

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20699

研究課題名（和文）外側腕傍核を切り口とした痛覚回路による炎症/抗炎症応答制御メカニズムの解明

研究課題名（英文）Inflammation/anti-inflammatory regulation by lateral parabrachial nucleus

研究代表者

松田 烈士（MATSUDA, Tsuyoshi）

関西医科大学・医学部・研究員

研究者番号：50952347

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000 円

研究成果の概要（和文）：覚醒非拘束の動物で外側腕傍核（LPB）の神経活動をリアルタイムに計測する実験系を確立した。その結果、炎症誘発物質と抗炎症誘発物質ではそれぞれLPBのカルシウム動態に与える影響が異なる可能性が見出された。そこで、神経活動依存のプロモーターを用いた機能的標識法を確立することで、炎症応答時/抗炎症応答時に活動を示したLPB神経集団を特異的に観察・操作しようと考えた。しかし、投与の際の保定や注射そのものによる刺激によって望まない標識が生じてしまうという問題が発生した。条件検討の結果、目的外な標識が大きく抑制されたものの、条件検討に想定以上の時間を要してしまい、当初の計画達成までには至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではLPBが全身の炎症反応/抗炎症反応に応じて異なるCa<sup>2+</sup>動態を示すことを報告した。疼痛関連領域であるLPBが炎症状態のみならず、抗炎症状態までも感知するという事実はいまだ知られておらず、中枢神経系を介した新しい免疫系への介入戦略を構築する上で重要な意味をもつと期待される。また、LPBは痛みに加え、呼吸・循環・体温・味覚等の多岐にわたる感覚情報の入力を受ける場であることから、本研究で確立を試みたLPBの標識技術は他領域の研究においても活用できる技術である。

研究成果の概要（英文）：We established an experimental system to measure neural activity in the lateral parabrachial nucleus (LPB) in real-time in awake, unrestrained animals using Ca<sup>2+</sup> imaging. The results suggested that inflammatory and anti-inflammatory substances might differently affect Ca<sup>2+</sup> dynamics in the LPB. As the LPB is molecularly and functionally heterogeneous, these phenomena might be due to differences in observed neural populations. Therefore, we aimed to observe and manipulate LPB neurons active during inflammatory or anti-inflammatory responses using activity-dependent promoter. However, unwanted labeling occurred due to the restraint and injection, as the LPB is strongly activated by pain and fear stimuli. Although non-specific labeling was significantly reduced after optimizing conditions, the process took longer than expected, and we did not fully achieve the initial plan.

研究分野：神経化学

キーワード：外側腕傍核 カルシウムイメージング 炎症制御

## 1．研究開始当初の背景

痛みは生物が環境や状況に応じて適切な行動を引き起こすために必要な警告信号であり、生体防御において重要な役割を担っている。最近では痛覚神経が皮膚や臓器の免疫細胞と密接に相互作用し、全身機能にも大きく関与していることが報告され、古典的に考えられていたものよりも広い意味での生体防御における痛覚の新しい役割が明らかになってきている。このような背景から、近年の痛覚研究は感覚そのものの仕組みやその破綻による病態の解明にとどまらず、痛覚回路による免疫系の新たな動作原理とその原理に基づく免疫系への介入方法の確立を目指した研究が進展している（**Baral et al., Nat. Rev. Immunology. 2019**）。

研究代表者はこれまで、末梢組織の炎症時に、脳幹から脊髄後角へと下行性に投射するノルアドレナリン神経が脊髄後角アストロサイトを介して痛覚過敏を引き起こすことを明らかにしてきた（**Kohro\*, Matsuda\*, Yoshihara\* et al., Nat Neurosci. 2020, \*equal contributors**）。このことは末梢神経-脊髄-脳という大きな回路が炎症時の局所組織における疼痛閾値を制御していることを示している。痛覚回路が全身のさまざまな生理機能を制御していることを踏まえると、痛覚回路の中には、痛覚閾値の制御を行うだけでなく、全身の炎症状態を感知し、身体を適切なモードへ切り替えるための領域が存在するのではないかと考えた。痛覚情報を直接的・間接的に受容する脳領域は広範にわたる上、多くの場合、機能的にも分子的にもヘテロな細胞集団から構成されている。したがって、上記の仮説を検証するためには、どの領域に着目するのか、ヘテロな細胞集団から特定機能に関与する神経回路をどのように区別し解析するか、の2点を解決することが重要となる。

## 2．研究の目的

代表者は予備実験の中で、脊髄後角表層からの投射を直接受ける脳領域である外側腕傍核（**LPB**）が全身の炎症/抗炎症状態に応じて異なる神経活動パターンを示す可能性を見出した。**LPB**は痛みに加え、呼吸・循環・体温・味覚等の多岐にわたる感覚情報の入力を受ける場であり、機能的・分子的にヘテロな神経集団から構成されている。本研究課題では、神経活動依存的なプロモーターを用いた機能的標識技術を **LPB** へと応用し、**LPB** 内に存在するヘテロな細胞集団から、特定の機能に関与する集団を区別し、操作・観察する解析するための基盤技術の開発を行う。

