

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861739

研究課題名(和文) 単一ニューロン標識法による痛覚神経回路の解析

研究課題名(英文) A morphological analysis of neural circuit for pain: a single neuron tracing study with viral vectors.

研究代表者

大野 幸 (Ohno, Sachi)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：00535693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔・顔面領域の痛み情報が脳皮質へ伝えられる神経回路の中で、特に三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)は痛みの感覚のみならず、不快感や恐怖感などの情動面や様々な自律神経系反応、そして痛みの調節機構(下行抑制系)など、痛みという感覚の持つ複雑さに直接関与していると考えられる。このため、この核のニューロンに着目し、単一痛覚ニューロンを詳細に解析し、『痛みの地図』を明らかにするべく研究を開始した。その結果、当初目標としていたSp5Cから視床へ直接投射するニューロンの数は非常に少なく、三叉神経脊髄路核内あるいはごく近傍領域への投射ニューロンの数が圧倒的に多い事がわかった。

研究成果の概要(英文)：The caudal part of trigeminal nucleus (Sp5C) is involved in nociceptive information processing from the head and orofacial regions. Sp5C neurons project to a number of regions within the thalamus, periaqueductal gray and hypothalamus. These projections are thought to be involved in cardiovascular and visceral modifications which are associated with noxious stimulation. In the present study, we investigated axonal and dendritic arborizations of single Sp5C neurons in rats with single neuron labeling method. The results suggest that a few Sp5C neurons projects to thalamus directly, but most Sp5C neurons innervates within Sp5 or near regions.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：三叉神経脊髄路核 痛覚神経回路 単一ニューロン標識法

1. 研究開始当初の背景

痛みは誰もが経験する身近な症状であるにもかかわらず、そのメカニズムは非常に複雑で未解明な部分が多い。それゆえ痛みを苦しむ人々、そしてその治療に苦慮する医療者の数は一向に減少しないのが現状である。その原因には、痛み刺激が末梢から脳に至り認識されるまでの痛覚神経回路網、すなわち『痛みの地図』が十分に解明されていないため、疼痛に対する治療も対症療法的な戦略をとらざるを得ないことが挙げられる。そのため、神経現象としての痛覚メカニズムの根本的な解明につながる基礎的知見が待たれている。

カプサイシン受容体の遺伝子クローニングを皮切りに、痛みの情報伝達に関わる受容体や物質など分子レベルでの解析が始まり、痛みに対する応答メカニズムも次第に明らかになってきた。しかし、慢性疼痛や痛覚異常など難治性の痛覚においては、そのメカニズムは、ほとんどブラックボックスのままである。その原因として、痛みを「極端な不快感」と認識する過程において、最も基盤となるべき脳内の痛覚神経回路網、すなわち『痛みの地図』の詳細が已然として明らかにされていないことが挙げられる。痛覚神経回路網に限らず、脳内神経回路網の解析手法として従来用いられてきた神経回路の形態学的解析法は、ある領域から別の領域への解析には適しているが、個々の単一ニューロンからある領域への精緻な解析をすることが難しく、大まかな神経回路網しか再現できなかった。

近年、遺伝子工学的に開発された Sindbis ウイルスベクター (Furuta et al., 2001) は、この技術的障壁を打開する画期的なツールとして注目され、これを用いた他の神経回路の研究では、これまでの神経科学の常識を覆すような新たな形態学的知見を次々と報告している (Matuda et al., 2009; Kuramoto et al., 2009)。申請者もこのウイルスベクターを用いた視床から大脳皮質への単一ニューロンレベルの神経回路解析を行い、新たな知見を見出した。

2. 研究の目的

本研究では、痛覚に関する神経回路のうち、三叉神経脊髄路核から視床への神経回路を単一ニューロンレベルで詳細に解析することで精密な『痛みの地図』を再現し、これまで難しいとされてきた痛みのメカニズムの解明、さらにはその治療法や制御・管理法など臨床応用に向けた基礎的知見を供給することを目的とする。

そこで本研究では、口腔・顔面領域の痛み情報が脳皮質へ伝えられる神経回路の中で、特に三叉神経脊髄路核尾側垂核 (Sp5C) に着目した。その理由として以下のような点が挙げられる。

1) Sp5C は視床核のうち、痛みの感覚的側面に関する後内側腹側核と、痛みの情動的側面に関する髄板内核群の両方に軸索投射する。

2) Sp5C は視床の他にも自立神経の高次中枢である視床下部と下行性疼痛調節系に関わる中心灰白質といった領域へも軸索投射する。

これらの形態学的所見より、Sp5C は痛みの感覚のみならず、不快感や恐怖感などの情動、様々な自律神経系反応、そして痛みの調節反応をも巻き込んだ、痛みの持つ複雑さに直接関与していると考えられる。しかし、単一の Sp5C ニューロンがある1つの視床核あるいは領域にだけ軸索投射するのか、それとも複数の視床核あるいは領域に同時に軸索投射するのかについてはわかっていない。

