者は少なくない。最近これら慢性痛の原因の一つに、中枢神経系における可塑的变化が関与していると考えられている。島皮質 腕傍核の下行性投射が口腔顔面領域における侵害情報伝達の調節に関与する可能性が本研究で示唆された。以上は慢性痛に対する新規治療の開発の基盤となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： The parabrachial nucleus (PBN) neurons, which receive noxious information in the orofacial area, send their axons to various nuclei including amygdala, thalamus and the insular cortex (IC). The IC plays a major role in processing nociception, and direct descending projections from IC to PBN have been reported. However, little information is available in terms of the descending projection profiles. Here, we examined whether IC projections modulate noxious information in rats using an optogenetic technique. As a result, we obtained excitatory postsynaptic currents from neurons in ventral lateral area of PBN by activation of descending inputs from the IC, and found that this area receives noxious information from the Sp5C.

研究分野：口腔顔面痛

キーワード：島皮質 腕傍核 口腔顔面領域 痛み オプトジェネティクス パッチクランプ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

痛みは傷害から身体を守るために必須の感覚で、組織損傷が正常に治癒するにしたがって消失する。しかし、一部の患者においては器質的な問題がないにも関わらず、慢性痛と呼ばれる有害な痛みや不快な感覚が持続することがある。歯科医療においても埋伏智歯の抜歯や外科的矯正治療(顎顔面手術)によって生じた下歯槽神経の損傷によってアロディニアや異所性疼痛、さらに気質の変化を伴わず原因を特定できない特発性歯痛など様々な慢性痛を訴えて来院する患者は少なくない。最近これら慢性痛の原因の一つに、中枢神経系における可塑的变化が関与していると考えられている。

実際、申請者が所属する研究室ではラット下歯槽神経切断モデルにおいて、島皮質のⅠ層における興奮性ニューロンに対する抑制性の入力が増加し、結果として二次体性感覚野と島皮質の口腔領域への興奮性の入力が増進することで、痛みの増強につながる可能性を明らかにした(Fujita.S et al., eNeuro, 2019)。また、ラットの腰椎を結紮して作製される神経障害性疼痛モデルにおいて、腕傍核から扁桃体へのシナプス増強が認められ、中枢神経系のシナプスの変性が神経因性疼痛の誘発に関与することも報告されている(Ikeda et al., Pain, 2006)。したがって、「末梢に慢性的な侵害刺激が加わると、島皮質や腕傍核における神経回路が可塑的に変化し、その結果、組織損傷部位が治癒した後も異常な疼痛感覚が持続すること」が明らかになってきた。しかし、腕傍核ニューロンは侵害情報を痛み感覚として認知する一次体性感覚野への投射経路の中継核である視床腹側基底核群と不快な情動の形成に関与する扁桃体へ投射することが知られている(Rossella et al., J.Anat, 1998)が、島皮質 腕傍核の下行性投射がどちらの神経核に投射するニューロンを興奮させるかは不明である。すなわち、島皮質 腕傍核の下行性投射が痛み感覚の強度を増強する働きと侵害情報に対して不快な感覚を増強する働きのどちらに関与するかを検索することによって慢性痛に対する新規治療基盤を提案しようと考え、本研究の立案に至った。

### 2. 研究の目的

我々はこれまでに島皮質ニューロンが二次ニューロンのある Sp5C に下行性投射し、Sp5C ニューロンとシナプス形成することで、痛み情報伝達を増強すること報告した(Nakaya et al., PAIN, 2023)。しかし、投射先は三次ニューロンが存在する腕傍核も含まれると考えられている。一方、腕傍核は痛み性質の弁別を担う一次体性感覚野へ投射する経路の中継核である視床および情動形成に関与する扁桃体へ投射することが知られている。そこで本研究は「島皮質 腕傍核の下行性投射による口腔顔面領域における慢性痛に対する新しい機序による除痛法の確立」を最終的な目標に定め、視床および扁桃体へ投射する腕傍核ニューロンに対する島皮質 腕傍核の下行性投射の機能を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) Sp5C から腕傍核への投射パターンの検討

