

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：83903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06935

研究課題名（和文）進化的に保存された神経ペプチドによるショウジョウバエの中枢性侵害受容制御機構

研究課題名（英文）Central regulatory mechanisms of *Drosophila* nociception mediated by an evolutionarily conserved neuropeptide

研究代表者

本庄 賢 (Honjo, Ken)

国立研究開発法人国立長寿医療研究センター・研究所 認知症先進医療開発センター・研究員

研究者番号：50731866

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトの「痛み」という複雑な感覚の制御機構を解明していく上では、様々なモデル動物の利点を生かしたアプローチが必要と考えられる。しかし、ヒトや哺乳類で見られる中枢性の疼痛シグナル制御メカニズムが、非哺乳動物モデルでどれほど保存されているかはほとんど明らかになっていない。本研究はショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) の優れた神経遺伝学的実験ツールを駆使した研究から、ショウジョウバエの脳に、ヒトを含む哺乳類の疼痛制御で重要な役割を果たす下行性侵害受容抑制のメカニズムの存在を見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はヒトや哺乳類で疼痛制御に重要な役割を果たす下行性侵害受容抑制のメカニズムを、史上初めて哺乳類以外の動物に発見したものである。昆虫であるショウジョウバエと哺乳類との間で下行性侵害受容抑制のメカニズムが分子レベルで保存されているという本研究で明らかとなった事実は、脳の下行性侵害受容抑制機能が脊椎動物と無脊椎動物の共通祖先で生じたという新しい仮説を提唱するものである。また本研究の成果は、ショウジョウバエなどの無脊椎動物が痛覚の中枢性制御の研究においてもモデルとして利用できる可能性を支持するものである。

研究成果の概要（英文）：Using various model organisms should be beneficial to elucidate the complex control mechanisms of human pain. However, it has been largely unclear whether and to what extent the pain signaling control mechanisms found in the central nervous system of humans and mammals are conserved in non-mammalian animals. Using powerful neurogenetic experimental tools in the fruit flies (*Drosophila melanogaster*), this study has successfully identified the presence of descending nociceptive control mechanisms in the *Drosophila* brain, which play an important role in pain control of mammals including humans.

研究分野：神経生物学

キーワード：痛覚 下行性抑制 侵害受容 コレシストキニン 神経ペプチド ショウジョウバエ

1. 研究開始当初の背景

痛みは我々の社会生活に重大な影響をもたらすことから、そのコントロールを目指したメカニズム解明には長年に渡る研究努力が注がれてきた。しかし、痛みは脳内ではっきりした処理中枢を持たず、広い脳領域での分散的情報処理に依存するという、他の感覚系にはない複雑性を有する感覚である(Legrain et al., 2011)。その複雑性から、ヒト、そして哺乳類の複雑な神経系における痛みの分子神経メカニズムの解明は、未だに挑戦的な課題として残されている。

神経系の単純性や優れた遺伝学的実験ツールなどの利点を生かし、非哺乳類モデル系を用いて痛みの複雑なメカニズムを解き明かしていこうというアプローチが、近年盛んにとられるようになってきた。ショウジョウバエは単純な神経構造を有し、他のモデル動物にはない卓越した神経遺伝学的実験ツールを適用できる。さらに、熱や強い機械刺激など組織損傷の可能性のある刺激に特異的な侵害受容反応が見られることから、痛覚の研究においての利用が拡大している(Tracey, 2017)。ショウジョウバエを用いた遺伝子探索からは、実際にヒトや哺乳類の痛みシグナル伝達制御に関与する可能性の高い新規分子が多数同定されており(Neely et al., 2010; Honjo et al., 2016)、ショウジョウバエは我々の痛みのメカニズムの理解を進める上で有用なモデル動物であると考えられる。

しかし、非哺乳動物モデルの痛覚研究上の限界、すなわち非哺乳動物にどこまでヒトと同様の侵害感覚情報処理機構が存在するかという点は、理解が進んでいない(Rose et al., 2014; Sneddon et al., 2014)。ヒトとの間で神経系の構造的相同性が低い非哺乳動物や無脊椎動物においては、神経系の解剖学的特徴から機能的保存性を推測することが困難である。さらに、非哺乳類モデルを用いた侵害受容の研究例は哺乳類モデルに比べまだまだ圧倒的に少ない(Sneddon et al., 2014)。非哺乳動物の中で最も侵害受容研究が進んでいるショウジョウバエにおいても、ほぼ全ての研究が末梢の侵害受容器機能に注目して進められており、中枢神経系における侵害感覚制御機構の知見は、本研究開始時において知る限り一切得られていなかった。

2. 研究の目的

ショウジョウバエに哺乳類で見られるような中枢神経系での痛覚制御機構が存在するかどうかは、未知の問題である。そこで本研究はショウジョウバエの単純な中枢神経系に、ヒトと同様痛覚の中枢性制御機構が存在するかという問いを追及していく。

