

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15206

研究課題名（和文）神経回路特異的遺伝子操作による2つの下行性疼痛制御系の相互作用解析

研究課題名（英文）Identification of interaction mechanisms of two descendign pathways using circuit specific gene manipulation methods

研究代表者

古賀 啓祐 (Keisuke, Koga)

兵庫医科大学・医学部・助教

研究者番号：50835189

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）：本研究では、吻側延髄腹内側部神経と青斑核の2つの下行性神経核の相互作用と受容体機構の解明を目的として研究を行った。青斑核神経は吻側延髄腹内側部に強い投射をもち、この神経回路を特異的に活性化させると熱刺激に対する鎮痛効果が得られた。さらに、この神経機構を検討する目的で、脊髄に投射する吻側延髄腹内側部神経からパッチクランプ記録を行ったところ、ノルアドレナリン処置により同神経が強い興奮を示すことが明らかとなった。さらに、薬理的な検討から上記神経応答に関与する受容体を特定した。本研究で見出した神経回路の内因性の疼痛制御における役割の詳細の解明により、新しい鎮痛薬開発の足がかりとなると考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳幹背側に位置するノルアドレナリン（NA）神経核のLCは、脊髄を含む様々な脳領域に投射し、覚醒や注意・意識・認知などの生理機能と疼痛の制御に関与する。近年、疼痛制御におけるLC神経の脊髄や前頭前皮質への神経投射特異的な役割が報告された。しかし、LC神経は下行性神経核である吻側延髄腹内側部（RVM）にも投射するがその疼痛制御における役割は解明されておらず、2つの下行性神経核の相互作用機序は依然として不明である。本研究は回路特異的な神経活動操作法によりLC-RVM神経回路の疼痛制御における役割を明らかにする研究であり、下行性疼痛制御回路を利用した新規の鎮痛薬の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Pain is an alert system in our body which notify potential or actual thread to us, but excessive pain significantly deteriorates our quality of life, and effective cares and treatments need to be developed. In this study, to identify new circuit mechanisms controlling pain, we focused on descending systems, especially on the rostral ventromedial medulla (RVM), the locus coeruleus (LC). We found that several LC neurons project to the RVM, and activation of this LC-RVM circuit decreased thermal pain sensitivity. We further investigated underlying molecular mechanisms of this behavior and performed patch-clamp recording from retrogradely labeled spinal cord (SC) projecting RVM neurons. (RVM-sc neurons). RVM-sc neurons exhibited depolarization and subsequent action potential firings by application of noradrenaline, and these responses were mediated a specific adrenergic receptor. These findings were crucial for development of new drugs for pain by using internal descending pathways

研究分野：疼痛学

キーワード：痛み 脊髄 青斑核 ノルアドレナリン 吻側延髄腹内側部

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みは生体の警告系として重要な役割を果たすが、過度な痛みや慢性痛は患者の QOL を著しく下げするため、適切なコントロールが必要である。痛みなど末梢からの感覚情報は脊髄後角内の神経回路において適切に処理されるが (Koch et al., Ann Reviews, 2017) 感覚は精神状態による影響を受けるなど中枢性の制御機構が存在して、脊髄後角神経活動を調節する脳から脊髄への下行性の入力に特に重要である。この内因性疼痛制御系の破綻が慢性痛などの異常な痛みとも関連し (Ossipov, J Clin Invest, 2010, Tan et al., Nat Rev Neurosci, 2021) 脳からのトップダウンシグナルによる主観的な痛みの調節に関する下行性疼痛制御系の全容の理解は、疼痛に対する有効な治療薬や新規鎮痛薬の開発において極めて重要な課題である。特に、脊髄に下行性の投射を持つ青斑核 (locus coeruleus; LC) や吻側延髄腹内側部 (Rostral ventromedial medulla: RVM) といった神経核は、痛みの入り口である脊髄へ脳から下行性に投射して痛みのコントロールに重要な役割を果たす。しかしながら、これらの下行性神経核の相互連関については不明な点が多い。特に LC 神経は RVM に対して強い投射を持つが、その役割は明らかでない。本研究では、上記 2 つの下行性神経核の相互作用とそのメカニズムを解析する。さらに下行性疼痛抑制系を利用した画期的な鎮痛薬や慢性疼痛の治療戦略の開発に繋がる知見を得る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、申請者が独自に開発した神経回路特異的活動操作技術等の様々な手法を駆使し、LC から RVM に投射する神経投射の疼痛制御における役割及び受容体メカニズムの詳細を解明することである。

