

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21024

研究課題名(和文) PV-ChR2ラットの島皮質光刺激による疼痛抑制効果の行動生理学的検証

研究課題名(英文) Behavioral analysis of pain control by optogenetic insular cortex stimulation with PV-ChR2 rat

研究代表者

梶原 美絵 (KAJIWARA, Mie)

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：70906354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では口腔顔面における疼痛を光遺伝学的手法を用いて抑制できるかを行動学的に検証した。本研究にはparvalbumin-Cre遺伝子改変ラットの島皮質にアデノ随伴ウイルスを注入することで抑制性ニューロンであるparvalbumin細胞に選択的に光活性化型非選択的陽イオンチャネルであるchannelrhodopsin-2を発現させたラットを用いた。ラット類に侵害レーザー照射を行いアクリル円盤上で逃避行動を示すレーザー強度を検索した。このレーザー強度を用いて頬への侵害レーザーおよびラット島皮質への青色光刺激を同時に行ったところ、侵害レーザー刺激のみの条件より逃避行動量が減少する傾向にあった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

智歯抜歯やインプラント手術、根管治療などの歯科治療はしばしば末梢神経障害を引き起こす。これらの歯科・口腔外科治療における末梢神経損傷は、神経障害性疼痛を惹起し難治性の経過を辿ることが多く未だ有効な治療法は少ない。本研究は光遺伝学的手法を用いて顔面領域の疼痛抑制効果を行動学的に検証した。結果、抑制性ニューロンを活性化させる光照射によって疼痛からの逃避行動量が減少する傾向にあった。これは今後の神経障害性疼痛の制御実験につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The peripheral neuropathy due to dental procedures such as extraction of wisdom tooth cause neuropathic pain. However, there are few effective treatments for the neuropathic pain. Previously, it was showed that the peripheral neuropathy causes hyperexcitability of the insular cortex (IC). In this study, I performed the experiment activating inhibitory neurons to suppress excitatory neurons in IC using an optogenetic technology. To modulate inhibitory neurons, AAV5-EF1 -Flex-hChR2(H134R)-mCherry were injected and the optical fiber was also inserted in IC of parvalbumin-Cre transgenic rats. The nociceptive laser irradiation was applied to the cheek of rats, and the laser intensity was examined to find that inducing escape behaviors. When the blue light irradiation to IC and the nociceptive laser irradiation to the cheek were applied simultaneously, escape behaviors tended to decrease compared to the condition in which only nociceptive laser irradiation was applied.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：光遺伝学的手法 島皮質 光刺激 PV細胞 channelrhodopsin-2(ChR2) 疼痛 行動生理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科・口腔外科治療における末梢神経損傷は、神経障害性疼痛を惹起し難治性の経過を辿ることが多く、未だ効果的な治療法は少ない。島皮質は口腔顔面領域の多様な感覚入力を受ける大脳皮質の一領野であり、興奮性ニューロン(錐体細胞)と抑制性ニューロンが特殊な局所神経回路を形成している。抑制性ニューロンの約半数を占める parvalbumin 陽性細胞(PV細胞)は興奮性ニューロンとシナプス形成し、振幅の大きい抑制性シナプス後電位を発生させることによって錐体細胞を強力に制御することが知られている。島皮質錐体細胞は他の脳領野へ広く投射することから、錐体細胞の活動を調節することで島皮質が処理する感覚入力をフィードバック制御できる可能性が高い。

研究代表者が共同研究している研究室では fast-spiking 細胞と呼ばれる GABA 作動性ニューロンである PV 細胞が島皮質において錐体細胞の活動を様々な神経修飾物質によって制御していること、また島皮質が口腔顔面領域への侵害刺激に強く応答することを明らかにしてきた。これらを踏まえて parvalbumin-Cre 遺伝子改変ラット島皮質に AAV5-EF1 -Flex-hChR2(H134R)-mCherry(以下 AAV)を感染させたラット(PV-ChR2ラット)を用いた *in vitro* 実験を行っていたが、これは島皮質局所神経回路のニューロンの応答を検証するに留まる。そこで覚醒下の動物で同様の PV-ChR2 ラット島皮質 PV 細胞を光刺激し、錐体細胞を抑制することで実際に疼痛抑制効果が現れるのかを検証する着想に至った。

