

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：34519

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19460

研究課題名（和文）慢性疼痛が惹起する精神疾患を司る皮質下皮質の局所神経回路

研究課題名（英文）Mechanisms of persistent pain induced negative emotion on subcortical-cortical projections

研究代表者

古賀 浩平（Koga, Kohei）

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50768455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）： 持続痛が引き起こす不安やうつなどの負の情動は精神疾患の主症状であるが、持続痛による負の情動を形成するシナプス可塑性の投射選択性及び分子機構は未解明である。

本研究では、痛みの感覚入力と情動に關係する前帯状回に着目し、前帯状回に投射する視床と扁桃体に光感受性チャンネル（ChR2）を組み込んだAAVをマウスにそれぞれ局所投与した後に脳スライス標本作製した。そして、前帯状回第II/III層の錐体細胞から記録を行い青色光を照射して投射選択的なシナプス伝達を解析した。さらに、視床-前帯状回の投射を光遺伝学で頻回刺激した時の情動行動、特に不快行動と疼痛関連行動を調べた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床において持続的な痛みによって不安やうつ症状を患う患者さんは多いが、原因となる脳内シナプス可塑性、神経回路、分子機構は未解明のままである。本研究では、痛みの感覚入力と負の情動に關係する前帯状回に着目し、前帯状回に投射する視床からのシナプス伝達が持続痛モデルマウスで活性化することが明らかとなった。また、視床-前帯状回の投射を頻回刺激すると嫌悪行動を促進したことから、今後、この視床-前帯状回に着目したシナプス可塑性の異常を改善する仕組みを明らかにすると痛みによる精神疾患の解明につながる。

研究成果の概要（英文）： Persistent pain often causes negative emotions including anxiety and depression. However, the mechanisms of synaptic plasticity on selective projection are unknown. Here, we focused on the anterior cingulate cortex which is important for sensory and emotional aspect of pain. We injected adeno associated virus with channelrhodopsin 2 (ChR2) in the thalamus or amygdala which project to the ACC reciprocally. After 3-4 weeks of the injection, we made brain slices to record pyramidal neurons in layer II/III from the ACC and stimulate the selective projections with blue light. Furthermore, to understand the functional roles of the selective projections to the ACC, we stimulated bilateral projections of the thalamus-ACC by optic fibers in the ACC. Repetitive stimulations of thalamus-ACC, but not amygdala-ACC projections showed negative emotion and pain-related behavior.

研究分野：疼痛

キーワード：情動 前帯状回

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

精神疾患は、持続的な感覚入力や様々なストレスが原因となってシナプス伝達や神経回路に異常を示し、負の情動を形成した結果生じる。特に、慢性疼痛による負の情動は、不安やうつなどの原因になるが、痛みが負の情動を形成するシナプス可塑性の分子機構は不明である (Bushnell et al., Nature Rev Neurosci, 2013)。申請者はこれまでに、痛みと情動を司る前帯状回に着目し、興奮性シナプス前終末の長期増強 (presynaptic long-term potentiation: pre-LTP) が不安のシナプス可塑性であることを明らかにしてきた (Bliss et al., Nature Rev Neurosci, 2016; Koga et al., Neuron, 2015; Koga et al., J Neurosci, 2015; Koga et al., J Neurosci, 2017)。また、疼痛モデル動物の前帯状回の抑制性シナプス伝達は減弱することを報告してきた (Koga et al., Mol Pain, 2017; Koga et al., Mol Pain, 2018; Koga et al., Brain Res, 2019)。これらの結果は、慢性疼痛が前帯状回の神経回路を破綻させる可能性を示唆している。そして、この異常な神経回路の解明が精神疾患を紐解く基盤になると考え、慢性疼痛による負の情動がいかに精神疾患に進行していくかを学術的な問いに設定した。

