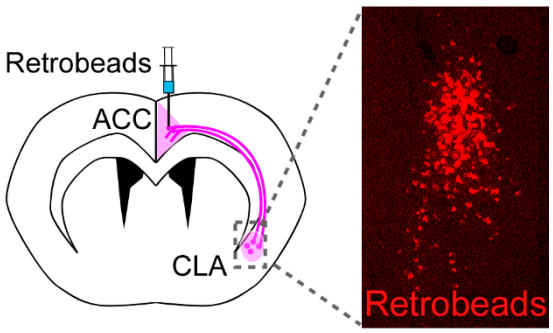
117　慢性疼痛時の前帯状皮質制御回路の変調機構の解析	古賀　啓祐

【目的】痛みは生体の警告系として重要な感覚であるが、過度な痛みや慢性痛は患者の QOL を著しく損なうため、痛みの神経回路基盤の解明による画期的な鎮痛薬の開発が急務の課題である。前帯状皮質（anterior cingulate cortex：ACC）は痛みの処理や慢性化に関与し、近年、痛み情報処理における ACC 神経の役割が徐々に明らかにされている。しかし、未だ ACC 神経活動制御の神経回路機構の全容は依然として不明な点が多く残されており、特に ACC 活動を抑制性に制御する神経回路メカニズムの詳細とその慢性疼痛時の機能変調については明らかになっていない。そこで、ACC を制御する新たな疼痛制御神経回路の探索を目的とし、逆行性トレーサーにより ACC に投射する神経核を網羅的に解析し、ACC が非常に強い入力を前障（claustrum：CLA）から受けることを見出した（下図）。CLA は ACC を含む前頭前皮質と相互の投射を持ち、皮質内の局所抑制性神経回路を利用して皮質活動を抑制性に制御し、睡眠と関連する脳波の発生や行動の意思決定に関与する。そこで特定した回路に関して遺伝学的なツールを用いることで、その神経回路の疼痛制御における役割を検討した。

【方法】ACC 神経がどのような神経核から投射を受けるのかを明らかにするために、ACC に逆行性トレーサー（レトロビーズ）を処置し、逆行性に標識される神経核をコンフォーカル顕微鏡で観察した。上記の実験で見出した CLA→ACC 回路の解析を目的として、ACC に投射する CLA 神経（$CLA^{\rightarrow ACC}$ 神経）を遺伝学的にラベルする手法の開発を行った。具体的には ACC 神経に逆行性に組換え酵素の Flp を発現させるアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターを処置、CLA 神経に Flp 依存的に機能性タンパク質として抑制性人工受容体の $PSAM^{4}$-Gly と興奮性人工受容体の hM3Dq を発現させる AAV ベクターを処置することで $CLA^{\rightarrow ACC}$ 神経特異的に遺伝子導入を行った。このように CLA 神経を標識したマウスを用いて行動学的な解析を実施した。

【結果】ACC 神経に逆行性トレーサー（レトロビーズ）を処置し、ACC への神経投射を網羅的に解析したところ、ACC は CLA 神経からの強い投射を受けることが明らかとなった。さらに、この神経投射の行動学的な役割を調べるために、方法に記載の AAV ベクターの処置により $CLA^{\rightarrow ACC}$ 神経特異的に抑制性の化学遺伝学的受容体（$PSAM^{4}$-Gly）を発現させた。$CLA^{\rightarrow ACC}$ 神経特異的な抑制は機械刺激に対する過敏化を引き起こした。一方で、興奮性の人工受容体（hM3Dq）による CLA 神経の活性化では、予想に反して痛覚過敏が認められた。これらの結果は、CLA→ACC 回路が複雑なメカニズムで ACC 神経活動と疼痛を制御することを示唆しており、活動の亢進と減弱のいずれかもしくは両方の CLA 活動異常が慢性疼痛時の前帯状皮質活動変調メカニズムに関与することが想定される。今後、CLA→ACC 回路の疼痛制御機構の詳細を解明することにより、慢性疼痛時に認められる痛覚過敏や不安症状を軽減する薬物の開発や新たな鎮痛薬の開発に繋がることが示唆される。

