

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19616

研究課題名（和文）時系列立体脳機能イメージング法による島皮質神経回路の覚醒下における動作機構の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of insulocortical neural dynamics in the alert animals revealed by calcium imaging techniques

研究代表者

小林 真之（KOBAYASHI, Masayuki）

日本大学・歯学部・教授

研究者番号：00300830

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）：GCamp6sを発現したトランスジェニックマウスに対して、脳深部計測用プリズムを頭蓋骨外側から埋入する手技を開発し、二光子レーザー顕微鏡を用いることで、島皮質ニューロンの蛍光強度を慢性的に観察することが可能となった。その結果、上下顎の歯根膜刺激に対する島皮質ニューロンの応答は、微視的（ニューロン単位）では区別できるものの、巨視的（mm単位）では区別できないことが明らかになった。一方、左右の刺激については、巨視的に区別できることが明らかになった。並行して、覚醒動物への侵害刺激に対する逃避行動の記録装置の作製に取り組み、赤色レーザー光照射による侵害刺激時の運動量を定量化することが可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

島皮質は、口腔顔面領域の様々な感覚情報が収束する領域であるが、側頭葉の腹側に存在するため、頭頂からのアプローチが難しく、局所神経回路を含む情報処理機構の解明が他の感覚野と比較して遅れていた。本研究課題による成果は、特にin vivoにおける島皮質ニューロンの挙動を明らかにする上で重要なツールになることから、今後の歯学研究発展に大いに寄与するものである。また、島皮質と扁桃体や視床下部との相互連絡が密であり、情動系の情報処理に島皮質が深く関わっていることを考えると、口腔顔面感覚に起因する情動のメカニズムを解明することにも貢献する成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We developed the method to insert a prism for imaging deep brain areas without destroying the dorsal cerebral cortex. This method enabled us to image neural activities of the insular cortex at least for a week by measuring intracellular Ca²⁺ concentration using a two-photon laser microscope. As a result, macroscopic neural responses of the insular cortex to stimulation of the maxillary or mandibular periodontal ligament of the first molar were indistinguishable, whereas each neuron showed its own pattern to maxillary or mandibular periodontal ligament stimulation. On the other hand, left or right stimulation induced differential macroscopic activation patterns. In parallel, we were engaged to build up the system to estimate behaviors escaping from nociceptive stimulation by irradiation of red laser.

研究分野：神経生理学

キーワード：島皮質 カルシウムイメージング 逃避行動

1. 研究開始当初の背景

歯科医療において難治性疼痛を寛解させる治療法の開発には、痛みの情報処理に関わる受容体や神経回路の詳細なメカニズム解明が不可欠である。事実、外的環境の変化によって生じる大脳皮質神経回路の可塑的变化は、弱視や幻肢痛、慢性疼痛など様々な難治性病態の原因となる。我々は、創傷治癒後も続く慢性疼痛の原因が中枢神経系回路の組換えにあると考え、口腔顔面領域の感覚情報処理を行う島皮質に焦点を当てて研究を進めてきた。その結果、大脳皮質の機能単位である機能円柱が明確に分離されておらず、互いに重複した部分が存在すること、島皮質に頻回刺激を加えると容易に興奮伝播のパターンを変化させることを明らかにした。これらの特徴は、末梢神経損傷や歯科矯正を模した実験的歯の移動が大脳皮質の体部位局在地図を大きく変化する神経基盤である。痛みの原因部分と離れた部分に痛みを感じる異所性疼痛では、このような体部位局在地図の変化が原因の一つと考えられる。しかし、これらの脳機能マッピングは脳表から見た平面図であり、脳表に対して垂直方向(深さ方向)のニューロン結合が局所回路の変化は不明であった。

2. 研究の目的

島皮質は、感覚処理の最終段である大脳皮質の中で口腔領域の侵害情報を処理する主要な領域であるが、側頭部腹側に位置するため、アプローチするのに外科的手技が複雑で侵襲が大きく動物の管理が難しい。そこで本研究は、顎顔面口腔領域を制御する大脳皮質活動を三次元・高速度・高解像度で記録できる時系列立体イメージング法を開発し、逃避行動に関わる島皮質局所神経回路の動作メカニズムを解明することを目的とした。