腕傍核は内側結合腕傍核および外側結合腕傍核に分類されている。その中で扁桃体へ投射する腕傍核ニューロンおよび Sp5C から投射を受ける腕傍核ニューロンの局在に関しては明らかにされていない。アデノ随伴ウイルスを用いて Sp5C ニューロンにチャンネルロドプシン(ChR2)とそのマーカーである赤色蛍光タンパクの mcherry を発現させる。4-5 週間飼育した後に、腕傍核を含む急性脳スライス標本作製し、共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。さらに、腕傍核ニューロンよりホールセル・パッチクランプ法にて記録を行い、Sp5C ニューロンの軸索終末に発現する ChR2 に光刺激することでシナプス応答を記録する。

#### (2) 扁桃体および視床へ投射する腕傍核ニューロンの分布様式の検討

視床および扁桃体へ投射する腕傍核ニューロンを同定するために、AlexaFluor 647 または AlexaFluor 488 にて蛍光ラベルされた CTB をそれぞれの神経核に注入し、共焦点レーザー顕微鏡にて腕傍核での発現および分布を確認する。

#### (3) ChR2 を用いた島皮質から腕傍核への投射様式の検討

島皮質に AAV-ChR2-mcherry の懸濁液、扁桃体に AlexaFluor 488 でラベルされた CTB、そして視床に AlexaFluor 647 でラベルされた CTB を注入し、4-5 週間飼育した後に腕傍核を含む急性脳スライス標本の作製を行う。Sp5C ニューロンが投射する領域における AlexaFluor 488 陽性ニューロンと AlexaFluor 647 陽性ニューロンから同時に光刺激した際のシナプス応答の記録をホールセル・パッチクランプ法にて記録する。

### 4. 研究成果

#### (1) Sp5C から腕傍核への投射パターンの検討

これまでに口腔顔面領域における痛み情報が腕傍核の外側部に入力することは免疫組織学的解析によって報告されているが、実際に Sp5C ニューロンを選択的に活性化させ、電気生理学的にシナプス応答を記録した報告はなかった (Jasmin L et al., Neuroscience, 1997)。今回我々は、Sp5C に AAV5-hSyn-ChR2-mcherry を注入した VGAT-Venus ラットの腕傍核を含む急性脳スライス標本を作製し、光刺激によって Sp5C の軸索終末を選択的に活性化させることで腕傍核ニューロンに対するシナプス後電流をホールセル・パッチクランプ法で記録した (図 1)。このシナプス応答は主に腕傍核腹外側部から記録した。そして、電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルのブロッカーであるテトロドトキシン (TTX) を灌流投与すると応答の消失を認め、さらに電位依存性 K<sup>+</sup>チャネルブロッカーである 4-アミノピリジン (4-AP) をさらに加えて灌流投与すると再びシナプス応答の回復を認めた。すなわち、Sp5C から外側腕傍核ニューロンに対する単シナプス性のシナプス形成を認めた。

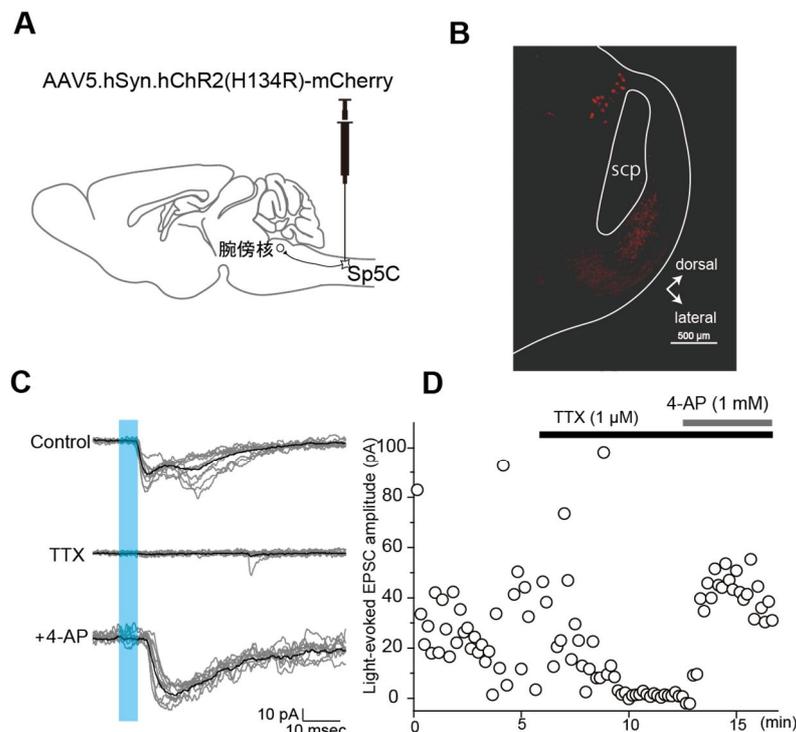


図 1 Sp5C ニューロンから腕傍核ニューロンに対するシナプス応答の記録 A, Sp5C にベクターを注入する模式図 B, 腕傍核の冠状断のスライス標本 赤色 : mCherry C, Sp5C ニューロンから腕傍核ニューロンに対するシナプス応答の記録 D, C で記録したシナプス応答の振幅の時間経過

