



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	慢性痛による情動変容における拡張扁桃体の可塑的变化の役割
Author(s)	山内, 直紀
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(薬科学)
Dissertation Number	甲第14402号
Issue Date	2021-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14402
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96766
Type	doctoral thesis
File Information	Naoki_Yamauchi.pdf



博士学位論文

慢性痛による情動変容における拡張扁桃体の可塑的変化の役割

山内直紀

北海道大学大学院生命科学院

令和3年3月

目次

第1章 はじめに

第1節 研究背景.....	2
1) 痛みと情動について.....	2
2) 分界条床核について.....	2
3) 本研究の目的.....	4
第2節 実験方法.....	5

第2章 分界条床核神経回路における可塑性

第1節 緒言.....	11
第2節 結果.....	11
1) 慢性痛モデルマウスの行動解析.....	11
2) 外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞におけるシナプス伝達の解析.....	11
3) 薬理遺伝学的手法を用いた神経活動操作が不安様行動に及ぼす影響.....	16
第3節 考察.....	19

第3章 細胞種選択的な機能解析

第1節 緒言.....	23
第2節 結果.....	23
1) 分界条床核内における抑制性神経回路.....	23
2) 慢性痛による CART 陽性神経細胞の電気生理学的性質の変化.....	25
3) CART 陽性神経細胞の興奮性増大による影響.....	26
第3節 考察.....	26

第4章 結語..... 29

参考文献..... 30

謝辞..... 36

第1章 はじめに

第1節 研究背景

痛みと情動について

痛みは不快な感覚的かつ情動的体験である。痛みの発生源となる侵害刺激は、侵害受容器において電気信号へと変換される。電気信号へと変換された痛みは、脊髄内を交叉して上位中枢へと伝導し、視床および腕傍核などの脳幹部へと達する。視床へ伝達された侵害情報は、体性感覚野や島皮質、前帯状回皮質などの大脳皮質へ、腕傍核へ伝達された侵害情報は主に分界条床核や扁桃体中心核をはじめとした拡張扁桃体を構成する諸神経核群などの大脳辺縁系へと伝達される^{1,2}。前者は痛みの強度や局在などの感覚的認知に機能すると考えられてきた一方で、後者は侵害情報に対する情動的反応に関与すると考えられてきた¹⁻³。痛みが引き起こす抑うつや不安、嫌悪などの不快情動は、身体への危険を警告し、脅威に対する逃避行動を生み出すことから、生命を維持するための生体警告系として重要である。しかし、生体警告系としての役割を果たし終えた後にも痛みが持続する慢性痛において、痛みは、うつ病や不安障害などの精神疾患の引き金になると考えられる。実際に、臨床研究において慢性痛と精神疾患の併存率は高いことが報告されている^{4,5}。また、実験動物においても慢性痛が情動行動を変化させるということが数多く報告されている⁶⁻¹¹。これらの知見は、慢性痛が、痛みの情動的側面を制御する中枢神経系に可塑的变化を生じさせることで、情動変容をきたしていることを推測させる。慢性痛と精神疾患は、患者のQOL（Quality of Life）を著しく障害するとともに、就労困難を招くなど社会的損失という観点からも大きな影響を及ぼす深刻な疾患である。しかし、これら疾患においてはその神経機構がまだ解明されていないことが、病態機序に基づいた治療薬や治療法の開発を困難にしている。したがって、慢性痛時に、痛みの情動的側面を制御する中枢神経系に生じる可塑的变化の機構を明らかにすることは、慢性痛や精神疾患に対して効果的な新規治療戦略の構築に有意義である。

分界条床核について

分界条床核は、大脳辺縁系に位置し、扁桃体中心核とともに“拡張扁桃体”と呼ばれる神経核群の構成要素である¹²。これら神経核は情動反応における中核であり、非常に類似した特性を有する。例えば、これら神経核群はそのほとんどが抑制性神経伝達物質であるγ-アミノ酪酸（GABA）作動性の神経細胞から構成されているとともに¹³、類似した神経ペプチドの発現、類似した神経接続を有する¹⁴⁻¹⁷。ただし、扁桃体中心核が一過性の防御反応を制御する一方で、分界条床核は持続的な防御反応を制御するとされ¹⁸、少なからず機能的差異が存在する。分界条床核は、ストレス応答や不安の制御に重要な神経核として着目されている。げっ歯類では、分界条床核の破壊によりストレス関連ペプチドであるコルチコトロピン放出因子（Corticotropin-releasing factor; CRF）による驚愕反応亢進や不安様行動が軽減される

^{19,20}。また、捕食者のにおいや不安を惹起するような薬物により分界条床核での神経活動マーカーc-Fos の発現上昇が認められる^{21,22}。このような知見から、分界条床核は不安情動生成に中心的な役割を果たし、生体の生存可能性に寄与していると考えられる。また、分界条床核は脊髄後角から直接的に、および腕傍核を介して侵害情報を受け取る領域である^{2,23}。さらに、分界条床核の活動は痛みによる不快情動生成に対して必須である^{24,25}。慢性痛による情動変容は、痛みの情動処理を担う神経機能の破綻に起因する可能性が考えられるが、分界条床核の関与についてはほとんど研究がされていない。

分界条床核の神経生物学的性質の特徴として以下のようなものが挙げられる。

1) 不均一な神経細胞から構成される脳領域である

分界条床核は主に GABA 作動性の抑制性神経から構成される神経核であるが¹³、その電気生理学的特性は一様ではなく、神経細胞によってイオンチャネルの発現様式が異なる^{26,27}。これに一貫して、分界条床核内の神経細胞は遺伝子発現パターンに多様性を有し、その発現に基づいていくらかのクラスターに分けられることが近年報告された^{28,29}。これらの報告は、分界条床核内の神経細胞が性質として不均一であり、機能的にも異なる役割を有することを示唆する。

2) 複数の亜核から構成される脳領域である

分界条床核は複数の亜核に分けられる複雑な構造を有する^{30,31}。その分類方法は議論のあるところであるが、本研究においては Figure.1 で示すような亜核に分類した。それぞれの亜核は異なる神経入力および出力を有する。例えば、扁桃体外側核は分界条床核へ密な神経投射を送るが、その入力 oval 領域では見られない¹⁵。また、anterodorsal 領域は外側視床下部や腹側被蓋野などに神経投射を送る一方で³⁰、oval 領域は扁桃体中心核、無名質などに神経投射を送る³²。さらに、oval 領域の神経細胞は分界条床核内に抑制性シナプスを形成することが知られている³²⁻³⁴。1) と関連するように、それぞれの神経路を構成する神経細胞は異なる電気生理学的性質を有する³⁵