### 2. 研究の目的

前帯状回に投射するどのシナプス伝達が疼痛モデルで可塑的な変化を示すかの投射選択性の解析を中心に、以下(1-3)の項目について調べた。(1) 前帯状回に投射する選択的なシナプス伝達を解明するために光遺伝学的手法を用いて、それぞれのマウスに視床、前部島皮質もしくは扁桃体外側基底核にチャンネルロドプシン (ChR2) を組み込んだアデノ随伴ウイルス (AAV) を投与した。AAV の感染を確認した後に脳スライス標本を作製し、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞から記録した時に光刺激に同期するシナプス伝達と非同期的なシナプス伝達について、正常と末梢炎症モデルで比較した。また、(2) 感覚過敏行動を示す高架式オープンプラットフォームを用いたストレス暴露マウスが視床-前帯状回シナプス伝達に影響するかの投射選択性を調べた。最後に、(3) 疼痛モデルマウスでシナプス可塑性を示した選択的な投射を光遺伝学で頻回刺激した時の感覚行動と嫌悪行動について調べた。

### 3. 研究の方法

動物： 雄成熟マウス (C57/BL6J, 8-12 週齢) を用いた。末梢炎症モデルの作製： 末梢炎症モデルは complete Freund's adjuvant (CFA) をマウスの左後肢に投与した 2-3 日後のマウスを電気生理学的解析および行動実験に用いた。対照群として生理食塩水を左後肢に投与した。高所ストレスは 1 m の高さに設置した 10 cm 四方のアクリル板の上の高架式オープンプラットフォームにマウスを 30 分間置き、身体的ストレスを与えた。

光遺伝学的手法： pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP (300 nL) を電気生理学的解析の時は右の視床、前部島皮質、もしくは扁桃体外側基底核に投与した。行動解析の時はそれぞれの脳領域の両側に投与した。

電気生理学的手法： 前帯状回を含む冠状断脳スライス標本(300  $\mu$ m)を作製し、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。記録細胞の保持電位を -70 mV にして、470 nm の青色光を顕微鏡の水浸レンズからスライスに照射して ChR2 を活性化した時の興奮性シナプス後電流 (optic excitatory postsynaptic currents: oEPSCs) を記録した。

光遺伝学的手法を用いた行動実験： pAAV-hSyn-hChR2(H134R)-EYFP を両側の視床もしくは前部島皮質に投与して、AAV 感染 3-4 週間後に光刺激用のファイバーを前帯状回に留置した。手術の 1 週間後に 20 Hz の青色光刺激を前帯状回に与えた時の感覚行動と情動行動を含む疼痛関連行動を調べた。

感覚行動と情動行動： ガラスのカップをマウスに被せメッシュのフロアーに置いた。機械刺激はマウスの後肢に von Frey filament を弱い強度から強い強度の順に与え、逃避閾値をグラムで示した。冷刺激はマウスの後肢にアセトンを与え、反応を 0-2 のスコア化した。条件づけ嫌悪行動は、メッシュの上にマウスが行き来できる白と黒の 2 箱を用意し、23G の注射針の先端もしくはアセトンによる冷刺激をマウスの後肢に与え条件づけ刺激とした。

### 4. 研究成果

#### (1) アデノ随伴ウイルスの局所投与と前帯状回に投射する線維の発現確認

視床背内側核、扁桃体外側基底核、前部島皮質のいずれかの領域に AAV を投与し、3-4 週間 AAV の感染を待った。その後、灌流固定を行い、脳をスライスして光学顕微鏡を用いて前帯状回に投射する AAV-EYFP の発現を確認した。その結果、それぞれ 3 つの領域の神経線維は前帯状回に投射することが確認できた。

## (2) 投射選択的な興奮性シナプス伝達の解析

初めに、前帯状回で観察されるシナプス伝達が単一シナプスを介しているかを薬理的に調べた。視床 前帯状回シナプスによる oEPSCs の振幅は、Na<sup>+</sup>チャンネル阻害薬の TTX で抑制された。次に K<sup>+</sup>チャンネル阻害薬である 4-AP を投与すると、oEPSCs の振幅は TTX 投与前の振幅と同様の大きさまで回復した。この oEPSCs の振幅はグルタミン酸 AMPA/GluK 受容体阻害薬である CNQX で完全に抑制された。島皮質 前帯状回、扁桃体 前帯状回シナプス伝達も同様の結果であったことから、それぞれの投射はグルタミン酸 AMPA/GluK 受容体を介した単一のシナプス伝達であることを確認した。