## (2) 扁桃体および視床へ投射する腕傍核ニューロンの分布様式の検討

まず、Sp5C や脊髄後角ニューロンが投射することで知られる視床の後内外側腹側核に CTB を注入し、4-5 週間飼育した後に PBN を含む冠状断のスライス標本を作製したが、CTB 陽性ニューロンを認めなかった。次に髄板内核に CTB を注入したところ僅かではあるが外側腕傍核に CTB 陽性ニューロンの発現を認めた。一方、扁桃体に CTB を注入しいたところ、外側腕傍核に CTB 陽性ニューロンを僅かに確認した。それぞれの発火パターンを解析するためにホールセル・パッチクランプ法にて記録を試みたが、対象になる細胞数が少ないことに加え、CTB による細胞毒性が細胞が弱ってしまい記録には至らなかった。

## (3) ChR2 を用いた島皮質から腕傍核への投射様式の検討

これまでに島皮質から腕傍核への投射線維について解剖学的な解析の報告はあるが (Sato et al, 2013), 実際にシナプスが形成されているかについて報告されていない。そこで今回我々は、島皮質に AAV5-hSyn-ChR2-mcherry を VGAT-Venus ラットに注入して 4-5 週間飼育した後に腕傍核を含む急性脳スライス標本を作製し、光刺激によって島皮質の軸索終末を選択的に活性化させることで腕傍核ニューロンに対するシナプス後電流をホールセル・パッチクランプ法で記録した (図 2)。腕傍核における抑制性 (Venus 陽性) ニューロンおよび興奮性 (Venus 陰性) ニューロンのどちらからも光刺激に追従したシナプス電流を記録し、この両間ではシナプス応答の振幅に有意な差を認めなかった。そして、このシナプス応答は TTX 灌流投与によって応答の消失を認め、さらに 4-AP をさらに加えて灌流投与することによって再びシナプス応答の回復を認めた。すなわち、島皮質から外側腕傍核ニューロンに対する単シナプス性のシナプス形成を認めた。加えて、このシナプス応答は腕傍核腹外部の背側から腹側の領域から記録することができた。成果 (1) より Sp5C ニューロンが投射し侵害情報伝達を受ける腕傍核腹外側部領域のニューロンからも島皮質ニューロンからシナプス応答を記録できたことは、島皮質からの下行性投射は腕傍核においても口腔顔面領域における痛み感覚情報伝達を調整していることが

示唆される。成果(2)より、扁桃体だけでなく、視床においても情動的な感覚情報を処理するとされる髄板内核に腕傍核ニューロンが投射する傾向を踏まえると、島皮質から腕傍核に下行性投射するニューロンは腕傍核では痛みの情動的な側面を調節していることが示唆される。