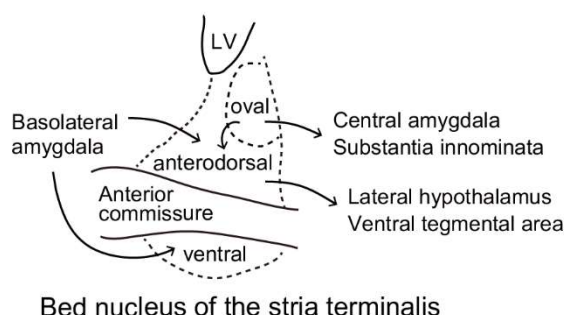


Fig.1 分界条床核の亜核とその神経入出力様式

Anterior commissure: 前交連、Bed nucleus of the stria terminalis: 分界条床核、Basolateral amygdala: 扁桃体外側部、Central amygdala: 扁桃体中心核、Lateral hypothalamus: 外側視床下部、LV: 側脳室、Substantia innominate: 無名質、Ventral tegmental area: 腹側被蓋野

3) 形成する神経路ごとに異なる機能を発揮する

分界条床核は不安や恐怖、嫌悪などの不快情動制御に重要な脳領域であるが³⁶、光遺伝学³⁷や薬理遺伝学^{38,39}などの手法の開発により、分界条床核が形成する神経路は各々が異なる

情動制御機構を有することが明らかになった。例えば、分界条床核→外側視床下部および分界条床核→腹側被蓋野の活性化は不安様行動を抑制する一方で^{33,40}、分界条床核→扁桃体中心核の活性化は不安様行動を促進する³⁵。したがって、分界条床核神経の機能を解析する際には、その神経細胞が形成する神経路を明確にすることが重要であると考えられる。

本研究の目的

慢性痛による情動変容は、痛みの情動処理を担う神経機構の可塑的变化に起因することが推測される。本研究は、痛みの情動処理に関与すると考えられる分界条床核に着目し、慢性痛による分界条床核の可塑的变化が、情動へどのような影響を及ぼすのか明らかにすることを目的とする。また、慢性痛による情動変容の神経機構解明を突破口とし、その詳細を明らかにすることで精神疾患の病態機序に迫ることを目指す。

第2節 実験方法

使用動物

実験には 8-10 週齢、雄性の C57BL6JmsSlc マウス (Japan SLC) もしくは Tg (Cartpr-cre) 1Aibs/J (Cart-Cre マウス, Jackson Laboratory) を使用した。飼育環境は、室温 $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、明暗周期 12 時間 (明期: 7:00-19:00; 暗期: 19:00-7:00) とした。動物は 2-4 匹ごとにケージで飼育し、摂食および飲水が自由に行える環境に置いた。動物は、無作為に実験グループへと振り分けた。行動解析は明期に行った。すべての動物実験は、国立保健研究機構のガイドラインに沿って実施され、北海道大学動物実験委員会の承認のもと行われた。

ウイルスベクター

使用したアデノ随伴ウイルスベクター (Adeno-associated virus; AAV) を以下に記載する。AAV2-retro/CAG-Cre, AAV5-DIO-hSyn-ChR2-EYFP, AAV5-EF1 α -DIO-EYFP は University of North Carolina Vector Core より購入した。AAV5-hSyn-DIO-hM4Di-mCherry (44362-AAV5), AAV5-hSyn-DIO-hM3Dq-mCherry (44361-AAV5), AAV5-hSyn-DIO-mCherry (50459-AAV5), AAV5-FLEX-EGFP10A (98747-AAV5), AAV8-hSyn-DIO-HA-hM4Di-IRES-mCitrine (44361-AAV8) は Addgene より購入した。AAV9/2-CBA-FLEX-Synaptophysin-mCherry (J96) は理化学研究所 (J.P. Johansen 研究室) で作製されたものを使用した⁴¹。

脳定位固定手術

ウイルスベクターおよび神経トレーサーの脳内微量投与を行うため、マウスをイソフルラン (導入 3.0%、維持 1.0-1.5%; Pfizer) により麻酔した後、脳定位固定装置 (SR-6M-HR, Narishige) へ固定した。頭皮の切開前には鎮痛のためリドカインを塗布した。30G インジェクションカニューラを目的の脳部位に挿入し、シリンジポンプ (KD Scientific) を用いて 250 nl/side のウイルス溶液を投与した。各脳部位の座標は、それぞれ、分界条床核 (AP: +0.6 mm, ML: 1.1 mm, DV: 3.9 mm to bregma)、外側視床下部 (AP: - 1.1 mm, ML: 1.2 mm, DV: 5.6 mm to bregma) とした。ウイルス溶液の投与完了後、頭蓋に開けた穴は歯科用セメントで埋め、シルク縫合糸により頭皮を縫合した。手術後、鎮痛のためメロキシカム (1 mg/kg) を皮下投与した。AAV2-retro-CAG/Cre は投与部位確認のため、1000 倍に希釈した蛍光ビーズ (Lumafluor) をウイルス溶液に混合した。外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞の可視化には赤色蛍光ビーズ (red retrobead; Lumafluor) を生理食塩水に 1:2 の倍率で希釈したもの 300 nl を同様の方法を用いて外側視床下部へ投与した。

慢性痛モデルマウスの作製

Spared Nerve Injury モデルを慢性痛モデルマウスとして使用した⁴²。8-10 週齢のマウスを

イソフルラン（導入 3.0%、維持 2.0%）により麻酔した。マウス左後肢大腿部の皮膚と二頭筋を切開し、坐骨神経を露出させた。総腓骨神経および脛骨神経をシルク縫合糸で結紮した後に末梢側を切断した。この際、腓骨神経には傷をつけなかった。リドカインを創傷部に滴下した後、筋肉および皮膚を二層に分けて縫合した。術後管理には 0.1% ゲンタマイシンを塗布するとともに加温チャンバーにマウスを 30 分間静置した。坐骨神経の露出までを行ったが神経結紮および切断を施さなかった群（Sham 群）を対照群とした。当該手術を行った後、マウスは個別ケージにて飼育した。

疼痛閾値の測定

von Frey 試験により疼痛閾値を測定した。マウスをワイヤーグリッド状の床面を有する高架プラットホームに 20 分間馴化させた。後肢の足底表面を von Frey フィラメント（0.04, 0.07, 0.16, 0.40, 0.60, 1.00, 2.00 g; North Coast Medical, Inc.）を用いて刺激した。刺激した後肢を、舐める、噛む、引き下げるなどした場合を反応ありと判定した。0.16 g のフィラメントから刺激を開始し、up down 法を用いて疼痛閾値を算出した⁴³。麻痺を示した個体や疼痛閾値の低下を示さなかった個体は以後の実験グループから除外した。

行動解析

マウスの情動行動を評価するため、以下の行動解析を行った。はじめに、試験を行う環境への馴化を目的にマウスを 30 分間程度、試験を行う部屋に馴化させた。行動解析はオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、明暗箱試験の順に 3 日連続で行った。薬理遺伝学的手法を用いて神経活動を操作する場合は、試験開始の 40 分前に Clozapine-N-Oxide (CNO; 1.0 mg/kg; abcam) を腹腔内投与した⁴⁴。Vehicle 溶媒には生理食塩水を用いた。行動解析には Noldus Ethovision 11.5XT を用いた。