ACC に逆行性トレーサーを処置した際の CLA での細胞標識



117. 慢性疼痛時の前帯状皮質制御回路の変調機構の解析

古賀　啓祐

兵庫医科大学 医学部 生理学 神経生理部門

Key words：痛み，前帯状皮質，慢性疼痛，前障

緒　言

痛みは生体の警告系として重要な感覚であるが、過度な痛みや慢性痛は患者の QOL を著しく損なうため、痛みの神経回路基盤の解明による画期的な鎮痛薬の開発が急務の課題である。前帯状皮質（anterior cingulate cortex：ACC）は痛みの処理や慢性化に関与し、近年、痛み情報処理における ACC 神経の役割が徐々に明らかにされている。慢性疼痛には中枢性及び末梢性の疼痛感作が関与しており、ACC 神経におけるシナプスの可塑的な変化が慢性疼痛時の痛覚過敏や精神症状の発症に関連し、痛み情報の高次処理領域として痛みの慢性化とそれに伴う鬱や不安における ACC の役割と神経回路機構の詳細が徐々に明らかにされ始めている［1］。具体的には、ACC は視床背内側核（MD）や扁桃体基底外側核（BLA）から興奮性の入力を受けており、これらの入力が痛みや痛みの情動に関する情報を ACC に伝達する［2］。一方で ACC も様々な領域へ投射して疼痛制御に関与しており、ACC から腹側被蓋野（VTA）や BLA への投射は痛みによる不快情動に関与し、ACC から側坐核（NAc）への投射は痛みの共感に関与することが報告されている［3］。しかし、未だ ACC 神経活動制御の神経回路機構の全容は依然として不明な点が多く残されており、特に ACC 活動を抑制性に制御する神経回路メカニズムの詳細とその慢性疼痛時の機能変調については明らかになっていない。そこで、ACC を制御する新たな疼痛制御神経回路の探索を目的とし、逆行性トレーサーにより ACC に投射する神経核を網羅的に解析したところ、ACC 神経は同側の前障（claustrum：CLA）神経より強い入力を受けることが明らかとなった。CLA は ACC を含む前頭前皮質と相互の投射を持ち、皮質内の局所抑制性神経回路を利用して皮質活動を抑制性に制御し、睡眠と関連する脳波の発生や行動の意思決定に関与する［4］。そこで、ACC→CLA 神経回路が疼痛制御及び慢性疼痛病態において重要な役割を担う可能性を想定して検討を行った。

方　法

1. 逆行性トレーサーの ACC への処置とコンフォーカル顕微鏡による解析

過去の報告に従って［5］、ACC（anterior-posterior, AP, from bregma＋0.5 mm, medio-lateral, ML, from bregma 0.3 mm, dorso-ventral, DV, from dura 1.0 mm）に逆行性トレーサーの Retrobeads を 250 nL マイクロインジェクションした。インジェクションから 1 週間後に、マウスの脳を 4%パラホルムアルデヒド溶液で固定、スクロース液で置換後、OTC コンパウンドで包埋した。クライオスタットにより脳切片を薄切、切片をスライドガラスに張り付けて、脳組織切片をコンフォーカル顕微鏡（LSM780）により観察した。

2. アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターの処置

ACC に投射する CLA 神経（$CLA^{\neg ACC}$ 神経）の活動を特異的に制御する目的で、1 と同様に ACC（AP＋0.5 mm, ML 0.3 mm, DV 1.0 mm）及び CLA（AP＋0.5 mm, ML 2.5 mm, DV 2.5 mm）に AAV ベクターを処置した。ACC への逆行性ベクター処置の 1 週間後に CLA に FLP 依存的な AAV を処置した。使用した AAV と使用濃度は AAVrg-EF1α-Flpo（5.0×10^{12} GC/ml, Addgene, 55637-AAVrg）、AAV9-EF1α-fDIO-PSAM^{4}-Gly-2A-

mCherry（5.0×10^{12} GC/ml、 九州大学薬学部の津田誠教授より譲渡頂いた）、AAV9-EF1α-fDIO-hM3Dq（5.0×10^{12} GC/ml、生理学研究所ウイルスベクター作製室の小林憲太准教授より作製して頂いた）である。

3. ホールセルパッチクランプ法による PSAM^{4}の機能的発現の確認

過去の報告に従って、脳の急性スライス標本を作製して蛍光標識された CLA 神経からのホールセルパッチクランプを行った。パッチクランプ記録には K-gluconate 内液を用いて、電流固定下で PSAM 受容体のアゴニストの varenicline （100 nM）を還流処置して、パッチピペットから加えた電流で脱分極させたときに誘発される活動電位に対する影響を解析した。