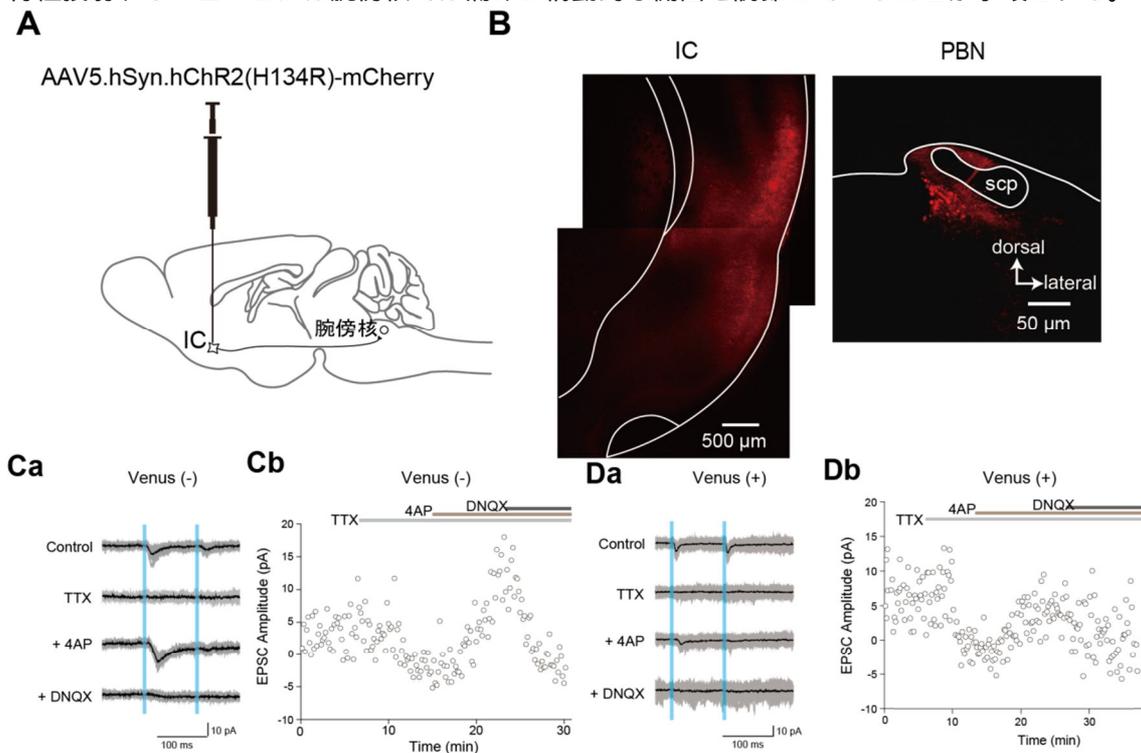


図2 ICニューロンから腕傍核ニューロンに対するシナプス応答の記録

A, ICにベクターを注入する模式図 B, ICと腕傍核の冠状断のスライス標本 赤色:mcherry Ca, 腕傍核のVenus陽性ニューロンから記録したICからのシナプス応答の記録 Cb, Caで記録したシナプス応答の振幅の時間経過 Da, 腕傍核のVenus陰性ニューロンから記録したICからのシナプス応答の記録 Db, Daで記録したシナプス応答の振幅の時間経過

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Hirose Kensuke, Nakaya Yuka, Kitano Kohei, Saito Yasuhiko, Kaneko Ryosuke, Yanagawa Yuchio, Yamamoto Kiyofumi, Shirakawa Tetsuo, Kobayashi Masayuki	4. 巻 473
2. 論文標題 Differential regulation of medium spiny and cholinergic neurons in the nucleus accumbens core by the insular and medial prefrontal cortices in the rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02634-y	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 Yamamoto Kiyofumi, Nakaya Yuka, Sugawara Shiori, Kobayashi Masayuki	4. 巻 1773
2. 論文標題 Synchronous inhibitory synaptic inputs to layer II/III pyramidal neurons in the murine barrel cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147686 ~ 147686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147686	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 Nakaya Yuka, Iwata Koichi, Kobayashi Masayuki	4. 巻 1804
2. 論文標題 Insular cortical descending projections facilitate neuronal responses to noxious but not innocuous stimulation in rat trigeminal spinal subnucleus caudalis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 148248 ~ 148248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2023.148248	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 Nakaya Yuka, Yamamoto Kiyofumi, Kobayashi Masayuki	4. 巻 164
2. 論文標題 Descending projections from the insular cortex to the trigeminal spinal subnucleus caudalis facilitate excitatory outputs to the parabrachial nucleus in rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pain	6. 最初と最後の頁 e157 ~ e173
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.pain.0000000000002755	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 -

1. 著者名 Kosukegawa Satoshi, Nakaya Yuka, Kobayashi Satomi, Kitano Kohei, Matsumura Sachie, Ogisawa Shohei, Zama Manabu, Motoyoshi Mitsuru, Kobayashi Masayuki	4. 巻 65
2. 論文標題 Insulin facilitates synaptic transmission via gap junctions between fast-spiking interneurons in the rat insular cortex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 77～80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.22-0438	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6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 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
研究協力者	小林 真之  (Kobayashi Masayuki)		
研究協力者	山本 清文  (Yamamoto Kiyofumi)		
研究協力者	岩田 幸一  (Iwata Kouichi)		

#### 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
---------	---------