○オープンフィールド試験： 46×46×23 cm の白色オープンフィールドを用いた。照度は 50-60 lux に設定し、防音箱の中で記録を行った。中央 23×23 cm を center zone とし、その周囲を periphery zone とした。試験開始時にマウスを periphery zone に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって 5 分間記録した。

○高架式十字迷路試験： 長さ 30 cm、幅 7 cm の Closed arms と、長さ 30 cm、幅 7 cm の open arms、および 7×7 cm の center area を持つ装置を用いた。高さは床から 40 cm、照度は open arms および center area で 6±1 lux、closed arms で 3±1 lux に設定した。試験開始時にマウスを center area に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって 5 分間記憶した。

○明暗箱試験： 上部が開放された 32×25×25 cm の白色の明箱と上部が覆われた 16×25×25 cm の黒色の暗箱を用いた。これら二つの箱は 7×7 cm の出入り口があり、マウスは自由に行き来できる。照度は白色の明箱で 400-500 lux に設定した。防音箱の中で記録を行っ

た。試験開始時にマウスを黒色の暗箱に静置し、その後の行動を上部に設置したカメラによって 5 分間記録した。

電気生理学的解析に用いる冠状断脳切片の作製

ペントバルビタール酸ナトリウム (100 mg/kg) を腹腔内へ投与することでマウスを深麻酔した後に開腹し、混合ガス (95% O₂/5% CO₂) を通気した氷冷のダイセクションバッファ (113.9 mM Choline Chloride, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.3) で経心灌流した。断頭した後、脳を素早く摘出した。氷冷のダイセクションバッファで満たしたチャンバー内に摘出した脳を移し、ビブラトーム (VT1200S, Leica) を用いて分界条床核を含んだ厚さ 250 μ m の冠状断脳切片を作製した。作製した脳切片は 15 分間、34°C の人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid; ACSF: 126 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 26 mM NaHCO₃, and 10 mM glucose, oxygenated with 95% O₂/5% CO₂, pH 7.3) に通気を行いつつ静置した。続いて、通気した 20-22°C の ACSF 溶液に移し、実験に使用するまで静置した。実験時は、通気された 34°C の ACSF が 1.0-1.5 ml/min で灌流されるチャンバー内に脳切片を移して記録を行った。神経細胞の同定にはチャンバー上部に設置された顕微鏡 (BX50WI; Olympus) を用いた。

ホールセルパッチクランプ記録

作製した脳切片内の分界条床核神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。Retrobeads により標識された外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞、もしくは蛍光タンパク質の発現により標識された分界条床核神経細胞は、蛍光レンズ (LUMPlanLF N 40 $\times$ /0.80; Olympus) を用いて可視化した。記録したすべての神経細胞は、その電気生理学的特性を確認した。過分極活性化型電流 (hyperpolarization-activated current; I_h) は環状ヌクレオチド調節チャンネル (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated; HCN チャンネル) の発現量を反映しており、分界条床核の神経細胞の機能的差異を測る指標として考えられる^{26,45}。はじめに、 I_h の有無を確認した (Fig. 3B 参照)。電位を -60 mV に保持した状態で長さ 400 ms、-20 pA 刻みの電流を 0 pA から順に最大 -240 pA まで注入した。この際、過分極電位のピーク (V_{min}) が -100 mV 付近となるトレースを用いて、ベースとなる電位 (V_{base}) および安定時の電位 (V_{ss}) から次の計算式により Voltage sag を算出した。

$$\text{Voltage sag (\%)} = \frac{(V_{min} - V_{ss})}{(V_{min} - V_{base})} \times 100$$

10%以上の大きさの Voltage sag を有する細胞を I_h -positive な細胞と判断した³⁵。

○シナプスイベントの解析： シナプス電流の測定のため、細胞内液 (65 mM K-gluconate, 70 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-

ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 M Ω のガラスピペットを使用した。ガラスピペットの作製はマイクロピペットプラー (Model P-1000IVF; Sutter Instrument) を用いた。電位固定モードにて、電位を -70 mV に保持した。自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic currents: sIPSC) を記録する際には AMPA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である 6-cyano-7-nitroquinoxaline-2, 3-dione (CNQX, 10 μ M; Sigma-Aldrich) および NMDA 型グルタミン酸受容体拮抗薬である 2-amino-5-phosphonopentanoic-acid (AP5, 50 μ M; Santa cruz) を用いてグルタミン酸伝達を阻害した。微小性抑制性シナプス後電流 (miniature IPSC: mIPSC) を記録する際には、活動電位の軸索伝達を阻害するためにテトロドトキシン (TTX, 1 μ M; Wako) をさらに処置した。自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic currents; sEPSC) を記録する際には GABA_A 受容体拮抗薬であるピクロトシキン (PTX, 100 μ M; Sigma-Aldrich) を用いて GABA 伝達を阻害した。シナプス伝達の解析には 1 分間の記録を使用した。累積確率の算出には細胞ごとに 20 回のシナプスイベントを使用した。

○薬理遺伝学的手法を用いた解析： hM4Di 受容体の機能的発現を確認するため、細胞内液 (132 mM K-gluconate, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 M Ω のガラスピペットを使用した。電流固定モードにて、静止膜電位での記録を行った。膜抵抗の測定のため、記録中は 20 秒ごとに -20 pA の電流を注入した。5 分間のベースラインを測定した後に CNO (10 μ M) を 5 分間処置した。CNO 処置前の 1 分間 (Pre: -1~0 min) および CNO 処置後の 1 分間 (CNO: 4~5 min) を比較した。

sIPSC の変化を測定するため、細胞内液 (65 mM K-gluconate, 70 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 M Ω のガラスピペットを使用した。電位固定モードにて、電位を -70 mV に保持した。CNQX (10 μ M) および AP5 (50 μ M) を加えることでグルタミン酸伝達を阻害した。ベースラインの測定後、CNO (10 μ M) を 5 分間処置した。自発性抑制性シナプス後電流の頻度変化を CNO 処置前 (-1~0 min) および CNO 処置後 (4~5 min) で比較した。

○光遺伝学的手法を用いた解析： 抑制性シナプス接続の有無を確認するため、特定の神経細胞にチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させた脳から切片を作製し、青色光 (λ = 465 nm, 5 ms duration; LEX2-LZ4-B; Brainvion Inc.) を照射した際のシナプス後電流を測定した。記録には、細胞内液 (65 mM K-gluconate, 70 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 M Ω のガラスピペットを使用した。電位固定モードにて、電位を -70 mV に保持した。CNQX (10 μ M) および AP5 (50 μ M) を加えることでグルタミン酸伝達を阻害した。青色光に応じて、振幅が 10 pA より大きく、かつ、10 回刺