## (3) それぞれの投射を頻回刺激した時の同期的なシナプス伝達と非同期的なシナプス伝達の解析

シナプス前終末を刺激した時に同期して発生するシナプス伝達と同期せずに発生するシナプス伝達は神経伝達物質の放出メカニズムが異なる可能性が示唆されている (Kavalali, Nature Rev Neurosci, 2015)。1 Hz から 20 Hz の青色光で頻回刺激を与えた時の同期的シナプス伝達と非同期的なシナプス伝達を正常と末梢炎症モデルマウスで解析した。

末梢炎症モデルの視床 前帯状回シナプス伝達は、5 Hz 以上の高頻度刺激になると oEPSCs の振幅が対照群より小さくなる occlusion を示した。また、非同期の EPSCs の発生頻度は、1-20 Hz で増加した。

末梢炎症モデルの前部島皮質 前帯状回シナプス伝達は、1-20 Hz の刺激を与えても、同期する oEPSCs の振幅は対照群と変化がなかった。一方、非同期の EPSCs の発生頻度は、10 Hz 以上の高頻度で増加した。

末梢炎症モデルの扁桃体 前帯状回シナプス伝達は、1-20 Hz の刺激を与えても、同期する oEPSCs の振幅は対照群と変化がなかった。また、非同期の EPSCs の発生頻度は、1-20 Hz でも変化しなかった。

以上の結果から、末梢炎症モデルでは、視床 前帯状回および前部島皮質 前帯状回のシナプス伝達が可塑的な変化を示すことが明らかになった。また、視床-前帯状回、前部島皮質 前帯状回におけるシナプス可塑性の様式も同期するシナプス伝達と非同期のシナプス伝達で異なることが示された。

## (4) 高架式急性ストレスを与えたマウスの感覚行動と前帯状回シナプス伝達への影響

高架式ストレスを 30 分間与えたマウスは、120 分続く機械刺激に対する感覚過敏行動を示した。また、前帯状回をイボテン酸による神経毒で破壊するとストレス性感覚過敏が観察されなかったことから、前帯状回がストレス性感覚過敏に重要な脳領域であることが示唆された (Kawabata et al., Neurosci, 2023)。さらに、電気生理学的手法を用いて、前帯状回の出力層である第 V 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い電気刺激による誘発性 EPSCs を調べると、ストレスマウスは誘発性興奮性シナプス伝達が抑制されていた。さらに、投射選択的なシナプス伝達を調べるために光遺伝学的手法を用いて視床 前帯状回のシナプス伝達を解析すると、高架式ストレスは視床-前帯状回シナプス伝達を抑制した。

## (5) 感覚行動と嫌悪行動に対する視床-前帯状回、前部島皮質 前帯状回シナプスの役割

視床と前部島皮質 前帯状回の投射は末梢炎症の 2 - 3 日で同期するシナプス伝達と非同期的なシナプス伝達が可塑的な変化を示したことから、この投射を選択的に活性化した時の疼痛関連行動が変化するかについて光遺伝学的手法を用いて調べた。

### von Frey filament による機械刺激

正常マウス両側の視床 前帯状回を頻回刺激すると、機械刺激に対して感覚過敏を示した。末梢炎症モデルでは、CFA 側は既に過敏であるため視床 前帯状回刺激は影響がなかったが、非 CFA 側は感覚過敏を示した。両側の島皮質-前帯状回の刺激でも同様の結果であった。

### アセトンによる冷刺激

正常マウス両側の視床 前帯状回を頻回刺激しても、冷刺激によるスコアに影響しなかった。末梢炎症モデルでは、CFA 側は既に過敏であるため視床 前帯状回刺激は影響がなかったが、非 CFA 側は感覚過敏を示した。両側の島皮質-前帯状回の刺激でも同様の結果であった。

