

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 1 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23790643

研究課題名（和文）辺縁系による下行性疼痛抑制系修飾機構の実験形態学的解析

研究課題名（英文）Morphological analysis of limbic modulation of descending pain inhibitory system

研究代表者

岡 達郎（OKA TATSURO）

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20508923

研究成果の概要（和文）：下行性疼痛抑制系に対する辺縁系の影響を調べるために、吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンへの視床下部や扁桃体からの入力様式を形態学的に解析した。その結果、視床下部腹内側核の軸索終末の分布領域と、吻側延髄腹内側部へ投射するニューロンの分布領域の一致を中心灰白質の外側部および背内側部において認め、両者の間に非対称性シナプスを確認した。さらに、吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンの多くがグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである小胞性グルタミン酸輸送体 2 mRNA 陽性であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：To understand how limbic structures influence descending antinociceptive system, we examined whether hypothalamic and amygdaloid terminals make synaptic contact with rostral ventromedial medulla (RVM)-projecting neurons in the periaqueductal gray (PAG). As a result, prominent overlapping distribution of the ventromedial hypothalamic axons and RVM-projecting neurons was observed in the lateral/dorsomedial part of the PAG. Furthermore, electron microscopic observation revealed that ventromedial hypothalamic terminals made asymmetrical synaptic contacts with RVM-projecting PAG neurons. We further demonstrated that most of the RVM-projecting PAG neurons are positive for vesicular glutamate transporter 2 mRNA, suggesting that these neurons are glutamatergic.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：下行性疼痛抑制系、中心灰白質、辺縁系、視床下部、扁桃体、大縫線核、神経回路、ラット

1. 研究開始当初の背景

辺縁系は情動発現に中心的な役割を果たしていることが古くから示唆されてきた。近年では、とくに扁桃体や視床下部が情動に伴う様々な反応の表出に重要な役割を担っていると考えられている。申請者はこれまで、発声を引き起こす脳幹の神経機構に辺縁系が如何に作用するのかを知る目的で、扁桃体

中心核から中脳中心灰白質を経て疑核後核（発声に関わる運動前ニューロンが存在する神経核）へ至る神経路の存在と、その神経路を構成するニューロンの化学的性質を明らかにしてきた。その過程で、情動に伴って変化する生体の反応の中には、ストレスなどによって痛みを感じやすくなったり、逆に痛みを感じにくくなったりすることがあるが、

このような情動による痛覚感受性の変化が如何なる神経機構によって発現するのかという疑問を抱くようになった。

中脳中心灰白質は、外界の刺激やストレスなどに対する情動性自律反応および行動反応を制御する部位として重要であると考えられている。また、ここを刺激することによって侵害受容閾値の上昇が引き起こされることが報告されて以来、痛覚制御に関わる脳部位の一つとして注目されてきた (Reynolds, 1969)。最近の Fos 標識法を用いた解析では、末梢の痛覚刺激によって中心灰白質の腹外側部に Fos 蛋白発現ニューロンの顕著な増加が認められるという (Keay et al., 2000, 2002)。また、下行性疼痛抑制系の主たる神経路として、中心灰白質のニューロンから吻側延髄腹内側部のニューロンを介して脊髄後角の侵害受容ニューロンに至る経路が考えられ、この経路が作動することによって疼痛抑制が生じると考えられている。一方で、中心灰白質へオピオイド受容体阻害剤を注入すると、扁桃体へのモルヒネ注入による疼痛抑制作用が減弱すること (Pavlovic et al., 1996) や、視床下部腹内側核の破壊によって痛覚過敏が生じること (Vidal and Jacob, 1980) など、辺縁系が疼痛制御に関与することを薬理・生理学的に示唆した報告は多数ある。しかし、これらの現象を引き起こす背景にある神経回路の構成については、ほとんど解っていないのが現状である。

2. 研究の目的

下行性疼痛抑制系を構成している吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンと、辺縁系に属する視床下部腹内側核および扁桃体中心核の出力線維との連絡様式について、光顕的および電顕的に詳細な分析を行うことによって、情動による疼痛修飾機構の一端を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経路の光顕的・電顕的解析