激したうち 6 回以上の抑制性シナプス後電流が確認できた場合に抑制性シナプス接続が形成されていると判断した。

○電気生理学的特性の解析：電気生理学的特性の解析のため、細胞内液(132 mM K-gluconate, 3 mM KCl, 10 mM HEPES, 0.5 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 12 mM Na-phosphocreatine, 4 mM Mg-ATP, 0.5 mM Na-GTP, 0.2% biocytin, pH 7.2-7.3 adjusted with KOH) で満たされた先端が 3-7 MΩ のガラスピペットを使用した。解析は以下の手順で行った。1) 静止膜電位を測定するため、電流固定モードにて電流を注入せず、60 秒間の電位を測定した。2) 膜抵抗を測定するため、電流固定モードにて膜電位を -60 mV に保持した。-20 pA 刻みの過分極性電流 (5 sec duration, 0 pA ~ -80 pA) を注入した。3) 発火閾値および基電流を測定するため、電流固定モードにて電位を -80 mV に保持した。+10 pA 刻みの脱分極性電流 (5 sec duration) を注入した。発火閾値は、dV/dt が 10 を超える電位として解析した。

すべてのデータは Multiclamp 700B (Axon Instruments) を用いて取得し、0.2 kHz のフィルタリングおよび 10 kHz のサンプリングを行った。データの解析には pClamp10 (Molecular Devices) と Matlab (Mathworks) を用いた。静止膜電位が -50 mV よりも浅い神経細胞もしくは、その活動電位がオーバーシュートしない神経細胞は記録から除外した。アクセス抵抗値が 30 MΩ を超えるもの、もしくは記録中に 20% 以上変化した神経細胞も記録から除外した。

組織学的解析

ペントバルビタール酸ナトリウム (100 mg/kg, i.p.) による深麻酔下で phosphate-buffered saline (PBS) 溶液を経心灌流した後、4% paraformaldehyde (PFA) 含有 PBS 溶液を経心灌流し、断頭して脳を摘出した。摘出した脳は 4% PFA 溶液中に 4°C で一晩静置した後、30% スクロース含有 PBS 溶液に二晩静置することでクライオプロテクションを行った。その後、ドライアイスを用いて脳を急速凍結した。クライオスタット (CM3050S; Leica) を用いて厚さ 40 μm の冠状断切片を作製した。切片は PBS 溶液中に 4°C で保存した。免疫組織化学染色では、はじめに脳切片を 0.3% の Triton X100 を含む PBS 溶液 (PBST) を用いて 10 分間 2 回洗浄した。その後、5% のロバ血清を含んだ PBST 溶液 (Normal donkey serum; NDS 溶液) を用いて室温で 1 時間振とうした。一次抗体を含んだ NDS 溶液を用いて、脳切片を 4°C で 24~48 時間振とうした。一次抗体として以下のものを用いた：ウサギ由来抗 Cre リコンビナーゼ抗体 (1:200; Millipore, MAB3120)、ウサギ由来抗 c-Fos 抗体 (1:1000; Millipore, ABE457)、ウサギ由来抗 PKCδ 抗体 (1:1000; Abcam, ab182126)、ウサギ由来抗 mCherry 抗体 (1:1000; Abcam, ab167453)、ヤギ由来抗 GFP 抗体 (1:1000; Abcam, ab663)。PBST 溶液を用いて室温で 10 分間 3 回洗浄した後、二次抗体を含んだ NDS 溶液を用いて脳切片を室温で 2 時間振とうした。二次抗体として以下のものを用いた：Alexa 647 標識ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体 (1:500; Life technologies, A31573)、Alexa 594 標識ロバ由来抗ウサギ IgG

抗体 (1:500; Life technologies、A21207)、Alexa 488 標識ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体 (1 : 500; Life technologies、A21206)、Alexa 488 標識ロバ由来抗ヤギ IgG 抗体 (1 : 500、Life technologies、A11055)。PBS 溶液を用いて室温で 10 分間 3 回洗浄した後、4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 含有の封入剤 (H-1500; Vector Laboratories) を用いてスライドガラス上に封入した。蛍光画像は共焦点顕微鏡 (FV-10i; Olympus) もしくは蛍光顕微鏡 (Keyence BZ-X710; Keyence) を用いて撮影した。細胞数の計測は、ImageJ の Cell plugin 機能を用いてブラインドで行った。

ホールセルパッチクランプ記録を行った細胞を確認するため、記録後、脳切片を 4% PFA 溶液内に 4°C で一晩静置した。PBS 溶液を用いて二回洗浄した後、PBST 溶液を用いて 10 分間洗浄し、NDS 溶液中に室温で 1 時間振とうした。続いて、Alexa 647 で標識された Streptavidin (0.5 µg/ml; Invitrogen, S21374) を含んだ NDS 溶液を用いて 4°C で 48 時間振とうした。PBS 溶液を用いて 10 分間 3 回洗浄した後、封入材 (H-1400, Vector Laboratories) を用いてスライドガラス上に封入した。蛍光画像は共焦点顕微鏡 (FV-10i; Olympus) を用いて撮影した。

統計解析

統計解析はすべて Prism 6 (GraphPad Software, Inc.) を用いて行った。二群間の比較には Two-tailed Student's t-test もしくは Two-tailed Mann-Whitney test を用いた。三群以上の比較には One-way ANOVA と Bonferroni's *post hoc* test、もしくは Two-way ANOVA と Bonferroni's *post hoc* test もしくは Sidak's *post hoc* test を用いた。割合の比較には Chi-square test を用いた。累積確率には Kolmogorov-Smirnov test を用いた。結果は $p < 0.05$ であるときに有意であると判断した。

第2章 分界条床核神経回路における可塑性

第1節 緒言

分界条床核は、急性痛に対する情動反応において重要な役割を果たす^{24,25}。しかし、慢性痛による情動変容への関与はいまだ明らかではない。分界条床核に外側視床下部へ神経投射を送っているとともに³⁰、分界条床核→外側視床下部の神経路を光遺伝学的手法を用いて選択的に活性化すると抗不安作用がもたらされると報告されている³³。本研究では「慢性痛により分界条床核→外側視床下部の機能が破綻することで不安情動が亢進する」との仮説を立てた。Spared Nerve Injury モデルを慢性痛モデル動物として用い、行動薬理学的手法、電気生理学的手法、および薬理遺伝学的手法によりこの仮説を検証した。

第2節 結果

1) 慢性痛モデルマウスの行動解析

慢性痛が不安情動に及ぼす影響を調べた。マウス左後肢の総腓骨神経および脛骨神経を結紮し、末梢側を切断することで慢性痛モデルを作製した (Fig. 2A)。von Frey 試験を術前日および術後1週間ごとに行い、痛みが持続しているか否かを検討した (Fig. 2B)。慢性痛モデルマウスの左後肢では4週間にわたって疼痛閾値の低下が認められた (Fig. 2C)。術後4週時点で、マウスの不安様行動を測定するためにオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、および明暗箱試験を行った。オープンフィールド試験において、慢性痛モデルマウスと対照群との間で、自発運動量や center zone 滞在時間に違いは見られなかった (Fig. 2D)。一方で、高架式十字迷路試験において慢性痛モデルマウスの open arms 滞在時間および open arms 侵入割合が有意に減少し (Fig. 2E)、明暗箱試験において慢性痛モデルマウスの light side 滞在時間が有意に減少していることが認められた (Fig. 2F)。以上の結果は、慢性痛モデルマウスにおける不安様行動の亢進を示している。