4. von Frey 法による足底の機械刺激に対する反応閾値の解析

von Frey フィラメント（North Coast Medical）を用いた Up and down 法により、触刺激に対する痛み行動の測定を行った。動物をアルミ製メッシュケージに入れ、30 分から 1 時間順応させた。その後、床下面よりフィラメントをマウスの足底部に接触させ、フィラメントが湾曲する程度に力を加えた。フィラメントの湾曲状態を 2 秒間保持し、脚を素早く退ける、脚を舐めるといった痛み行動の有無を確認した。沈静していない動物には、落ち着くまでフィラメントを接触させなかった。PSAM 受容体のアゴニストである varenicline（0.5 mg/kg、生理食塩水に希釈）もしくは hM3Dq のアゴニストである CNO（3 mg/kg、生理食塩水に希釈）、コントロールとして溶媒の生理食塩水の投与前と投与後 60 分にマウス後肢疼痛閾値を測定した。

結　果

1. ACC への神経投射の網羅的解析

ACC に逆行性のトレーサーを処置することにより、ACC への神経投射を解析した。過去に痛みとの関連が報告されている視床背内側核（MD）や扁桃体基底外側核（BLA）や反対側の ACC からの入力を確認した。さらに、同側の CLA からの強い入力を受けていることを明らかとした（図 1）。以下の検討において、CLA 神経の疼痛制御における役割は不明な点が多いことから CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の痛覚制御における役割を解析した。

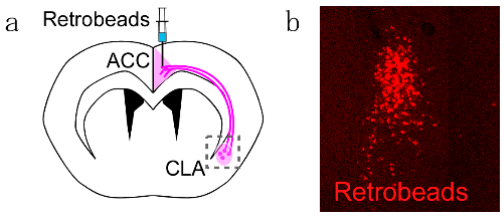


図 1. 逆行性標識による ACC→CLA 神経回路の同定

a） 逆行性トレーサー処置の模式図。

b） 標識された CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の代表的画像。

2. CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の抑制は機械性の痛覚過敏を引き起こした

CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の疼痛制御における役割を調べる目的で、CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経に特異的な抑制性の人工受容体である PSAM^4-Gly を発現させた。具体的には、ACC に逆行性 AAV ベクターである AAV2-retro-Flpo を処置し、ACC と同側の CLA に Flpo 依存的に PSAM^4-Gly を発現させる AAV ベクターを処置した。その結果、CLA において特異的な mCherry （PSAM^4-Gly と同時に発現）の発現が確認された（図 2a、b）。さらに、スライスパッチクランプ法により実際に PSAM^4-Gly のアゴニストが機能的に CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経活動を抑制するのかについて検討を行ったところ、varenicline（100 nM）の還流処置は、パッチピペットからの電流の注入による活動電位の発生を

優位に抑制した（図 2c)。実際に行動学的に CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の抑制がどのような行動変化を引き起こすのかを von Frey 法により調べたところ、ベクターを投与した対側の後肢において非常に強い機械性の痛覚過敏が引き起こされた（図 2d)。

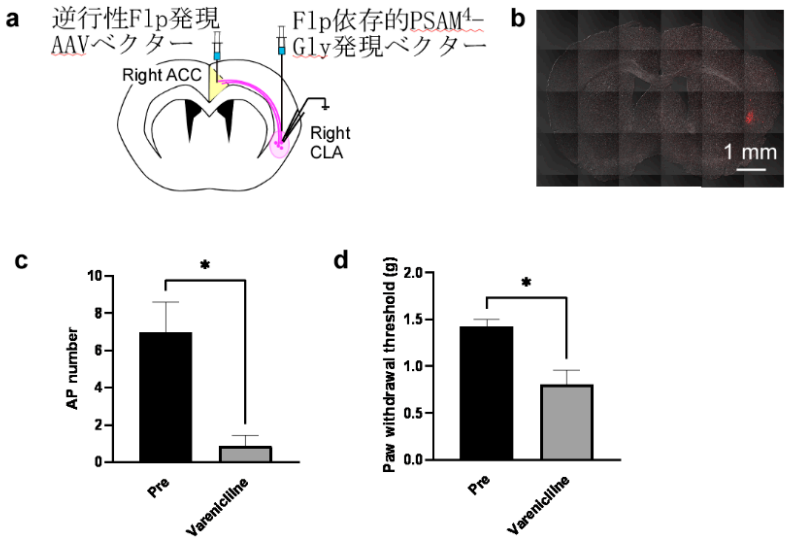


図 2. 逆行性 CLA→ACC 神経への PSAM^{4}-Gly の遺伝子導入

a) ウイルスベクター処置の模式図。

b) 標識された CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の代表的画像。

c) Varenicline による神経発火の抑制。*p＜0.05（Two-tailed paired t-test）。

d) Varenicline による機械刺激過敏の誘発。*p＜0.05（Two-tailed paired t-test）。

3. 化学遺伝学的手法による CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経活動の調節法の確立と行動学的解析

