

令和 5 年 6 月 6 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：2021～2022

課題番号：21K21077

研究課題名(和文)小児期の恐怖記憶によるストレスに起因する疼痛下行抑制系経路の可塑的变化

研究課題名(英文)Plastic modulation of descending pain system due to stress of fear memory in childhood

研究代表者

松村 幸恵 (MATSUMURA, Sachie)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：00906373

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：小児期の強制的な治療などの苦痛体験は、歯科恐怖症の既往歴で多くみられる。中脳水道灰白質(PAG)は疼痛抑制作用の他に不安、恐怖などの情動行動にも寄与していると考えられているが、ストレスとの関連については行動レベルでの報告はあるものの、神経メカニズムに関する知見は極めて乏しい。そこでラットのPAG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、光遺伝学的手法を用いて、PAGに投射するストレス関連脳領域の同定、神経活動の指標としてc-Fos陽性細胞数の定量的解析を行った。その結果、CTB陽性細胞は視床下部腹側核と扁桃体中心核のほか、島皮質など顎顔面領域の情報が入力する部位に認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児歯科診療において、歯科治療時の音や幼少時の治療の際の強制的な治療などの苦痛体験により不安や恐怖のストレスが増大すると、痛みを過敏に感じるといわれている。しかし、現状では心的ストレスと口腔領域における痛みを結びつける研究は極めて少ない。ストレス下では、神経伝達物質系および疼痛抑制系に変化が起き慢性疼痛を生じることが多いとされることから、疼痛下行抑制系を司るPAGに焦点を当て、実験を行った。この成果は、不安・恐怖ストレスが起因となって歯科恐怖症に苦しんでいる患者に対する新たな治療法の開発につながるものであり、生命の入り口である口腔内の健康、QOLの向上を通して社会に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：Many patients with dental phobia experience forced treatment during childhood. The periaqueductal gray (PAG) contributes to emotion such as anxiety and fear in addition to pain suppression. Although behavioral studies have been reported associating with stress, neurochemical mechanisms have been almost unknown. Therefore, in the present study we focused on the neural circuits of PAG in childhood. We used juvenile vesicular GABA transporter (VGAT)-Venus line A transgenic rats for the following optogenetic experiments. To identify projection neurons in the PAG, we injected cholera toxin subunit B into the PAG, and analyzed the number of c-Fos positive cells. As a result, CTB- and c-fos- immunopositive cells were found in the ventral hypothalamic nucleus and central amygdala, as well as in the insular cortex and medial prefrontal cortex, which are areas where orofacial sensations are processed.

研究分野：神経科学

キーワード：中脳水道灰白質 パッチクランプ 免疫組織学的解析 光遺伝学的手法

1. 研究開始当初の背景

小児期の必要以上に強い恐怖記憶の形成は、その後の生涯の歯科恐怖症を助長することにつながる可能性がある。歯科治療時特有の音や幼少時の強制的な治療などの苦痛体験は、歯科恐怖症の患者の既往歴で多く認められる。したがって、不安や恐怖を伴ったこれらの体験が引き金となり、その後の歯科恐怖の形成に影響を与えると推察される。

歯科恐怖症の患者は恐怖心により歯科治療が困難となり、症状が悪化した状態で初めて歯科医院を訪れることから、生活のQOLの低下とともに、口腔内の健康が著しく損なわれている可能性が報告されている (Shobenら 1954, Lauth 1971, 佐野ら 2001)。記憶形成や情動への関与には海馬や扁桃体で多く認められ、島皮質は、疼痛閾値の決定に重要であるだけでなく、不安や、恐怖記憶の形成にも関与している。中脳水道灰白質は、情動の中核とされるこれらの大脳辺縁系から、直接あるいは視床下部を介して入力を受け、疼痛抑制作用の他に不安・恐怖などの情動行動にも寄与していると考えられている (Greggら 2001)。中脳水道灰白質の疼痛抑制作用はよく知られており、中脳水道灰白質の腹外側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・熱刺激に対する逃避閾値が上昇し強い鎮痛作用が得られる事が明らかになっている (Taylorら 2019)。さらに、中脳水道灰白質の腹外側に存在するグルタミン性作動ニューロンの神経活動抑制が、下行性疼痛系が担う疼痛抑制効果を減衰させることが報告されている (Liu et alら 2020)。また、ラットに恐怖体験をさせた後、恐怖の到来を事前に予測できるようにすると、「扁桃体中心核 中脳水道周囲灰白質 吻側延髄腹内側部」回路が活性化し、さらなる恐怖記憶の形成を抑制することが報告されている (Ozawa et al. Nature Neuroscience, 2017)。近年では、強いストレスを与えた動物モデルに異常疼痛が生じた例が数多く報告されており、精神的ストレス負荷を与えられたラットでは、三叉神経脊髄路核尾側亜核における神経活動の亢進が報告されている (Nakataniら 2018)。これらのことから、幼少時の治療の際の強制的な治療などの苦痛体験などのストレスによって、疼痛制御に関与する中枢神経回路において変調が生じると、疼痛が増悪する可能性が示唆されるが、中脳水道灰白質の局所神経回路を明らかにした研究は未だ少なく、特に、心的ストレスと異常疼痛、特に口腔領域における痛みを結びつける研究は極めて少ない。ストレス下の抑うつ状態では、神経伝達物質系および疼痛抑制系に変化が起き慢性疼痛を生じることが多いとされることから、疼痛下行抑制系を司る中脳水道灰白質腹外側に焦点を当てて、実際の神経活動を検索し、ストレスが疼痛制御に関与する中枢神経回路に及ぼす変調を解明すれば、歯科恐怖症の新規治療開発につながると考え、本研究課題を申請するに至った。