2) 外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞におけるシナプス伝達の解析

外側視床下部へ投射する分界条床核神経細胞における可塑的变化を調べるため、ホールセルパッチクランプ記録を行った。外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞を可視化するため、神経損傷を与えた後肢と反対側の外側視床下部に逆行性神経トレーサーである retrobeads を投与した (Fig. 3A)。対照群には同様の逆行性神経トレーサー投与を行った Sham 処置マウスを用いた。Retrobeads によって標識されている分界条床核の神経細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。我々は以前に、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞は、 I_h -negative な細胞が大部分を占めることを、ラットを用いた検討により報告しているが³⁵、マウスにおいても同様に、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞

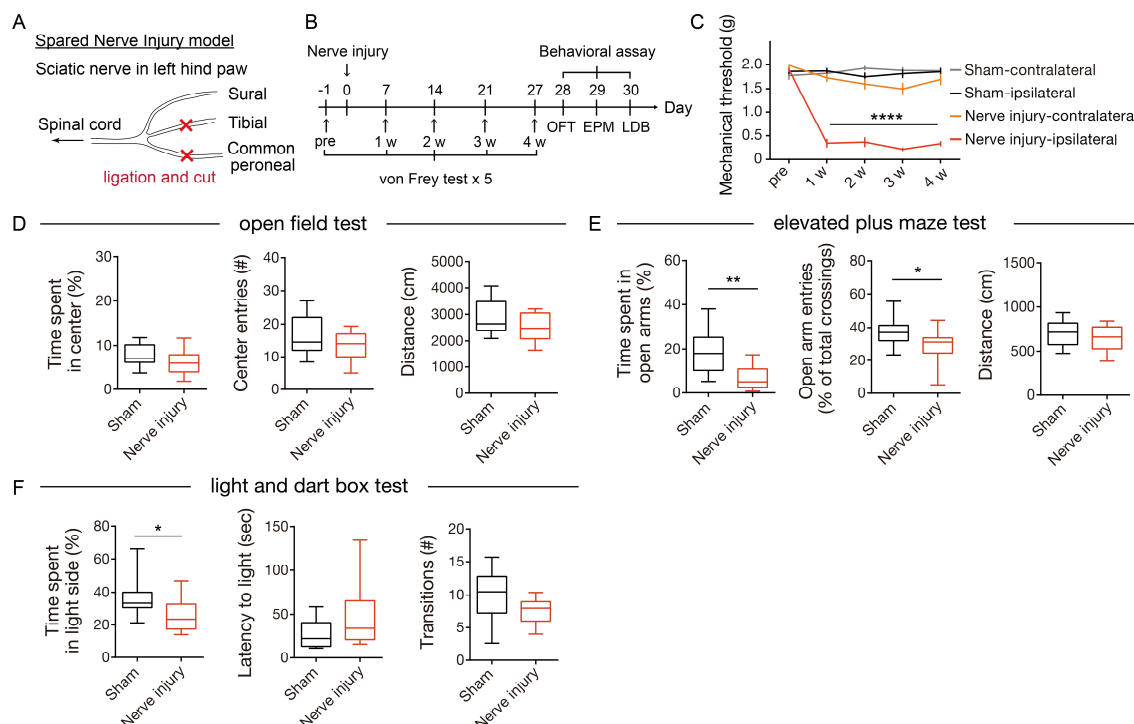


Figure 2. 慢性痛による不安様行動の亢進

(A) 実験の模式図。慢性痛モデルマウスは総腓骨神経および脛骨神経の結紮と切断により作製した。(B) 実験のタイムスケジュール。OFT: オープンフィールド試験、EPM: 高架式十字迷路試験、LDB: 明暗箱試験。(C) 4週間にわたる疼痛閾値の推移。Sham: 対照群 (n=23)、Nerve injury: 慢性痛モデルマウス群 (n=22)。(D) オープンフィールド試験における各指標の定量グラフ。Sham: n=12, Nerve injury: n=15 (E) 高架式十字迷路試験における各指標の定量グラフ。Sham: n=15, Nerve injury: n=14 (F) 明暗箱試験における各指標の定量グラフ。Sham: n=12, Nerve injury: n=12。折れ線グラフは平均値±SEM、箱ひげ図は中央値、四分位範囲、および10-90パーセンタイルを示している。統計学的有意差は、Two-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's *post hoc* test (C), two-tailed unpaired Student's *t*-test (D, E, and F)を用いて解析した。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$ 。

の多くが I_h -negative な細胞であることが確認された。 I_h -negative な細胞の割合は、対照群 (79.8%) と慢性痛モデルマウス (76.6%) の間に差は認められず (Fig. 3B and C)、慢性痛によってこれら神経細胞の I_h の有無が変化することはないと考えられる。 I_h -negative な神経細胞において、sIPSC を各群で測定したところ、慢性痛モデルマウスではその頻度と振幅が有意に大きかった (Fig. 3D-F)。また、sEPSC を測定したところ、慢性痛モデルマウスにおいてその頻度が僅かに小さかった (Fig. 3G-I)。一連の結果は、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞に対する興奮と抑制のシナプス伝達バランスが、慢性痛モデルマウスでは抑制に傾いていることを示しており、分界条床核から外側視床下部への神経回路の機能低下が示唆される。一方で、 I_h -positive な神経細胞から sIPSC を測定したところ、慢性