① 同一のラットに対して、視床下部腹内側核に順行性標識物質である BDA を、吻側延髄腹内側部に逆行性標識物質であるコレラトキシン B サブユニット (CTb) を電気泳動的に注入し、その1週間後に痛覚刺激としてホルマリンを後肢足底部皮下に注入した。注入の2時間後に灌流固定して脳を摘出した。
② 組織化学法および抗 Fos 抗体を用いた免疫組織化学法により BDA 標識終末と Fos 陽性ニューロンをそれぞれ検出した。この場合、chromogen としてジアミノベンチジン (DAB) を用いるが、ニッケルアンモニウムを反応液に加えることによって、Fos 陽性ニューロンの細胞核と BDA 標識終末の両者を黒色に染めた。

③ 上記反応後、抗 CTb 抗体を用いて CTb 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出した。この場合は chromogen として DAB を用いるのみであり、CTb 標識ニューロンの細胞質を茶色に染めた。

④ 中心灰白質において、CTb により標識されたニューロンと Fos 陽性ニューロンの分布や異同、さらにはこれらのニューロンと BDA により標識された視床下部腹内側核線維との接合様態を光顕的に解析した。

⑤ BDA と CTb を注入したラットに対して、ホルマリンの代わりに生理食塩水を後肢足底部皮下に注入した場合についても同様の実験を行い、これを対照群とした。

⑥ 電顕観察の場合には、上記の①と同様に灌流固定して取り出した脳を、ビブラトームを用いて厚さ 30 μm の脳切片を作成した。BDA 標識終末をアビジン-ビオチン複合体で検出した後に、抗 CTb 抗体を用いた免疫組織化学により CTb 標識ニューロンを検出した。なお、この場合には、BDA の検出には DAB に銀増感処理を施し、CTb の検出には DAB のみを用いた。

⑦ 中心灰白質において、上記標識線維と標識ニューロンの分布が一致する領域を含む切片をエポキシに包埋して電顕試料とした。

⑧ 電顕下にて、BDA 標識終末と CTb 標識ニューロンとのシナプス構築を解析した。

上記の実験を扁桃体中心核に BDA を注入した場合についても同様の方法で行い、これらの結果を比較・検討した。

(2) 神経伝達物質の解析

① 吻側延髄腹内側部に逆行性標識物質 (CTb) を電気泳動的に注入して、一週間後に上記 (1) と同様の方法で灌流固定し、脳を摘出した。

② GABA 作動性ニューロンのマーカーであるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) をコードする mRNA、あるいはグルタミン酸作動性ニューロンのマーカーである小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT2) をコードする mRNA を *in situ* ハイブリダイゼーション法により検出し、Cy3 で蛍光標識した。その後に CTb を免疫組織化学的に検出し、AlexaFluor-488 で蛍光標識した。

③ 中心灰白質を含む切片を共焦点レーザー顕微鏡下で観察し、GAD67 mRNA 陽性、あるいは VGLUT2 mRNA 陽性 CTb 標識ニューロンについて分布の異動を解析した。

4. 研究成果

(1) 視床下部腹内側核および扁桃体中心核と、吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンとの連絡様式

同一のラットに対して、順行性標識物質であるビオチン化デキストランアミン (BDA)

を視床下部腹内側核に、逆行性標識物質であるコレラトキシン B サブユニット (CTb) を吻側延髄腹内側部にそれぞれ電気泳動的に注入した。BDA 標識線維を組織化学的に検出した後、免疫組織化学的に CTb 標識ニューロンを検出し、BDA 標識線維および CTb 標識ニューロンの中心灰白質における分布を解析した。その結果、BDA 標識線維および終末の分布領域と、CTb 標識ニューロンの分布領域との一致を、中心灰白質の背内側部、外側部において光学顕微鏡下に認めた。

さらに、これらの分布一致領域を電子顕微鏡下に観察すると、BDA で標識された視床下部腹内側核からの線維終末が、CTb 標識ニューロンの主に樹状突起と、そして付加的に細胞体と、非対称性のシナプスを形成していた。

上記と同様の方法を用いて、扁桃体中心核からの投射線維終末と、大縫線核から逆行性に標識された CTb 標識ニューロンの連絡様式について検討した。その結果、中心灰白質の特に外側部において、扁桃体中心核からの投射線維と CTb 標識ニューロンとの間に対称性シナプスが形成されることを示唆する所見を得た。