3. 研究の方法

(1) LC RVM 神経回路の疼痛制御における役割解析

LC RVM 神経回路を特異的に操作する目的で、LC を含む NA 神経特異的に Cre 酵素が発現する dopamine-β-hydroxylase (Dbh)-Cre マウスを用いる。Cre 依存的に組み換え酵素の Flp を逆行性に発現するベクター (AAV2-retro-FLEX-Flp) を RVM にマイクロインジェクションし、LC に Flp 依存的な AAV ベクターを処置することで、LC RVM 神経特異的に興奮性の人工受容体である hM3Dq を発現させた。このように作製したマウスを用いて、hot-plate 法による熱刺激に対して逃避行動を示すまでの時間を saline 処置マウスと hM3Dq のリガンドである CNO を投与したマウスで比較した。また、von Fray 法により機械刺激に対する閾値の変化についても同様に比較した。

(2) RVM[→]脊髄神経に対する NA 作用の受容体メカニズムの解明

逆行性トレーサー (Retrobeads) を脊髄後角に処置して、脊髄に投射する RVM 神経を蛍光標識した。脳のスライス標本を用いて、標識された RVM 神経からパッチクランプ記録を行い、NA を処置した際の応答を記録した。

4 . 研究成果

(1) LC RVM 神経回路の疼痛制御における役割解析

Dbh-Cre マウスを用い、Cre 依存的に組み換え酵素の Flp を逆行性に発現するベクター (AAV2-retro-FLEX-Flp) を RVM にマイクロインジェクションし、LC に Flp 依存的な AAV ベクターを処置したところ、LC の一部の神経で hM3Dq の発現が確認された。さらに、この神経が侵害性熱刺激の制御に関与するのかを調べる目的で hot-plate テストを実施したところ、LC RVM 神経の特異的活性化は hot plate から逃避行動を示すまでの時間が延長して、LC RVM 神経回路が熱性疼痛に対して抑制的に働くことが示唆された。さらに、von Fray テストにより機械刺激に対する応答性の変化を調べたところ、LC RVM 神経の特異的活性化は機械刺激閾値に影響を与えなかった。すなわち、LC RVM 神経は特定の感覚様式特異的な制御に関与していることが示唆された。

(2) RVM[→]脊髄神経に対する NA 作用の受容体メカニズムの解明

逆行性トレーサーにより標識された RVM[→]脊髄神経からパッチクランプ記録を行い、NA を処置した際の応答を記録したところ、NA 処置により同神経の発火頻度が上昇するという結果が得られた。さらに、ある NA 受容体の阻害剤を用いて受容体サブタイプに特異的な阻害を行ったところ、RVM[→]脊髄神経のノルアドレナリン応答が著明に抑制された。

脳幹背側部に位置するノルアドレナリン (NA) 神経核の LC は、脊髄を含む様々な脳領域に投射し、覚醒や注意・意識・認知などの生理機能および疼痛制御に関与する。近年、疼痛制御における LC 神経の脊髄や前頭前皮質への神経投射特異的な役割が徐々に明らかとされているが、LC 神経の下行性神経核である RVM への投射の疼痛制御における役割は明らかにされていなかった。本研究では回路特異的な神経活動操作法により、LC[→]RVM 神経回路が内因性の鎮痛に重要であることを示した。本研究の成果は、下行性疼痛制御回路を利用した新規の鎮痛薬の開発に繋がることが期待される。