2. 研究の目的

口腔顔面領域における疼痛抑制実験はこれまでも数多く行われていたが、疼痛の評価方法は von Frey テストによるものが多かった。Von Frey テストは実験者がフィラメントによる圧刺激を動物に与えることから、実験者の主観が影響する可能性が考えられる。また口腔顔面領域にフィラメントをあてる場合、多くは動物を筒に入れて拘束するため、身体的拘束によるストレスが大きい。本研究では侵害性レーザーをラットの頬に照射した際に、ラットが痛みを回避しようとアクリル円盤上を走る動きを円盤の回転量から測定し、疼痛評価を行う。そのため従来の実験と異なり、実験者の主観的評価が加わることなく疼痛抑制効果を定量的に評価できる。

この疼痛抑制効果を定量評価できるという利点を生かし、本研究では光遺伝学的手法を用いて島皮質抑制性ニューロンの約半数を占める PV 細胞を選択的に活性化することで、覚醒下ラットにおける錐体細胞への抑制性入力を制御し、口腔顔面における疼痛を抑制できるのかを行動学的に検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ベクターウイルスの注入および光刺激装置の埋入

本研究には parvalbumin-Cre 遺伝子改変ラット島皮質に AAV5-EF1 -Flex-hChR2(H134R)-mCherry を感染させたラットを使用する。Parvalbumin-Cre 遺伝子改変ラットの頭蓋骨頭頂部をイソフルランによる全身麻酔下に開窓し、ガラスピペットを用いて島皮質に AAV を注入し、島皮質の PV 細胞に選択的に ChR2 を発現させた。AAV の注入と同時に PV 細胞を青色光で活性化させるための光照射ファイバーを島皮質に留置した。

(2) 侵害刺激からの逃避行動測定

本研究ではラットが侵害刺激から逃避行動を示すとアクリル円盤が回転し、回転量から逃避行動を定量化することが可能な装置を利用した。(1)の処置から1週間の回復期間を設けた後、ラットをアクリル円盤上に慣れさせた。馴化完了後、アクリル円盤上に頭部固定したラットの頬に痛み刺激として侵害レーザーを照射し、アクリル円盤の回転量・速度から逃避行動を定量化することで疼痛抑制効果を検証した。

4. 研究成果

(1) 侵害レーザー強度の決定

はじめにラットが逃避行動を示す痛み刺激を決定するため、侵害レーザー強度の検索を行った。

侵害レーザーの照射時間を 500 ms, 1000 ms, 1500 ms でラットの頬に照射し逃避行動量を測定したところ、照射時間に比例して逃避行動量も増加した。また、500 ms と 1000 ms に比べて 1500 ms の照射時間では逃避行動量が増加する傾向にあった。

(2) PV 細胞の活性化による疼痛抑制効果の検証

無刺激，青色光刺激，痛み刺激時，痛み刺激+青色光刺激の4パターンの条件を設定し，各条件下でのラットの逃避行動量を記録した。痛み刺激としての侵害レーザー強度は1500 msとして実験を行った。

に比べて の条件下で逃避行動量は減少する傾向にあった（図1，n = 3）。

（3）ChR2発現部位および光照射ファイバー刺入位置の確認

行動記録終了後，4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行い脳を摘出を行った。脳スライス標本を作製し，PV細胞の免疫染色を行った後に顕微鏡下にて光照射ファイバーの刺入部位の確認および蛍光色素 mCherry を指標に ChR2 の発現を確認した。

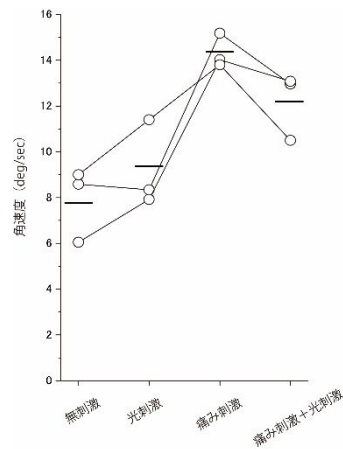


図1

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------