3. 研究方法

(1) 麻酔下マウス島皮質における時系列空間 Ca^{2+} イメージング法の確立

島皮質背側には、体性感覚野顎顔面口腔領域が配置されているため、背側からの Ca^{2+} 指示薬注入に伴う脳損傷は実験結果を大きく歪める可能性が高い。その可能性を回避するため、動物には細胞内 Ca^{2+} 濃度によって蛍光強度が変化する GCamp6s を発現したトランスジェニックマウスを用いた。イソフルラン麻酔下で、頭頂部から側頭部にかけて側頭筋を剥離し、頭蓋骨に接するようにガラスプリズムを埋入した。プリズムの一方は島皮質に接した状態で、もう一方は、頭頂部に露出させて、残りの切開部分は閉鎖した。

次に、上顎第一臼歯歯根膜に双極電極を埋め込み、口腔内粘膜から皮下を通して頭頂部に導出して固定した。この状態で、マウスを傾けることなく島皮質を頭頂部からプリズムを通してイメージングできているか確認した後、飼育ケージに戻した。以後1週間、毎日イソフルラン麻酔下で同様の条件下で島皮質 Ca^{2+} イメージングを行った。

島皮質ニューロンの活動に関する情報量は膨大で、ニューロンの同定と活動相関を自動的に解析するプログラムの開発が必須である。そこで MATLAB を中心とした解析システムを構築した。

(2) 覚醒動物における島皮質局所神経回路における侵害情報処理メカニズムの解明

頭部を固定してハードディスクを改造した回転ディスクに乗せ、808 nm のレーザー光を臼歯部歯肉に照射して痛覚を誘発させる装置を作製した(図 1 下段左)。四肢を動かすと回転ディスクが回転するため、逃げる感覚を得られ、3日間程度の訓練で馴化可能であった。さらに、動物がレーザー光照射で生じた痛みを避けるために動かす四肢の運動(角速度, 加速度, 距離)を定

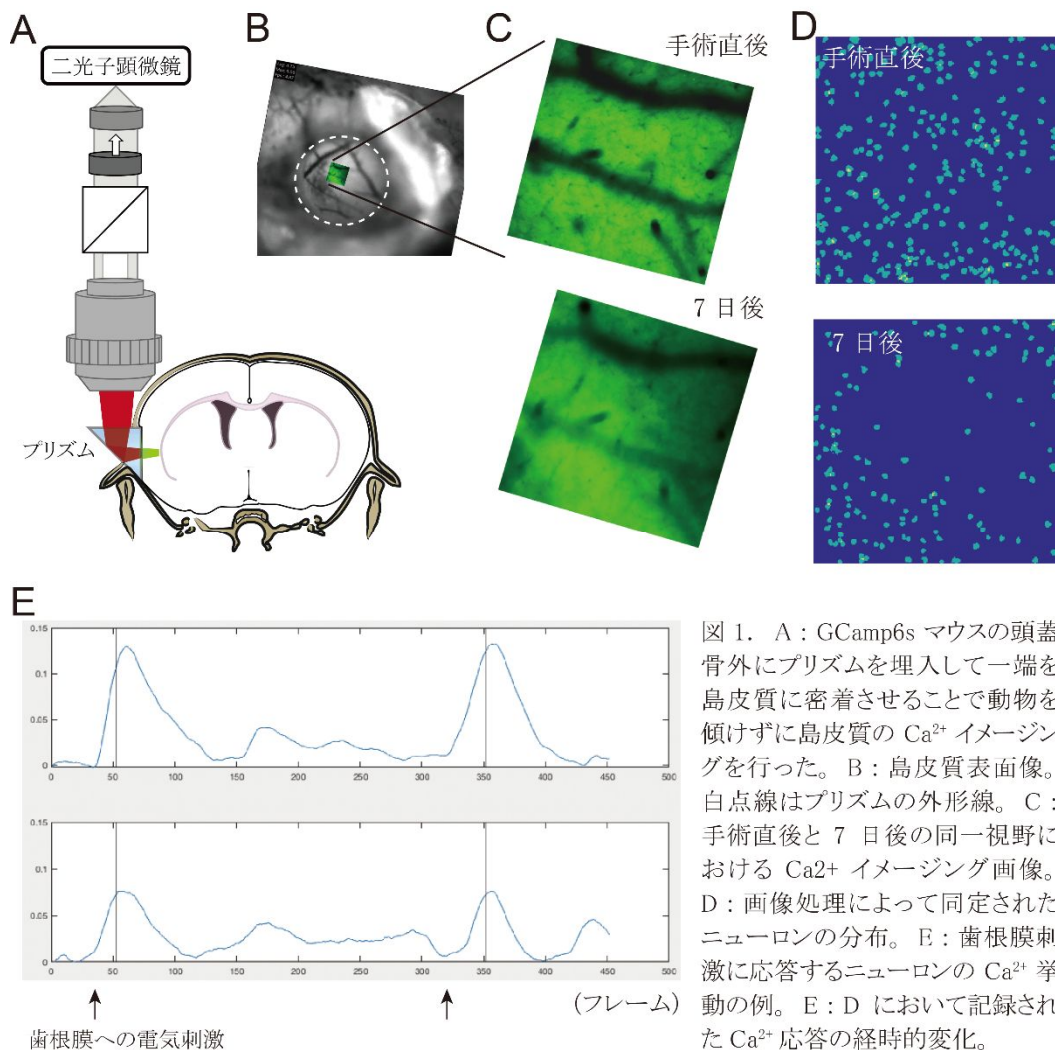
量化する装置を作製した。検知器には光学レーザーマウスを用い、また3方向にデジタルカメラを設置し、表情や動きを常時観察して逃避行動をDeepLabCutで解析するシステムを構築した。