これまでの研究から、我々はショウジョウバエの神経ペプチドである Drosulfakinin (DSK) が、中枢性制御系としてショウジョウバエの侵害受容抑制に関わる可能性を見出してきた。DSK の哺乳類ホモログであるコレシストキニンは、脳からの下行性痛覚制御に重要な役割を果たしていることがヒトやげっ歯類で知られている。しかし、DSK の中枢性制御系としての機能を示唆するこれまでに得られた証拠は、侵害受容の抑制制御に関わると考えられる DSK の分泌細胞が中枢神経系のみで局在し、その受容体が末梢の侵害受容器に見られないという解剖学的知見のみであり、本当に DSK シグナル系が中枢性制御系としての役割を持つかという、直接的な機能的証拠は得られていない。そこで本研究では、ショウジョウバエの細胞特異的な遺伝子・神経機能制御ツールを利用し、DSK シグナルの作用経路、すなわち DSK がどの細胞から分泌され、どの細胞のどの受容体に作用し、どのような細胞機能調節を通じて侵害受容を制御するかを明らかにし、その中枢性の侵害受容制御系としての機能を確認することを目的とする(図1)。

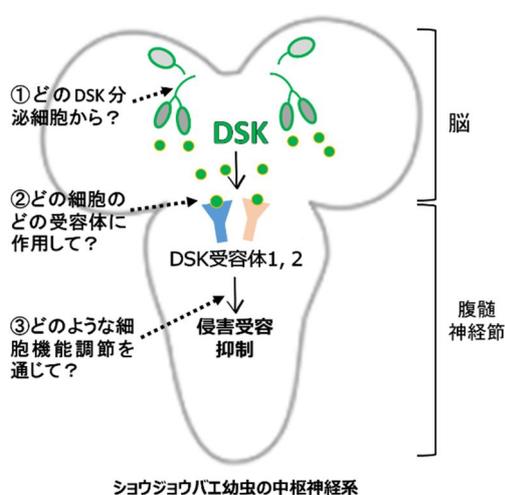


図1. これまでの研究から想像される DSK シグナルによる中枢性の侵害受容制御経路と、本研究で明らかにしていく問題点。

3. 研究の方法

1. 侵害受容抑制に関わる DSK 分泌細胞の特定

DSK 発現細胞は全て脳に局在しており、この細胞群の中に侵害受容抑制に機能的に関わる DSK 分泌細胞が含まれていると考えられる。そこで、細胞特異的 RNAi による DSK

ノックダウン、アポトーシス誘導ツールを利用した細胞除去などを用いて、脳の DSK 発現細胞の中から機能的に侵害受容抑制に関わるものを絞り込む。DSK 遺伝子の欠失変異体が顕著な熱侵害受容過敏表現型を示すことから、DSK 分泌細胞の中で侵害受容抑制に重要な細胞が機能阻害を受けた場合には、欠失変異体同様の熱侵害受容過敏の表現型が見られるはずである。我々は、予備探索により脳の全ての DSK 発現細胞を標識できる GAL4 系統と、その一部のみをラベルできる GAL4 系統をそれぞれ見出した。そこで、これらの発現パターンの異なる DSK 発現細胞 GAL4 系統を利用して DSK ノックダウンまたは細胞除去を行い、侵害熱応答への影響を観察することで侵害受容抑制に機能的に関わる分泌細胞を特定する。

2. DSK が侵害受容抑制において作用する DSK 標的細胞の特定

DSK 受容体の変異体が DSK 変異体と同じ熱侵害受容過敏の表現型を示したことから、侵害受容抑制において DSK が作用する細胞は、DSK 受容体発現細胞の中に含まれている可能性が高い。そこで、DSK 受容体ノックインレポーターを用いた二重標識実験に寄る探索などにより、侵害受容抑制に関わる DSK 標的細胞の絞り込みを行う。

3. 生体内 Ca²⁺イメージングによる DSK が侵害受容抑制の際に引き起こす細胞機能調節の実体解明

DSK や受容体の変異体が熱侵害受容過敏の表現型を示すことから、DSK は標的細胞で発現する DSK 受容体に作用し、標的細胞の細胞機能を活性化または抑制することで、最終的に侵害受容神経回路のどこかでの神経活動抑制に関与しているものと推測される。従って、DSK や受容体の欠失変異体では、侵害受容神経回路のどこかで、行動レベルでの侵害受容過敏の原因となる神経活動の異常亢進が生じているものと予想される。申請者はこれまでに、幼虫の中樞神経系で侵害受容神経系の熱刺激応答を観察・定量可能な生体内 Ca²⁺イメージング法を開発してきた(Burgos et al., 2017; Honjo and Tracey, 2018)。そこでこの技法を用い、侵害受容神経回路でのシグナル伝達を可視化しながら、DSK シグナル系が侵害受容抑制の際に引き起こしている細胞機能調節の正体を解明していく。