そこで本研究では単一の Sp5C ニューロンに着目し

① 単一 Sp5C ニューロンの視床核への軸索投射様式

② 単一 Sp5C ニューロンの視床核および視床核以外への軸索投射様式

について形態学的に精緻な解析を行い、統計学的に比較、検討し痛覚神経回路における Sp5C ニューロンの機能を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、近年開発された Sindbis ウイルスベクターによる単一ニューロン標識法を用いて、Sp5C を中心とした『痛みの地図』

を、以下のような手順で形態学的に明らかにする。

単一 Sp5C ニューロンへのウイルスベクター注入と、これを可視化する条件の最適化。

可視化された単一 Sp5C ニューロンの3次元的な再構築とその形態学的かつ定量的解析。

再構築したニューロンの局在と形態との相関関係を比較検討。

Sp5C を種々の化学的マーカーで染め分け、化学的アトラスを作製。

化学的アトラスを基に再構築したニューロンの化学的属性を検討。

①～⑤で得られた所見より、Sp5C の痛覚神経回路における機能を検討。

4. 研究成果

本研究の一番の目的である Sp5C から視床へ直接投射するニューロンを、ウイルスベクターを用いて単一ニューロンレベルで標識をすることはできなかった。Sp5C ニューロン集団としての投射様式を観察することはできたが、なぜ目的のニューロンが単一細胞レベルでサンプリングできないのかを検討した結果、Sp5C から視床へ直接投射するニューロンの数がこれまでの定説とは異なり絶対数が非常に少ない Sp5C のニューロンは三叉神経脊髄路核内あるいはごく近傍の領域へ投射するニューロンの数が圧倒的に多い 用いたウイルスベクターが視床へ直接投射するニューロンより、近傍へ投射するニューロンを標識しやすい(ウイルスの嗜好性)可能性がある、以上の3点が大きな要因として考えられた。そこで、研究の方向性を修正し、サンプリングしやすい の Sp5C ごく近傍へ投射するニューロンに焦点を当て、このニューロンを形態学的に分類することで、疼痛伝達のメカニズムについて言及することを試みた。その結果、視床への投射は認めないものの、単一ニューロンレベルで標識された Sp5C ニューロンを再構築したところ、過去に報告されたものに比べてより広い範囲に分布(吻尾方向に 2,200 μ m、内外側に

1,700 μ m)していることがわかった。また、集団レベルでの観察において、すべてのケースで三叉神経脊髄路核内と延髄網様体の投射が認められた。以上のことより、Sp5C のニューロンは直接視床に痛覚情報を伝えるというよりは、Sp5C 内あるいはごく近傍の領域へ情報を伝え、そこからさらに視床など上位へ情報が伝達されている可能性があることが示唆された。今後はさらにサンプル数を増やし、Sp5C を含む局所回路のさらなる詳細を解析していく予定である。

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1件)

1. Kuramoto E, Ohno S, Furuta T, Unzai T, Tanaka YR, Hioki H, Kaneko T. Ventral medial nucleus neurons send thalamocortical afferents more widely and more preferentially to layer 1 than neurons of the ventral anterior-ventral lateral nuclear complex in the rat. *Cereb Cortex* 2015, 25(1); 221-235. (査読あり)

[学会発表](計4件)

1. Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Ohno S, Sendo R, Koyanagi K, Toyodome S, Furuta T, Hioki H, Goto T. Dorsal and ventral parts of the thalamic nucleus submedialis provide two independent inputs to different areas of the rat orbitofrontal cortex: A single neuron-tracing study using virus vectors. *Neuroscience* 2016, 2016.11.12-16, San Diego (USA)
2. Kuramoto E, Iwai H, Yamanaka A, Sendo R, Ohno S, Furuta T, Hioki H, Goto T. Two types of orbitofrontal cortical projection from the rat submedial thalamic nucleus: Possible function in descending pain modulation. 第39回 日本神経科学大会, 2016.7.20-22, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. Kuramoto E, S. pan, Furuta T, Hioki H, Iwai H, Yamanaka A, **Ohno S**, Goto T, Kaneko T. A morphological analysis of thalamocortical projections arising from the rat mediodorsal nucleus: A single neuron-tracing study using viral vectors. Neuroscience 2015, 2015.10.17-21,Chicago (USA)

4. **大野 幸**, 倉本 恵梨子, 金子 武嗣, 園村 貴弘, 岩井 治樹, 糀谷 淳, 梶山 加綱. 組換えウイルストレースーによる、ラット三叉神経脊髄路核尾側亜核ニューロンの軸索分岐の形態学的解析. 第37回日本神経科学大会, 2014.9.11-14, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/masui/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大野 幸 (OHNO SACHI)
鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教
研究者番号：00535693

(2)研究分担者
無し

(3)連携研究者
無し

(4)研究協力者
無し