2. 研究の目的

中脳水道灰白質は、疼痛抑制作用の他に不安・恐怖などの情動行動にも寄与していると考えられている。また、中脳水道灰白質の腹外側に存在するグルタミン性作動ニューロンの神経活動抑制が、下行性疼痛系が担う疼痛抑制効果を減衰させることが報告されている。しかし、中脳水道灰白質の局所神経回路を明らかにした研究は未だ少なく、特にストレスとの関連については行動レベルでの報告はあるものの、神経メカニズムに関する知見は極めて乏しい。本研究は、中脳水道灰白質に投射するストレス関連脳領域を同定し、中脳水道灰白質ニューロンに対するストレス関連領域からの投射によるシナプス応答を解析することによって、中脳水道灰白質のストレスによる痛み調節のメカニズムを明らかにすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

心理的に及ぼすストレスが疼痛抑制作用を担う腹外側中脳水道灰白質の興奮性シナプス後電位をどのように変化させるのか、以下の順で研究を行った。

- (1) 中脳水道周囲灰白質におけるコリン作動性ニューロンの形態や細胞学的特徴を把握するための免疫組織学的解析
ホールセル記録の際に使用する電極内液にバイオサイチンを添加して細胞をラベルする。続いて、ABC法やDABの発色を用いてバイオサイチンで標識した細胞を可視化した。
- (2) ストレス負荷時の腹外側中脳水道灰白質に投射ニューロンを送っている脳領域の検討
動物は、蛍光顕微鏡下で抑制性介在ニューロンが蛍光を発する遺伝子導入ラットのVGAT-Venusラットを用いた。ストレス負荷時に腹外側中脳水道灰白質に投射ニューロンを送っている脳領域について検討するために、VGAT-Venusラットの腹外側中脳水道灰白質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 μ 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、ストレス負荷時に腹外側中脳水道灰白質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。
- (3) c-Fos陽性細胞数の定量的解析
神経活動の指標としてc-Fos陽性細胞数の定量的解析を行い、脳内活動部位の同定と活性化の程度を解析した。動物はWistarラットを用い、ストレス負荷後に口腔顔面領域における

機械刺激疼痛閾値の低下したものについて、4%PFA で灌流固定し 40 μ m 厚みの脳標本を作成した。すべての観察は蛍光顕微鏡 (BZ9000, Keyence) を用いて行った。