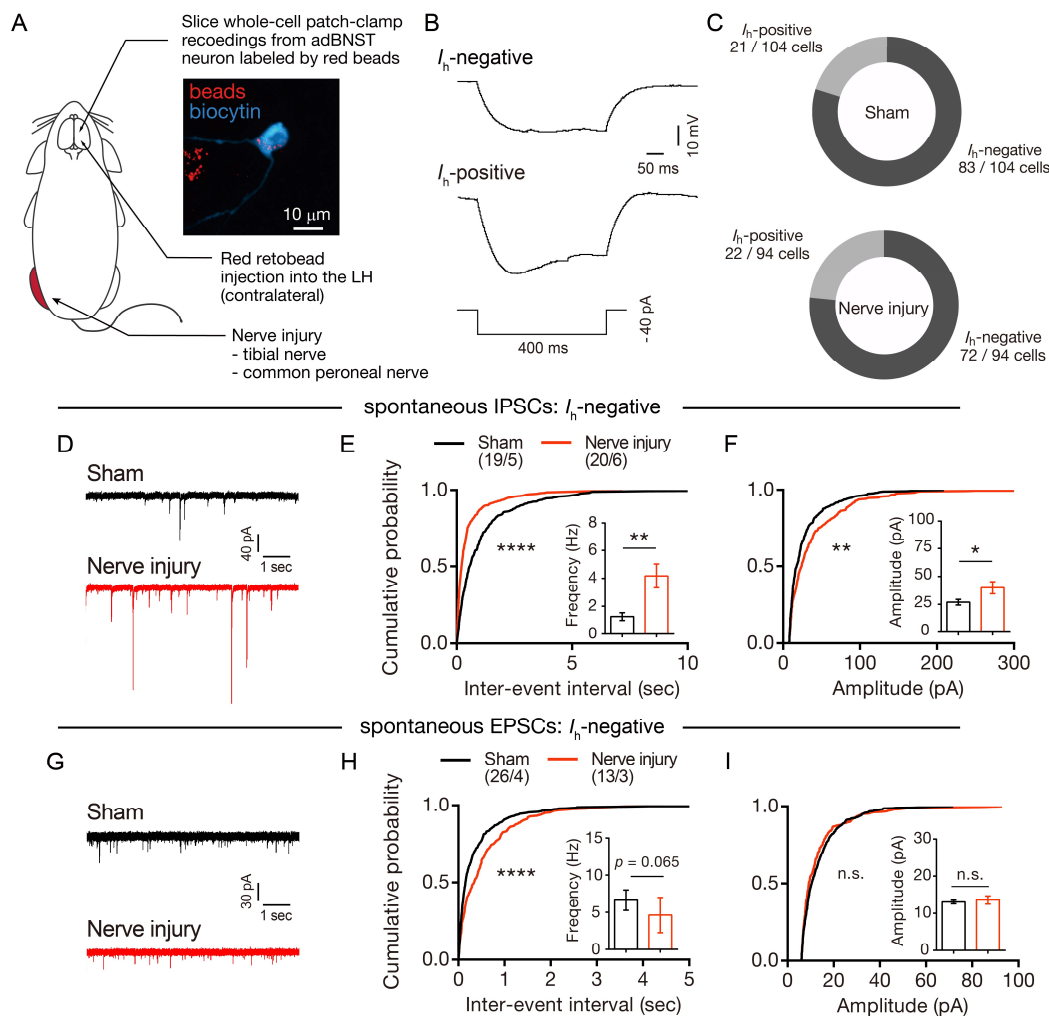


Figure 3. 外側視床下部へ投射する分界条床核神経に対するシナプス伝達の慢性痛による変化

(A) 実験の模式図。挿入図は Biocytin によって標識された分界条床核の記録神経細胞と retrobeads を示す。adBNST: 分界条床核 anterodorsal 領域、LH: 外側視床下部。Scale bar, 10 μ m。(B) 過分極性電流の注入 (-40 pA, 400 ms duration) の際の膜電位の代表トレース。上が I_h -negative な細胞であり、下が I_h -positive な細胞。(C) 外側視床下部へ投射する分界条床核神経における I_h -negative 細胞と I_h -positive 細胞の割合 ($p = 0.58$, Sham vs. Nerve injury)。(D) Sham (上) および Nerve injury (下) における sIPSC の代表トレース。(E) イベント間の間隔における累積確率分布と、頻度の平均値を示すグラフ。(F) イベントの振幅における累積確率分布と、振幅の平均値を示すグラフ。(G) Sham (上) および Nerve injury (下) における sEPSC の代表トレース。(H) イベント間の間隔における累積確率分布と、頻度の平均値を示すグラフ。(I) イベントの振幅における累積確率分布と、振幅の平均値を示すグラフ。サンプル数 (細胞/マウス) はグラフに記載した。棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。統計学的有意差は、Chi-square test (C), Kolmogorov-Smirnov test (E, F, H, and I), two-tailed unpaired Student's t -test [E, F, and I], もしくは two-tailed Mann-Whitney test (H) を用いて解析した。n.s., not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

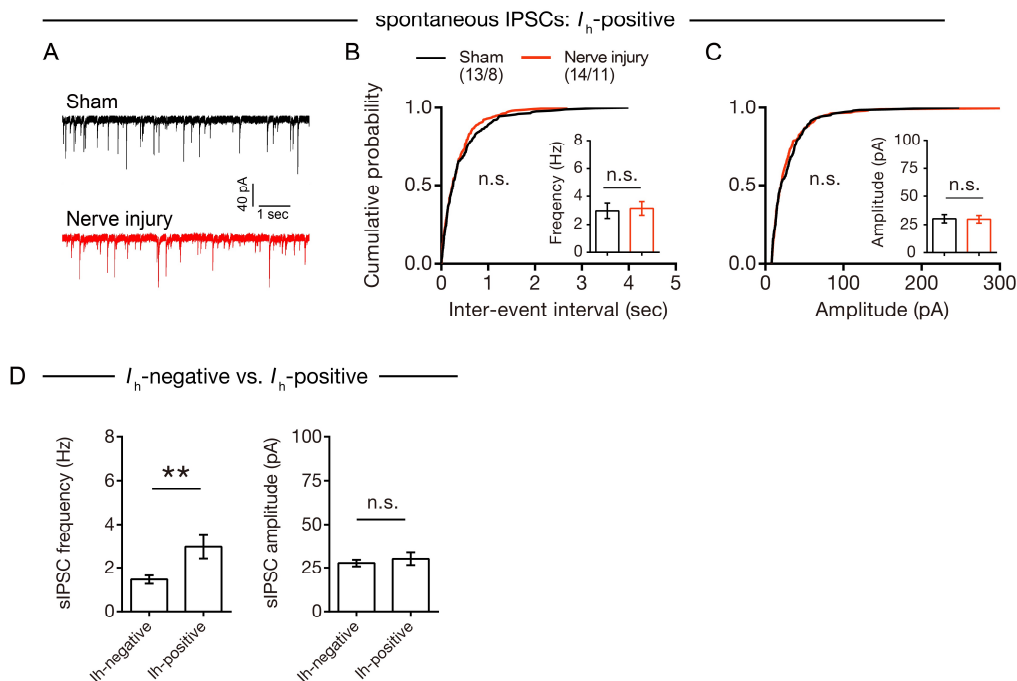


Figure 4. I_h -positive な神経細胞における変化

(A) Sham (上) および Nerve injury (下)における I_h -positive な神経細胞での sIPSC の代表トレース。(B) イベント間の間隔における累積確率分布と、頻度の平均値を示すグラフ。(C) イベントの振幅における累積確率分布と、振幅の平均値を示すグラフ。(D) I_h -negative な神経細胞 ($n = 45$) と I_h -positive な神経細胞 ($n = 13$) における抑制性シナプス伝達の比較。サンプル数 (細胞/マウス) はグラフに記載した。棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。統計学的有意差は、Kolmogorov-Smirnov test (B and C) もしくは two-tailed unpaired Student's t -test (B, C, and D) を用いて解析した。n.s., not significant, ** $p < 0.01$.

