

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890179

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ボトムアップ的解析

研究課題名(英文)A bottom-up analysis of the pain neural circuit by a single neuron labeling study

研究代表者

大野 幸 (ohno, sachi)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：00535693

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：シンドビスウイルスベクターを用いた単一ニューロン標識法により、ラットの三叉神経脊髄路核尾側亜核(Sp5C)からの軸索投射の解析に着手した。まずSp5Cへの解剖学的アプローチ方法を検討したところ、Bregmaではなくobexを露出させて基準点とすることで、高い再現性で標的座標に注入することが可能となった。次に、高濃度のシンドビスウイルスベクターをSp5Cに注入し、順行性トレーサーとして用いて問題がないかどうかを検討した。ここまでの予備実験により、単一Sp5Cニューロンをシンドビスウイルスベクターによって可視化するための、プロトコルがほぼ完成した。

研究成果の概要(英文)：We started the analysis of the axonal projection from the spinal trigeminal nucleus caudalis (Sp5C) in rat brain by a single neuron labeling method with Sindbis viral vectors. First, we considered how to approach to the Sp5C anatomically. As a result, it became possible to inject into target coordinates with high reproducibility by exposing not bregma but obex to make standard coordinates. Next, we injected the high concentration Sindbis viral vectors into the Sp5C and examined whether it would be satisfactory using as an anterograde tracer. By the exploratory experiment, the protocol for visualizing a single Sp5C neuron by Sindbis viral vectors was nearly completed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系歯学

キーワード：三叉神経脊髄路核尾側亜核 単一ニューロン標識法 シンドビスウイルスベクター

1. 研究開始当初の背景

「痛み」とは「脳」が意識できる極端な不快感、と定義されている。ただし、痛みはその個人の主観的な体験であり、感じ方の個人差や意識レベルの違いによって痛みの度合いが異なるため、神経現象としての痛覚メカニズムの根本的な解明は難しいとされてきた。実際の臨床の現場でも、痛みを苦しむ患者、そしてその治療に苦慮する医療者の数は一向に減少せず、痛覚メカニズムの基礎的知見が待たれている。

1997年の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 ウイルスペクター (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ペ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、疼痛に関係する可能性のある新たな回路を見出した (Ohno et al., 2012)。

本研究では、これと同様の手法を用い、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より精密な『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。

2. 研究の目的

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係する後内側腹側核と、痛みの情動的側面に関係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含む、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、以下の、
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。

単一 Sp5C ニューロンの視床核への軸索投射様式

単一 Sp5C ニューロンの視床核以外への軸索投射様式

3. 研究の方法

本研究では、近年開発された Sindbis ウイルスペ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。

- (1) 単一 Sp5C ニューロンへのウイルスペクター注入と、これを可視化する条件の最

適化。

10週齢のWistarラットを抱水クロラル麻酔下で定位脳手術装置に固定し、ガラス電極経由で Sindbis ウイルス液を空気圧式微量注入器にて Sp5C に注入。

ラットを灌流固定後、脳を摘出し、連続凍結切片を作製。

免疫組織化学法を用いて、Sp5C ニューロンを可視化。

この過程で、ガラス電極の注入座標、その座標への解剖学的アプローチ方法、ガラス電極先端の形状、ウイルス液濃度、ウイルス注入から灌流固定までの Survival Time の長さ、最適な薄切断面、抗体の濃度や染色時間の検討を行う。

- (2) 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。

作成された標本を、デジタル標本作製システムを用いて網羅的に撮影して完全にトレースし、樹状突起および軸索を再構築する。対比染色により軸索の投射領域を同定し、さらにはそこにおける軸索終末の分布を定量的に解析する。

- (3) 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。

再構築したニューロンの Sp5C における局在と、細胞体の大きさ、樹状突起の広がり、樹状突起の分岐の数、軸索の投射先、軸索終末の数などの間に相関関係がないか詳細に比較検討する。

- (4) 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。

GABA 作動性のマーカーである GAD67 やカルシウム結合タンパクの1つである calbindin D28k などに対する免疫反応性を網羅的に調べ、Sp5C の化学的アトラスを作製する。

- (5) 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。

作製した化学的アトラスを基に、再構築したニューロンが位置する領域の化学的属性と、そのニューロン自身の化学的属性を判定し、用いた化学マーカーの種類

によりその持つ意味を検討する。

- (6) (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

まず Sp5C への解剖学的アプローチ方法について検討した。定位脳手術装置に固定して注入を行う際、通常は Bregma を基準座標とするが、今回の実験系では obex を直視できるように露出させ、そこを基準座標として注入を行う方法を試みた。その結果、高い再現性をもって標的座標に注入することが可能となった。次に、単一ニューロンを標識する前に、高濃度のシンドビスウイルスベクターを Sp5C に注入し、目標とする投射ニューロンにウイルスが感染するかを確認した。さらに、Sp5C 内の吻尾側、背腹側方向に注入座標を変え、これまでの先行研究と投射パターンに違いがなく、シンドビスウイルスが感染する神経細胞に偏りがなく、順行性トレーサーとして用いて問題がないかどうかを検討した。さらに、この過程で Sp5C の吻側と尾側では軸索の投射様式に違いが見られたため、吻側尾側を客観的に領域分けするための化学マーカーがないか検討した。ここまでの予備実験により、単一 Sp5C ニューロンをシンドビスウイルスベクターによって可視化するための、プロトコールがほぼ完成した。

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 2 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 (2013). in press. 査読あり

DOI: 10.1093/cercor/bht216.

【2】Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. Morphological analysis of thalamocortical axon fibers of rat posterior thalamic nuclei: A single neuron tracing study with viral vectors. *Cerebral Cortex*, vol. 22, pp. 2840-2857, December, 2012. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

【1】倉本恵梨子、瀧 世秀、大野 幸、田中康裕、雲財 知、古田貴寛、日置寛之、中村公一、藤山文乃、金子武嗣、運動系視床皮質投射の神経回路, 第 118 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2013 年 3 月 (香川).

【2】Ohno S, Kuramoto E, Furuta T, Hioki H, Tanaka YR, Fujiyama F, Sonomura T, Uemura M, Sugiyama K, Kaneko T. A Morphological Analysis of Thalamocortical Axon Fibers of Rat Posterior Thalamic Nuclei: A Single Neuron Tracing Study with Viral Vectors., The 8th FENS Forum of Neuroscience, 2012 年 7 月 (スペイン).

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/html/abs/anesth.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大野 幸 (OHNO SACHI)
鹿児島大学医学部・歯学部附属病院
全身管理歯科治療部・助教
研究者番号: 00535693

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し