4. 研究成果

(1)中脳水道周囲灰白質におけるコリン作動性ニューロンの形態や細胞学的特徴を把握するための免疫組織学的解析

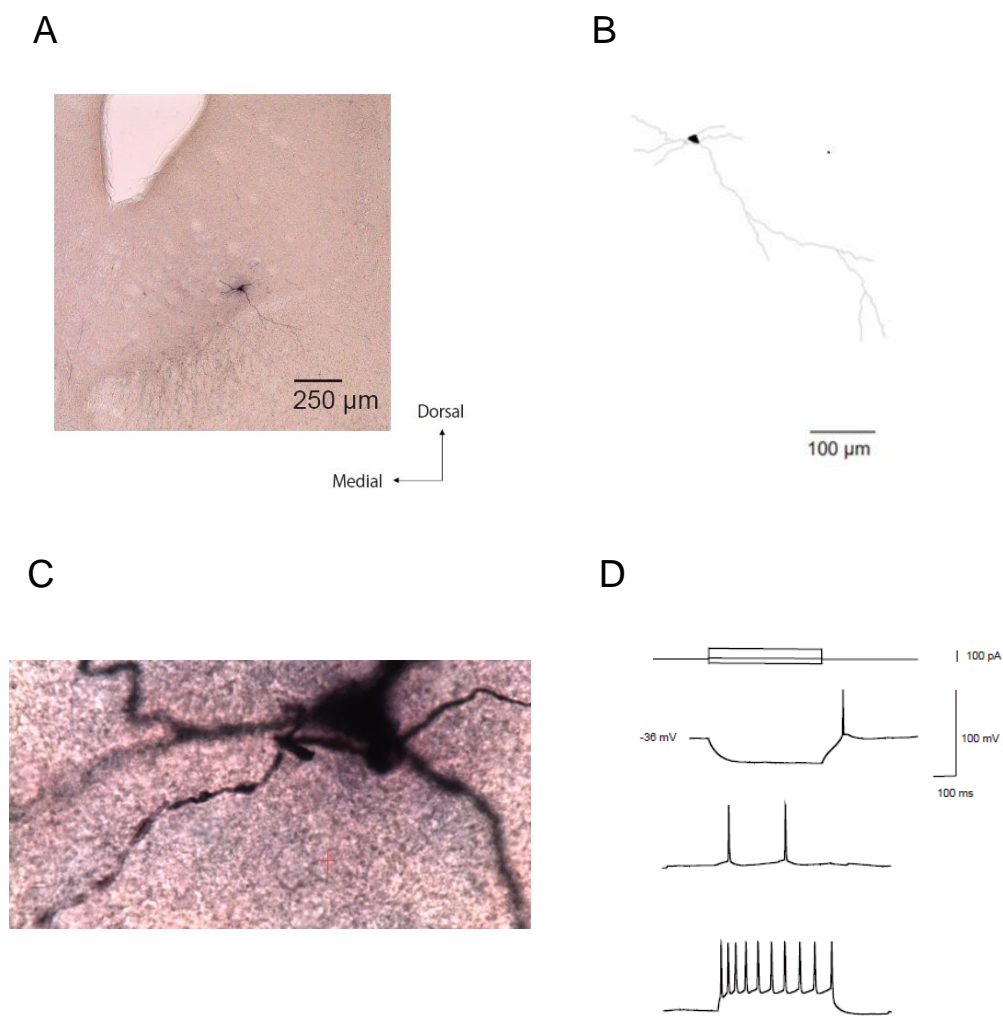


図 1 : 中脳水道周囲灰白質におけるコリン作動性ニューロンの形態や細胞学的特徴

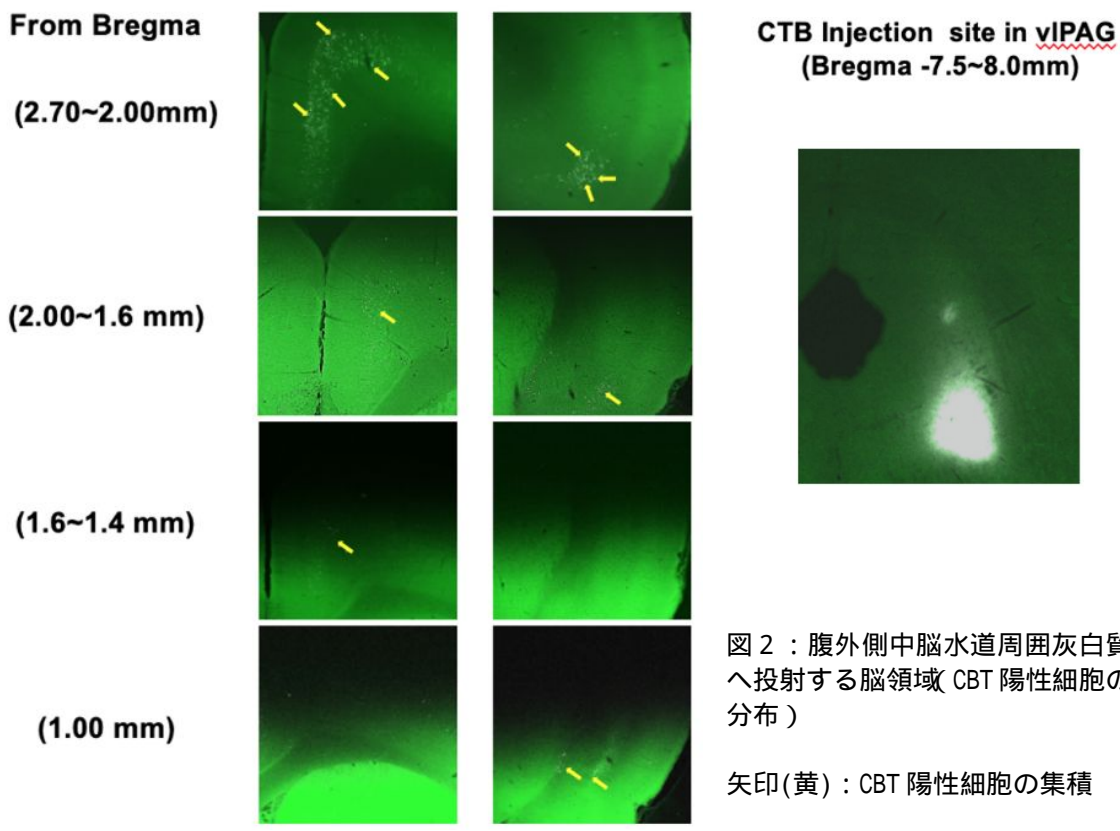
A: バイオサイチン染色像 倍率 4 倍レンズ像。

B: ニューロルシダによる再構築像。ChAT-tdTomato 陽性細胞のトレーシング。樹状細胞は黒、軸索を赤で示す。バイオサイチン染色像。

C: 軸索の bouton が倍率 100 倍の油浸レンズで明瞭に観察できる。

D: 発火パターン

(2) ストレス負荷時の腹外側中脳水道灰白質に投射ニューロンを送っている脳領域の検討
 CTB 陽性細胞は視床下部腹側核と扁桃体中心核のほか、島皮質や内側前頭前野の顎顔面領域の情報が入力する部位に認められ、腹外側中脳水道灰白質の吻尾側の違いによる投射元の違いは特に認められなかった。また、これら大脳皮質の CTB 陽性細胞は主に皮質第 1 層の内層である b 層に分布する大型錐体細胞が大部分を占めていた (図 2)。



(3) c-Fos 陽性細胞数の定量的解析

神経活動の指標として c-Fos 陽性細胞数の定量的解析を行った。その結果、ストレス処置群はコントロール群と比較した際に、中脳水道周囲灰白質における神経細胞の活性化状態に大きな違いは認められなかった。さらに、グリア細胞の活性化状態の評価として GFAP 発現を評価したが、アストロサイトの活性化状態については低下していることが示唆された (図 3)。