痛モデルマウスと対照群において差は見られなかった (Fig. 4A-C)。このことから、慢性痛モデルマウスにおける抑制性シナプス伝達の可塑的変化は I_h -negative な細胞に選択的であることが示唆される。さらに、Sham 群における I_h -positive な神経細胞と I_h -negative な神経細胞に対する抑制性入力頻度が有意に異なることから (Fig. 4D)、これら細胞集団は異なった神経細胞集団から入力を受けていることが考えられる。

末梢に起始した痛みは、脊髄内を交叉し、反対側の脳半球へと伝導される。興味深いことに、神経損傷は片側の後肢にのみ負荷されているのにも関わらず、同様な可塑性が両側の分界条床核で観察された (Fig. 5A-D)。

分界条床核は主に GABA 作動性の抑制性神経細胞から構成される脳領域であること¹³、および分界条床核内の神経細胞は局所神経回路を形成していることから⁴⁶、sIPSC の増加は分界条床核内の上流の抑制性神経細胞、すなわち抑制性介在神経細胞における興奮性増大

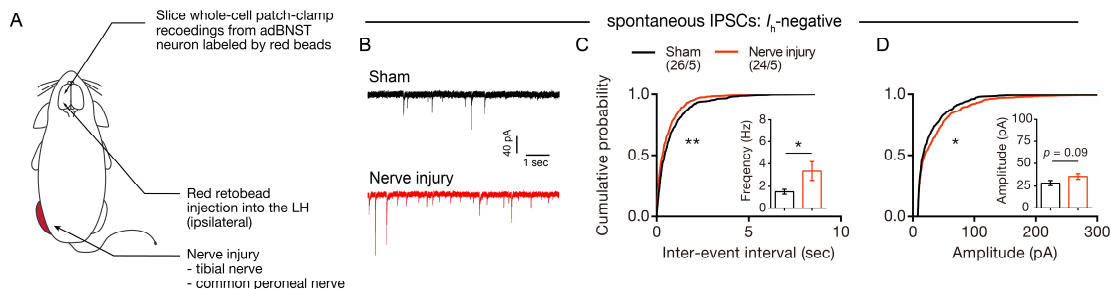


Figure 5. 神経損傷と同側の脳半球における変化

(A) 実験の模式図。(B) Sham (上) および Nerve injury (下) における sIPSC の代表トレース。(C) イベント間の間隔における累積確率分布と、頻度の平均値を示すグラフ。(D) イベントの振幅における累積確率分布と、振幅の平均値を示すグラフ。棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。サンプル数 (細胞/マウス) はグラフに記載した。統計学的有意差は、Kolmogorov-Smirnov test (C and D) もしくは two-tailed unpaired Student's *t*-test (C and D) を用いて解析した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$.

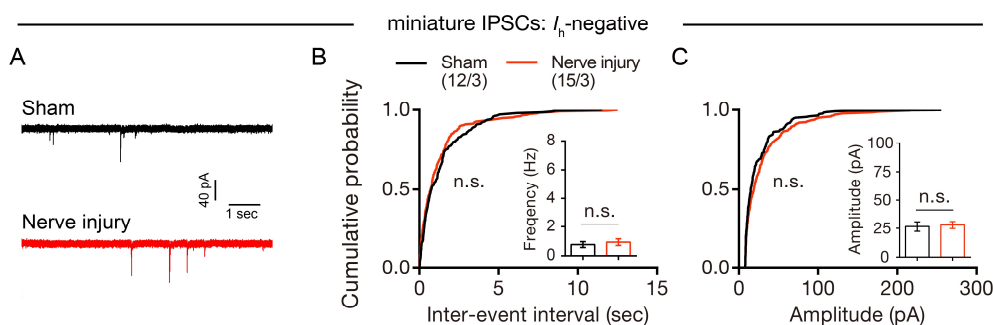


Figure 6. TTX 存在下での mIPSC の比較

(A) Sham (上) および Nerve injury (下) における mIPSC の代表トレース。(B) イベント間の間隔における累積確率分布と、頻度の平均値を示すグラフ。(C) イベントの振幅における累積確率分布と、振幅の平均値を示すグラフ。棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。サンプル数 (細胞/マウス) はグラフに記載した。統計学的有意差は、Kolmogorov-Smirnov test (B and C) もしくは two-tailed unpaired Student's *t*-test (B and C) を用いて解析した。n.s., not significant.

に起因する可能性が考えられる。この可能性を検証するため、活動電位依存的な軸索伝達を阻害するテトロドトキシン (TTX) を処置した条件下で mIPSC の測定を、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞から行った。その結果、慢性痛モデルマウスと対照群との間で、mIPSC の頻度および振幅に違いが観察されなかった (Fig. 6A-C)。このことから、慢性痛による sIPSC の増加は、分界条床核内の上流の抑制性神経細胞の興奮性増大に起因する可能性が示された。

薬理遺伝学的手法を用いた神経活動操作が不安様行動に及ぼす影響

外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制により不安様行動が亢進するか否かを検討した。逆行性に Cre リコンビナーゼを発現させる AAV2 を外側視床下部に投与するとともに、Cre 依存的に hM4Di-mCherry を発現させる AAV5 を健常マウスの分界条床核へ投与した (Fig. 7A)。同じ AAV2 を外側視床下部に投与し、Cre 依存的に mCherry のみを発現させる AAV5 を分界条床核に投与した群を対照群とした。外側視床下部に投射する分界条床核の神経細胞は、過去の報告^{30,33}と一致して anterodorsal 領域に局在しており、oval 領域にはほとんど見られなかった (Fig. 7B)。電気生理学的解析により、hM4Di のリガンドである CNO (10 μ M) 処置によって hM4Di-mCherry を発現する分界条床核の神経細胞が過分極することを確認した (Fig. 7C and D)。また、組織学的解析により、hM4Di-mCherry の発現は Cre リコンビナーゼ依存的であることを確認した (Fig. 7E and F)。外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制が、不安様行動へどのような影響を及ぼすのか調べるため、ウイルスベクター投与 5 週間後に行動解析を行った。行動試験の 40 分前に、CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内に投与した。hM4Di-mCherry を発現するマウスでは不安様行動がオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験、および明暗箱試験のいずれにおいても亢進した (Fig. 7G-H)。すなわち、分界条床核から外側視床下部への神経回路の機能低下が、不安様行動を惹起させることが示された。また、オープンフィールド試験および高架式十字迷路試験において自発運動量にも低下が見られた。これは不安レベルの高さを反映した結果であると考えられる。次に、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制が痛みの感覚的側面に影響を及ぼすか否かを検討するため、同様のマウスを用いて von Frey 試験を行った。本試験においては hM4Di-mCherry を発現するマウスと対照群において疼痛閾値に差は認められず (Fig. 7J)、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制だけでは、アロディニアを引き起こさないことが示された。