2 と同様の方法を用いることにより、CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経に特異的に hM3Dq を発現させた。hM3Dq は CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経に特異的且つ機能的に発現することを免疫染色法とパッチクランプ法により確認した。そこで、行動学的な解析を行ったところ、CLA$^{\rightarrow ACC}$ 神経の特異的活性化は予想に反して疼痛閾値の低下を引き起こした。

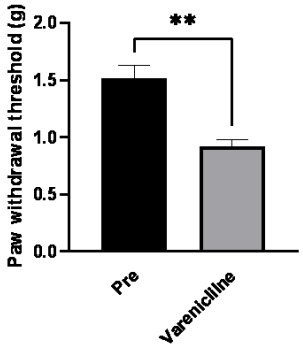


図 3. hM3Dq の特異的導入による CLA→ACC 神経活性化の行動学的影響

CNO 処置による機械刺激閾値の変化。**p＜0.01（Two-tailed paired t-test）。

考　察

本研究により、痛覚調節に関与する新たな神経回路として CLA→ACC 回路が同定された。さらに、CLA→ACC 神経回路特異的な遺伝子導入にチャレンジして、$CLA^{\neg ACC}$ 神経に特異的且つ機能的に人工受容体を発現させて同回路を抑制または興奮の両方行性に制御する手法を確立した。この遺伝子導入マウスを用いた行動学的な解析から、化学遺伝学的手法による同回路の抑制は疼痛過敏を引き起こす一方で、同回路の興奮もまた痛覚過敏を引き起こすという矛盾したデータが得られた。これらの結果は同回路がその活動レベルに応じて疼痛を抑制と増強の両方行性に調節することを示唆する。さらに、CLA→ACC 回路活動の正常レベルからの活動増強と活動低下のいずれか、もしくは両方が慢性疼痛時の痛覚過敏や付随する不安症状の発症及び、急性期及び慢性期の疼痛の発症及び維持、特定の疼痛モデルに特異的に関与する可能性が考えられる。そこで、今後はより正確に $CLA^{\neg ACC}$ 神経活動レベルを調節できる光遺伝学的な手法を用いた解析により、CLA→ACC 回路による疼痛の両方行性の制御メカニズムの解明と、慢性疼痛時の機能変調の解析が重要である。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、兵庫医科大学医学部神経生理学部門の古江秀昌教授、九州大学薬学研究院薬理学分野の津田誠教授、自然科学研究機構生理学研究所ウイルスベクター作製室の小林憲太准教授である。本研究の遂行に協力していただいた兵庫医科大学医学部生理学神経生理部門の皆様、研究設備を提供していただいた兵庫医科大学共同利用研究施設、西宮病態モデル研究センターに感謝申し上げます。

文　献

1） Tan, L.L., and Kuner, R. (2021). Neocortical circuits in pain and pain relief. Nat Rev Neurosci *22*, 458-471. PMID: 34127843, DOI:10.1038/s41583-021-00468-2.

2） Meda, K.S., Patel, T., Braz, J.M., Malik, R., Turner, M.L., Seifikar, H., Basbaum, A.I., and Sohal, V.S. (2019). Microcircuit Mechanisms through which Mediodorsal Thalamic Input to Anterior Cingulate Cortex Exacerbates Pain-Related Aversion. Neuron *102*, 944-959 e943. PMID: 31030955, DOI: 10.1016/j.neuron. 2019.03.042.

3） Smith, M.L., Asada, N., and Malenka, R.C. (2021). Anterior cingulate inputs to nucleus accumbens control the social transfer of pain and analgesia. Science 371, 153-159. PMID: 33414216, DOI: 10.1126/science.abe3040.

4） Narikiyo, K., Mizuguchi, R., Ajima, A., Shiozaki, M., Hamanaka, H., Johansen, J.P., Mori, K., and Yoshihara, Y. (2020). The claustrum coordinates cortical slow-wave activity. Nat Neurosci 23, 741-753. PMID: 32393895, DOI: 10.1038/s41593-020-0625-7.

5） Koga, K., Kobayashi, K., Tsuda, M., Pickering, A.E., and Furue, H. (2024). Anterior cingulate cross-hemispheric inhibition via the claustrum resolves painful sensory conflict. Commun Biol 7, 330. PMID: 38491200, DOI: 10.1038/s42003-024-06008-9.