次に、覚醒下での痛み刺激に伴う脳機能イメージングを3-1のシステムを利用して試みた。

4. 研究成果

(1) 麻酔下マウス島皮質における時系列空間 Ca^{2+} イメージング法の確立

麻酔下マウス島皮質における時系列空間 Ca^{2+} イメージング法の確立である。動物には、細胞内 Ca^{2+} 濃度によって蛍光強度が変化する GCamp6s を発現したトランスジェニックマウスを用いた。同マウスに対して、イソフルラン麻酔下にて脳深部計測用プリズムを頭蓋骨の外側から埋入する手術手技を開発した。この手技により、側頭部にある島皮質の表面を頭頂から観察することが可能になった。さらに、二光子レーザー顕微鏡を用いることによって、埋入したプリズムを通じた島皮質ニューロンの蛍光強度の観察が可能となった。その結果、イソフルラン麻酔下で自発的に放電する島皮質ニューロンの活動を記録することに成功した(図 1A-C)。



さらに、本研究課題で開発したシステムを用いて Ca^{2+} 応答を解析した結果、

上下顎の歯根膜刺激に対する島皮質ニューロンの応答は、微視的(ニューロン単位)では区別できるものの、巨視的(mm単位)では区別が困難であることが明らかになった。この結果については、*Scientific Reports*に発表した(Kobayashi et al., 2022)。

左右の刺激の違いについては、巨視的にも区別できることを明らかにした。

慢性記録（手術後7日）では、観察できるニューロン数が減少することが明らかとなり、単純に手術直後と比較することは困難であることが判明した（図1D,E）。

（2）覚醒動物における島皮質局所神経回路における侵害情報処理メカニズムの解明

覚醒マウスへの侵害刺激に対する逃避行動の記録装置の作製に取り組み、赤色レーザー光照射による侵害刺激装置を作製した。次に、覚醒動物の手足を自由にさせた状態で頭部を固定し、動物の意志に応じて回転ディスクが動くことによって、逃避運動が計測できる装置を開発した。この逃避運動測定装置を用いることによって、運動量（角速度、加速度、距離）を定量化することが可能になった。侵害刺激装置と逃避運動測定装置を組み合わせることによって、覚醒動物が顔面部への痛み（赤色レーザー光を照射して生じる熱刺激）に対して、逃避する行動を定量化できた（図2）。