### 条件づけ場所嫌悪行動

(1) これまでの先行研究において、2 つの箱を用意して条件づけ刺激に注射針を用いて足底に与えると正常および疼痛モデルで条件づけ嫌悪行動が生じることがラットで報告されている

(Zhang et al., eLife, 2017)。同様の実験方法をマウスで検討すると、正常では嫌悪行動を示さず、末梢炎症モデルでも嫌悪行動は観察されなかった。

(2) そこで、条件づけ刺激にアセトンによる冷刺激を用いると、正常マウスでは嫌悪行動を示さないが、末梢炎症モデルの左後肢をアセトンで刺激すると嫌悪行動が観察された。

(3) 光遺伝学的手法を用いて両側の視床 前帯状回、前部島皮質 前帯状回を頻回刺激すると、正常マウスでは、2つの投射で嫌悪行動が生じなかった。一方、末梢炎症モデルの2つの投射は嫌悪行動が観察された。

#### <引用文献>

Bushnell et al., Nature Rev Neurosci 14:502-11, 2013

Bliss et al., Nature Rev Neurosci 17:485-96, 2016

Koga et al., Neuron, 85:377-89, 2015

Koga et al., J Neurosci, 35:2033-43, 2015

Koga et al., J Neurosci, 37:3887-95, 2017

Koga et al., Mol Pain 13:1-11, 2017

Koga et al., Mol Pain 14:1-14, 2018

Koga et al., Brain Res 1704:187-95, 2019

Kavalali, Nature Rev Neurosci 16:5-16, 2015

Kawabata et al., Neurosci 523:47-60, 2023

Zhang et al., eLIFE 6:e25302, 2017

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Kawabata Ryo, Shimoyama Shuji, Ueno Shinya, Yao Ikuko, Arata Akiko, Koga Kohei	4. 巻 13
2. 論文標題 TRPA1 as a O2 sensor detects microenvironmental hypoxia in the mice anterior cingulate cortex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-023-29140-8	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 Kawabata Ryo, Yamanaka Hiroki, Kobayashi Kimiko, Oke Yoshihiko, Fujita Ayumi, Oku Yoshitaka, Yao Ikuko, Koga Kohei	4. 巻 523
2. 論文標題 The Anterior Cingulate Cortex is Critical for Acute Stress-induced Hypersensitivity in Mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 47～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2023.05.010	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川端遼、矢尾育子、荒田晶子、古賀浩平
2. 発表標題 TRPA1 regulates neural activity in the anterior cingulate cortex
3. 学会等名 第100回記念大会日本生理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川端遼、藤田あゆみ、矢尾育子、古賀浩平
2. 発表標題 マウス高所ストレス下における前帯状回のシナプス可塑性
3. 学会等名 第32回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川端遼、古賀浩平、矢尾育子
2. 発表標題 高架式プラットフォーム誘発性のストレスは機械過敏性を引き起こし、前帯状回の興奮性のシナプス伝達
3. 学会等名 第45回日本神経科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家碧夏，鳥山道則，矢尾育子，古賀浩平
2. 発表標題 前帯状回シナプス伝達におけるTRPA1の修飾作用
3. 学会等名 第31回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家碧夏，鳥山道則，矢尾育子，古賀浩平
2. 発表標題 急性ストレスによる脳内環境変化の解析
3. 学会等名 第31回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清家碧夏，鳥山道則，古賀浩平，矢尾育子
2. 発表標題 急性ストレスによる脳内環境変化の解析
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古賀浩平
2. 発表標題 慢性疼痛による前帯状回皮質シナプス可塑性のメカニズム
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会（日本大学歯学部）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 川端遼、藤田あゆみ、古賀浩平、矢尾育子
2. 発表標題 ストレス誘発性機械過敏と前帯状回における誘発性シナプス伝達の解析
3. 学会等名 第101回記念大会日本生理学会 北九州
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
研究 分 担 者	矢尾 育子  (Yao Ikuko)  (60399681)	関西学院大学・生命環境学部・教授    (34504)	

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