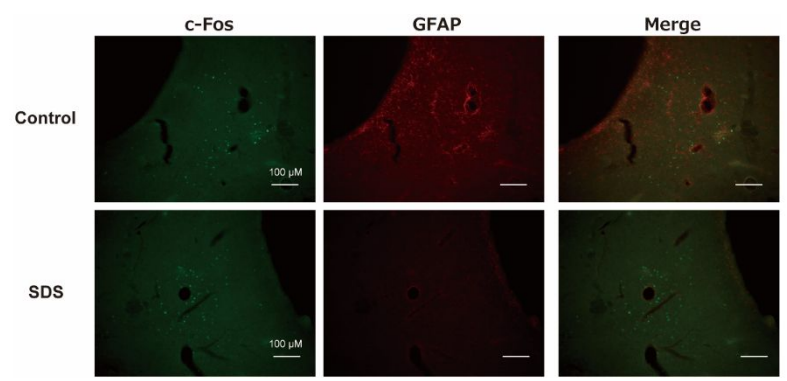


図 3 : 中脳水道周囲灰白質における神経細胞およびアストロサイトの活性化状態の一例

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 0件）

1. 著者名 Sugawara Shiori, Nakaya Yuka, Matsumura Sachie, Hirose Kensuke, Saito Yasuhiko, Kaneko Ryosuke, Kobayashi Masayuki	4. 巻 506
2. 論文標題 Neural Subtype-dependent Cholinergic Modulation of Neural Activities by Activation of Muscarinic 2 Receptors and G Protein-activated Inwardly Rectifying Potassium Channel in Rat Periaqueductal Gray Neurons	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1~13
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2022.10.012	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------