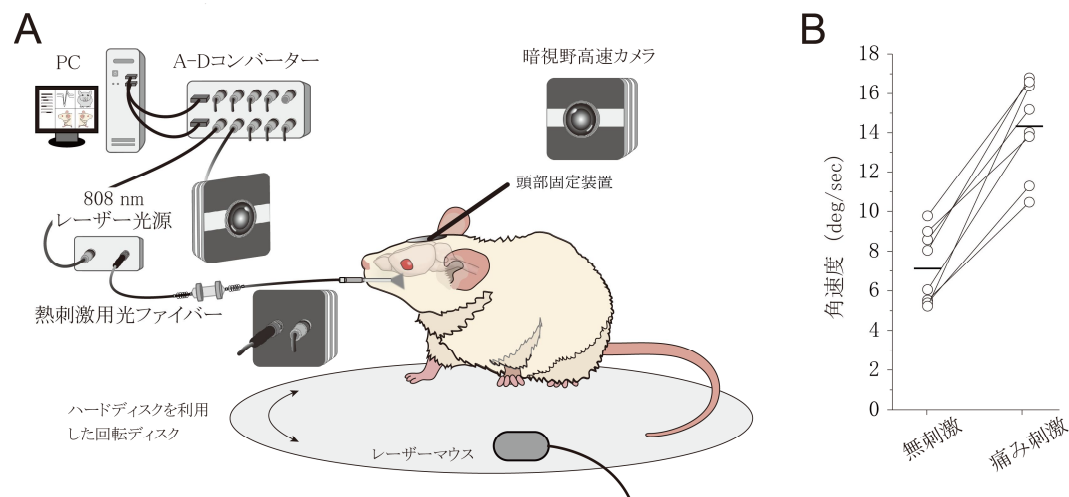


図2. A: 覚醒動物逃避行動下での島皮質時系列立体イメージング。実験プリズムを埋入した動物を頭部固定して回転ディスク上に置き、808 nmの赤外光レーザーで口腔内を熱刺激し、痛覚による逃避行動を運動記録装置（3方向からの暗視野高速カメラと回転ディスクをモニターするレーザーマウス）で記録した。B: レーザー光による熱刺激（痛み刺激）によって誘発される逃避行動の定量化。痛み刺激を加えると、回転ディスクの角速度が有意に増加し、定量化できることが明らかになった。

逃避行動記録装置を利用した時系列空間 Ca^{2+} イメージングについては、覚醒動物が侵害刺激に対してとる行動が予想以上に多様であり、それらの行動評価を加えて分析する必要があることが判明した。そこで、研究分担者である尾崎弘展を中心に、人工知能を利用した行動解析プログラムによる解析法を模索し、複雑な四肢や頭部の動きを定量化することに取り組んだ。その結果、特に前肢の運動パターンによって逃避行動の程度を評価できることが明らかになりつつある。現時点では、これらの評価法が確立できた上で、時系列空間 Ca^{2+} イメージング法を導入することを検討している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Yamamoto Kiyofumi, Nakaya Yuka, Sugawara Shiori, Kobayashi Masayuki	4. 巻 1773
2. 論文標題 Synchronous inhibitory synaptic inputs to layer II/III pyramidal neurons in the murine barrel cortex	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 147686 ~ 147686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2021.147686	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 -
1. 著者名 Kobayashi Shutaro, O'Hashi Kazunori, Kobayashi Masayuki	4. 巻 12
2. 論文標題 Repetitive nociceptive stimulation increases spontaneous neural activation similar to nociception-induced activity in mouse insular cortex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15190
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19562-1	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 Hirose Kensuke, Nakaya Yuka, Kitano Kohei, Saito Yasuhiko, Kaneko Ryosuke, Yanagawa Yuchio, Yamamoto Kiyofumi, Shirakawa Tetsuo, Kobayashi Masayuki	4. 巻 473
2. 論文標題 Differential regulation of medium spiny and cholinergic neurons in the nucleus accumbens core by the insular and medial prefrontal cortices in the rat	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pflugers Archiv - European Journal of Physiology	6. 最初と最後の頁 1911 ~ 1924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00424-021-02634-y	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 -
1. 著者名 Kobayashi Shutaro, O'Hashi Kazunori, Kaneko Keisuke, Kobayashi Satomi, Ogisawa Shouhei, Tonogi Morio, Fujita Satoshi, Kobayashi Masayuki	4. 巻 64
2. 論文標題 A new phenotype identification method with the fluorescent expression in cross-sectioned tails in <i>Thy1</i>-GCaMP6s transgenic mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 156 ~ 160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.21-0528	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林理美, 山本清文, 藤田智史, 小林真之
2. 発表標題 オプトジェネティクス法による抑制性シナプス長期増強の手法の開発
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大橋一徳, 小林秀太郎, 小林真之
2. 発表標題 疼痛刺激は島皮質自発活動を増強する
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林秀太郎, 大橋一徳, 小林真之
2. 発表標題 歯根膜侵害刺激により生じる大脳皮質自発活動の動態変化
3. 学会等名 第99回日本生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 O'Hashi K, Kobayashi S, Kobayashi M
2. 発表標題 The spatial profile of orofacial nociceptive information foci in mouse insular cortex
3. 学会等名 44th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 O'Hashi K, Kobayashi M
2. 発表標題 Cortical representation for orofacial noxious information in mouse
3. 学会等名 第100回日本生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本大学歯学部薬理学講座 http://www2.dent.nihon-u.ac.jp/pharmacology/

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	新井 嘉則 (Arai Yoshinori) (20212607)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	大容量データのプログラム開発
研究分担者	尾崎 弘展 (Osaki Hironobu) (30747697)	東京女子医科大学・医学部・助教 (32653)	In vivoイメージング実験の実施
研究分担者	大橋 一徳 (O'hashi Kazunori) (90617458)	日本大学・歯学部・助教 (32665)	行動実験装置の開発

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