4. 研究成果

1. 侵害受容抑制に関わる DSK 分泌細胞の特定

DSK 分泌細胞の特定に関しては、DSK 遺伝子へのノックインレポーター系統が公開され使用可能になったこと(Deng et al., 2019)、これを用いて DSK の分泌細胞が幼虫の脳の中の MP1 と Sv という 2 種類のニューロンに限られるという強い証拠を得ることができた。このノックインレポーター系統の発現パターンと、下記 2. の解析の結果明らかになった標的細胞との接続性の検討、そしてノックインレポーター系統を用いた DSK 発現細胞の人為発火実験などの結果から、脳で DSK を発現する 2 種類のニューロングループの内、MP1 ニューロンが DSK シグナルを介した下行性侵害受容抑制に機能している可能性が高いということを明らかにすることができた。

2. DSK が侵害受容抑制において作用する DSK 標的細胞の特定

DSK 受容体ノックインレポーター系統を用いた二重標識実験により、既知の幼虫の侵害受容関連ニューロンの中から DSK 受容体を発現するものを探索し、侵害受容 4 次ニューロンである Goro ニューロンで DSK 受容体の発現が見られることを発見した。さらに DSK 受容体 RNAi を用いたノックダウン実験では、この Goro ニューロンでの DSK 受容体 CCKLR-17D1 のノックダウンが熱侵害受容過敏を引き起こすことがわかった。

3. 生体内 Ca²⁺イメージングによる DSK が侵害受容抑制の際に引き起こす細胞機能調節の実体解明

上記 2. で見出した Goro ニューロンの侵害熱刺激への応答性を生体内 Ca²⁺イメージングにより観察したところ、CCKLR-17D1 を欠失させた場合や、RNAi でノックダウンした場合には 40 以上の温度域に対する応答性が顕著に過敏化することがわかった。さらに CaMPARI2 を用いた神経活動スナップショットイメージングによって DSK 発現脳ニューロンを活性化した際の Goro ニューロンの活動を可視化したところ、DSK 発現ニューロンの活動が幼虫の個体レベルの熱侵害受容応答を抑制すると同時に、Goro ニューロンの活動も抑制しているということが明らかになった。

以上の結果から、DSK は 脳の DSK 分泌性の下行性ニューロンである MP1 ニューロンと Sv ニューロンから分泌され 腹髄に存在する Goro ニューロンの CCKLR-17D1 受容体に作用し、Goro ニューロンの活動抑制を通じて侵害受容を制御している可能性が高い、というモデルを示すことができた。本研究成果の主要な部分はショウジョウバエ、

そして非哺乳動物における下行性侵害受容抑制系の存在を世界で初めて示した報告として、eLife 誌に掲載が決定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 2件）

1. 著者名 Izumi Oikawa, Shu Kondo, Kao Hashimoto, Akiho Yoshida, Megumi Hamajima, Hiromu Tanimoto, Katsuo Furukubo-Tokunaga, Ken Honjo	4. 巻 -
2. 論文標題 A descending inhibitory mechanism of nociception mediated by an evolutionarily conserved neuropeptide system in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.85760	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 Izumi Oikawa, Shu Kondo, Kao Hashimoto, Akiho Kashiwabara, Hiromu Tanimoto, Katsuo Furukubo-Tokunaga, Ken Honjo	4. 巻 -
2. 論文標題 A descending inhibitory mechanism of nociception mediated by an evolutionarily conserved neuropeptide system in <i>Drosophila</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2022.03.08.483420	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Honjo, K., Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K.
2. 発表標題 A descending inhibitory mechanism of nociception evolutionarily conserved in <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 第45回日本基礎老化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 Descending inhibition of nociception mediated by an evolutionarily conserved neuropeptide system in <i>Drosophila</i>
3. 学会等名 JDRC14
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in <i>Drosophila</i> nociception
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会・ワークショップ「広がる感覚器の世界・感覚器の多様性を生み出す分子基盤とヒト健康維持への応用」(招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in <i>Drosophila</i> nociception
3. 学会等名 第43回神経科学学会大会・シンポジウム「五感の情報処理 ~感覚情報処理機構の統一的理解に向けて~」
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 An evolutionarily conserved neuropeptide pathway that negatively regulates nociception in <i>Drosophila</i> .
3. 学会等名 Neuro2019 (第42回日本神経科学学会大会・第62回日本神経化学学会大会 合同大会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in <i>Drosophila</i> nociception.
3. 学会等名 The 48th Naito Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Oikawa, I., Kondo, S., Kashiwabara, A., Hashimoto, K., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. and Honjo, K.
2. 発表標題 A neuropeptide-mediated descending inhibitory pathway in Drosophila nociception.
3. 学会等名 International Workshop on Frontiers in Defensive Survival Circuit Research (国際学会)
4. 発表年 2020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