(2) 侵害刺激によって Fos 蛋白を発現するニューロンおよび吻側延髄腹内側部へ投射するニューロンの中心灰白質における分布

痛覚刺激によって Fos 蛋白を発現するニューロンと、吻側延髄腹内側部へ投射するニューロンの中心灰白質における分布の異同について検討した。実験では、吻側延髄腹内側部に逆行性標識物質である CTb を電気泳動的に微量注入したラットを用いて、足趾にホルマリンを微量注入することで痛覚刺激を与え、免疫組織化学的に CTb および Fos 蛋白を検出した。その結果、中心灰白質の背内側部、外側部および腹外側部において Fos 蛋白陽性ニューロン、CTb 標識ニューロンが多数認められ、その分布領域が一致することを確認した。しかし、CTb 標識ニューロンが Fos 蛋白を発現している例はほとんど認められなかった。そこで、下行性疼痛抑制系を構成する要素のうち、橋被蓋背外側部のノルアドレナリン作動性ニューロン群、特に A6 (青斑核) および A7 領域に着目し、現在はこれらの領域に CTb を注入して、逆行性に標識された CTb 標識ニューロンと Fos 蛋白陽性ニューロンの中心灰白質における分布の異同を解析している。

(3) 神経伝達物質の解析

CTb を用いた逆行性標識法と小胞性グルタミン酸輸送体 (VGLUT2) 及びグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD67) に対する *in situ* ハイブリダイゼーション法を併用することによって、

吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンが有する神経伝達物質について解析した。その結果、吻側延髄腹内側部へ投射する中心灰白質ニューロンのほとんどが VGLUT2 mRNA 陽性を示し、GAD67 mRNA 陽性を示すものはごく僅かであることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

(1) Oka T, Yokota S, Tsumori T, Niu JG, Yasui Y

Glutamatergic neurons in the lateral periaqueductal gray innervate neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventrolateral medulla of the rat
Neuroscience Research 74: 106-115, 2012
doi: 10.1016/j.neures.2012.08.001

査読有

(2) Niu JG, Yokota S, Tsumori T, Oka T, Yasui Y

Projections from the anterior basomedial and anterior cortical amygdaloid nuclei to melanin-concentrating hormone-containing neurons in the lateral hypothalamus of the rat

Brain Research 1479:31-43, 2012.

doi: 10.1016/j.brainres.2012.08.011

査読有

(3) Yokota S, Niu JG, Tsumori T, Oka T, Yasui Y

Glutamatergic Kölliker-Fuse nucleus neurons innervate hypoglossal motoneurons whose axons form the medial (protruder) branch of the hypoglossal nerve in the rat

Brain Research 1404:10-20, 2011.

doi: 10.1016/j.brainres.2011.06.025

査読有

[学会発表] (計 4 件)

(1) T. Tsumori, T. Oka, S. Yokota, Y. Yasui

Pancreatic islets cells receive axon terminals from melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells in the mouse

第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2013 年 3 月 28 日～30 日、サンポートホール高松・かがわ国際会議場 (香川)

(2) T. Tsumori, T. Oka, JG. Niu, Y. Yasui

Axon terminals originating from melanocortin-4 receptor-expressing nodose ganglion cells

lion cells form synapses with pancreatic endocrine cells in the mouse

第35回日本神経科学大会、2012年9月18日～21日、名古屋国際会議場（名古屋）

(3) T. Oka, S. Yokota, T. Tsumori, JG. Niu, Y. Yasui

Glutamatergic neurons in the lateral part of the periaqueductal gray innervate neurokinin-1 receptor-expressing neurons in the ventrolateral medulla of the rat

第34回日本神経科学大会、2011年9月14～17日、パシフィコ横浜（横浜）

(4) T. Tsumori, T. Oka, JG. Niu, Y. Yasui

Synaptic organization between melanocortin-4 receptor-expressing neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus nerve and enteric ganglia neurons in the mouse

第34回日本神経科学大会、2011年9月14日～17日、パシフィコ横浜（横浜）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡 達郎 (OKA TATSURO)
島根大学・医学部・助教
研究者番号：20508923

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：