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 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Koga Keisuke, Kobayashi Kenta, Tsuda Makoto, Kubota Kazufumi, Kitano Yutaka, Furue Hidemasa	4. 巻 16
2. 論文標題 Voltage-gated calcium channel subunit $\alpha_2\text{-1}$ in spinal dorsal horn neurons contributes to aberrant excitatory synaptic transmission and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1099925
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnmol.2023.1099925	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 Ishibashi Tadayuki, Sueto Daichi, Yoshikawa Yu, Koga Keisuke, Yamaura Ken, Tsuda Makoto	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of Spinal Inhibitory Interneurons Required for Attenuating Effect of Duloxetine on Neuropathic Allodynia-like Signs in Rats	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 4051
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells11244051	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 Kanehisa Kensho, Koga Keisuke, Maejima Sho, Shiraishi Yuto, Asai Konatsu, Shiratori-Hayashi Miho, Xiao Mei-Fang, Sakamoto Hiroataka, Worley Paul F., Tsuda Makoto	4. 巻 13
2. 論文標題 Neuronal pentraxin 2 is required for facilitating excitatory synaptic inputs onto spinal neurons involved in pruriceptive transmission in a model of chronic itch	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-022-30089-x	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 該当する
1. 著者名 Koga Keisuke, Kobayashi Kenta, Tsuda Makoto, Pickering Anthony E., Furue Hidemasa	4. 巻 7
2. 論文標題 Anterior cingulate cross-hemispheric inhibition via the claustrum resolves painful sensory conflict	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-024-06008-9	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 該当する

1. 著者名 Fujiwara Yuka, Koga Keisuke, Nakamura Nozomu H., Maruo Keishi, Tachibana Toshiya, Furue Hidemasa	4. 巻 242
2. 論文標題 Optogenetic inhibition of spinal inhibitory neurons facilitates mechanical responses of spinal wide dynamic range neurons and causes mechanical hypersensitivity	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	6. 最初と最後の頁 109763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2023.109763	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7件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Keisuke Koga, Kenta Kobayashi, Makoto Tsuda, Kazufumi Kubota, Yutaka Kitano, Hidemasa Furue
2. 発表標題 2 -1 expressed in spinal dorsal horn excitatory neurons contributes to nerve injury-induced neuropathic pain.
3. 学会等名 Neuro 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keisuke Koga, Kenta Kobayashi, Makoto Tsuda, Kazufumi Kubota, Yutaka Kitano, Hidemasa Furue
2. 発表標題 脊髄後角神経に発現する 2 -1サブユニットの神経障害性疼痛における役割
3. 学会等名 生理学研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Koga, Kenta Kobayashi, Makoto Tsuda, Kazufumi Kubota, Yutaka Kitano, Hidemasa Furue
2. 発表標題 2 -1 expressed in spinal dorsal horn neurons is involved in aberrant excitatory synaptic transmission and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury.
3. 学会等名 第100回生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 古賀 啓祐、小林 憲太、津田 誠、窪田 一史、北野 裕、古江 秀昌
2. 発表標題 脊髄後角興奮性神経に発現する α_2-1 サブユニットの機械性痛覚過敏における役割解明
3. 学会等名 第101回 生理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古賀 啓祐, 古江 秀昌
2. 発表標題 疼痛制御に関与する新たな中枢神経機構の探索と役割解明
3. 学会等名 痛み研究会2023 (招待講演)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 古賀 啓祐、小林 憲太、津田 誠、窪田 一史、北野 裕、古江 秀昌
2. 発表標題 神経障害性疼痛における脊髄後角神経に発現する α_2-1 サブユニットの役割
3. 学会等名 第45回日本疼痛学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Keisuke Koga, Kenta Kobayashi, Makoto Tsuda, Kazufumi Kubota, Yutaka Kitano, Hidemasa Furue
2. 発表標題 Involvement of the voltage-gated calcium channel subunit, α_2-1 , expressed in spinal dorsal horn excitatory neurons for facilitation of excitatory synaptic transmission and mechanical hypersensitivity after peripheral nerve injury.
3. 学会等名 Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023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			
英国	ブリストル大学			