## 3．研究の方法

### （1） **LPB** 神経の $\text{Ca}^{2+}$ イメージング

予備実験での結果は少数の動物を用いて得られたものであるため、再現性を確認するための検討を実施した。また、再現性確認を行う中で、**LPB** の *in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法のプロトコルの改良を行い、安定的にデータを取得できる体制を構築した。**LPB** の *in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングは、次の手順で行った。まず、**AAV-hSyn-GCaMP6f** を **LPB** へと微量投与した動物を作製した。**AAV** 投与から2週間程度経過した動物の **LPB** へと **GRIN** レンズを埋め込んだ。**Miniscope** を取り付けるためのベースプレートと **GRIN** レンズは、**3D** プリンタで作製した専用の治具で連結し、デンタルセメントを用いてベースプレートをマウスの頭蓋骨へと固定した。レンズの埋め込みから少なくとも3週間のリカバリー期間を経た後、覚醒自由行動下のマウスにて *in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った。

### （2）神経活動依存的な **LPB** 神経標識技術の確立

特定の刺激に伴い活動を示した神経細胞だけを操作・観察することで、**LPB** 機能をより詳細に解析することができる。そこで、任意の刺激に応じて活性化した **LPB** 神経のみを標識する技術の開発を行った。神経活動依存のプロモーター **F-RAM** の制御下でレポーターたんぱく質を発現するようなアデノ随伴ウイルス（**AAV**）を作製し、マウス **LPB** へと投与した。その後、炎症作用/抗炎症作用を有する化合物、もしくは溶媒をマウスに腹腔投与し、数日後に **LPB** 神経におけるレポーターたんぱく質の発現を確認した。**AAV** に搭載する遺伝子をレポーターたんぱく質

から  $\text{Ca}^{2+}$  センサーや **DREADD** に置き換えることで、標識した神経集団を操作・観察することが可能となる。

#### 4. 研究成果

(1) **AAV** を微量投与することで、 $\text{Ca}^{2+}$  センサー-**GCaMP6f** を **LPB** の神経細胞に発現させたマウスを作製した。作製したマウスを用いて、覚醒自由行動下で **LPB** の *in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージングを行った。予備試験結果と一致して、全身炎症を誘導する物質と、抗炎症状態を誘導する物質をそれぞれマウスに腹腔内投与した場合で、**LPB** 神経は異なる活動パターンを示した。また、**LPB** イメージングを行うには、事前に **GRIN** レンズを埋込み、3週間以上のリカバリー期間を経た後に観察を行うのだが、観察前にレンズが外れてしまうことがあった。このことは、実験の成功率を低下させる大きな要因となっていた。頭蓋骨に小さなねじを取り付け、固定を強固なものにすることでレンズが外れなくなり、実験成功率が向上した。

(2) 神経活動依存的プロモーター**F-RAM** を用いて、**LPB** 内の特定神経集団を標識することを検討した。所属研究室では、**AAV-hSyn-DIO-mCherry**, **AAV-hSyn-DIO-hM3Dq**, **AAV-hSyn-DIO-GCaMP6f** などの各種ウイルスベクターを既に保有していたことから、**F-RAM** プロモーターの制御によって神経活動依存的に **Cre** を発現する **AAV** を作製した。まずはじめに、作製した **AAV** と **AAV-hSyn-DIO-mCherry** の2種類を混合して使用することで、炎症/抗炎症誘導薬剤投与で活動する **LPB** 神経集団の標識を試みた。しかし、**Cre** はわずかな発現量であっても機能するたんぱく質であるからか、炎症/抗炎症を誘導する薬物の投与を行わない動物でも、多くの **LPB** 神経でレポータータンパク質の発現が観察された。おそらく自発的な神経活動や飼育中に受ける環境刺激（音や動物舎へのヒトの出入りに伴うなんらかの影響）により、目的外の神経が標識されてしまったものと推測している。このため、**Cre** の部分を発現させたい遺伝子に置換した **AAV** を作製し直し、再度検討を行った。

神経活動プロモーター制御下で赤色蛍光たんぱく質 **mKate** を発現するような **AAV** をマウス **LPB** へと微量投与し、抗炎症作用を誘導する薬物または溶媒を腹腔内投与することで、**LPB** 神経を標識した。このとき、上述した問題が解消されるか否かを確認するために、薬物を処置しない動物も同時に作製した。薬物も溶媒も投与しなかった無処置マウスでは、蛍光たんぱく質の発現がほとんど誘導されないことから、神経の自発活動や環境刺激由来（と推測する）の標識が起こるという問題は解決できた。しかし、溶媒投与群では薬物処置群よりは少ないものの、**LPB** で蛍光たんぱく質の発現が誘導された。**LPB** はストレス刺激により活動する脳領域であることから、注射そのものによる痛み刺激や、保定によるストレスによって神経活動が生じてしまったのだと考えられる。そこで、投与する **AAV** の **titer**、飼育中におけるストレスになりうるもの（音や実験者の立ち入り頻度など）を徹底的に排除する、事前に一定期間のハンドリングを施す、イソフルラン麻酔下で薬物投与をする、といった条件検討を行った。これらの試みにより、溶媒投与によって生じてしまっていた目的外の神経標識が大きく抑制された。しかし、条件検討に想定以上の時間を要してしまい、当初の計画と比べて大幅な遅れが生じた。今後は、*in vivo*  $\text{Ca}^{2+}$  イメージング法で標識した神経集団の観察を行うとともに **DREADD** 技術で操作することで、炎症/抗炎症制御における **LPB** の役割を解明する。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1．発表者名 松田烈士、小早川令子、小早川高
2．発表標題 グリア摂動による新たな休眠様低代謝状態誘導法の開発
3．学会等名 第97回日本薬理学会年会
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
---------	---------