次に、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の活性化が、慢性痛による不安様行動の亢進を軽減するか検討した。逆行性に Cre リコンビナーゼを発現させる AAV2 を外側視床下部に投与するとともに、Cre 依存的に hM3Dq-mCherry を発現させる AAV5 を分界条床核に投与した (Fig. 8A and B)。同じ AAV2 を外側視床下部へ投与し、Cre 依存的に mCherry のみを発現させる AAV5 を分界条床核に投与した群を対照群とした。10 日以上回復期間の後、これらマウスに慢性痛を負荷する手術を施した (Fig. 8C)。慢性痛モデルマウスにおいて、hM3Dq のリガンドである CNO (1.0 mg/kg) を腹腔内に投与した後、冠状断脳スライスを作製、免疫染色を行ったところ、外側視床下部へ投射する分界条床核神経に c-Fos の発現が確認された (Fig. 8D-F)。これにより、本手法を用いて外側視床下部へ投射する分界条床核神経を *in vivo* で活性化できることが示された。これらマウスを用いて行動解析を行い、不安様行動を評価した。hM3Dq を発現するマウスではオープンフィールド試験、高架式十字迷路試験において自発運動量の増加が確認されたが ($F_{(1,32)} = 2.19, p = 0.0139$ for hM3Dq in OFT distance; $F_{(1,32)} = 0.35, p = 0.0005$ for hM3Dq in EPM distance, two-way ANOVA, Fig. 8G and H)、

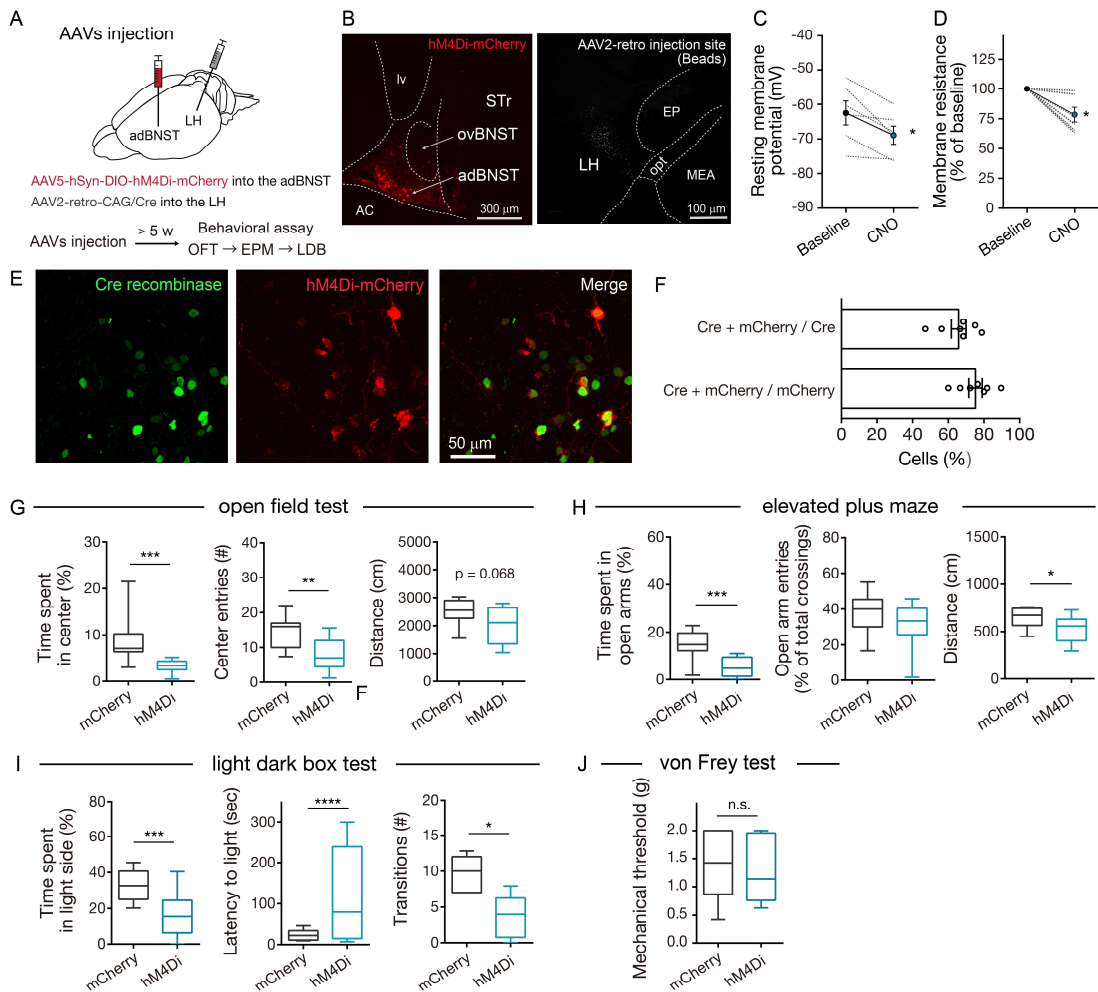


Figure 7. 外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制による不安様行動の亢進

(A) 実験の模式図とタイムスケジュール。(B) 分界条床核における hM4Di-mCherry の発現と外側視床下部における AAV2 の投与位置。Scale bars, 300 μm (左)、100 μm (右)。ovBNST: 分界条床核 oval 領域、adBNST: 分界条床核 anterodorsal 領域、STr: 線条体、AC: 前交連、MEA: 扁桃体内側部、EP: 脚内核、LH: 外側視床下部、opt: 視索。(C and D) hM4Di 発現分界条床核神経における膜電位と膜抵抗の CNO (10 μM) 処置後での変化。n = 6 cells from 4 mice.

(E) Cre リコンビナーゼの免疫染色 (緑) と hM4Di-mCherry (赤) の共焦点顕微鏡画像。Scale bar, 50 μm。(F) 陽性細胞の定量グラフ。細胞計数は hM4Di-mCherry を発現するエリアで行った。: hM4Di-mCherry+/Cre+, 75.3% ± 3.7%; Cre+/hM4Di-mCherry+, 65.8% ± 4.1%. n = 7 sections from 3 mice. (G) オープンフィールド試験における各指標の定量グラフ。mCherry: n = 10, hM4Di: n = 11. (H) 高架式十字迷路試験における各指標の定量グラフ。mCherry: n = 10, hM4Di: n = 11. (I) 明暗箱試験における各指標の定量グラフ。mCherry: n = 10, hM4Di: n = 11. (J) von Frey 試験における疼痛閾値。mCherry: n = 10, hM4Di: n = 11. 棒グラフは平均値±SEM を示している。箱ひげ図は中央値、四分位範囲、および 10-90 パーセンタイルを示している。統計学的有意差は、two-tailed paired Student's *t*-test (C and D), two-tailed unpaired Student's *t*-test (G, H, and I), および two-tailed Mann-Whitney test (J) を用いて解析した。n.s., not significant, **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, *****p* < 0.0001.

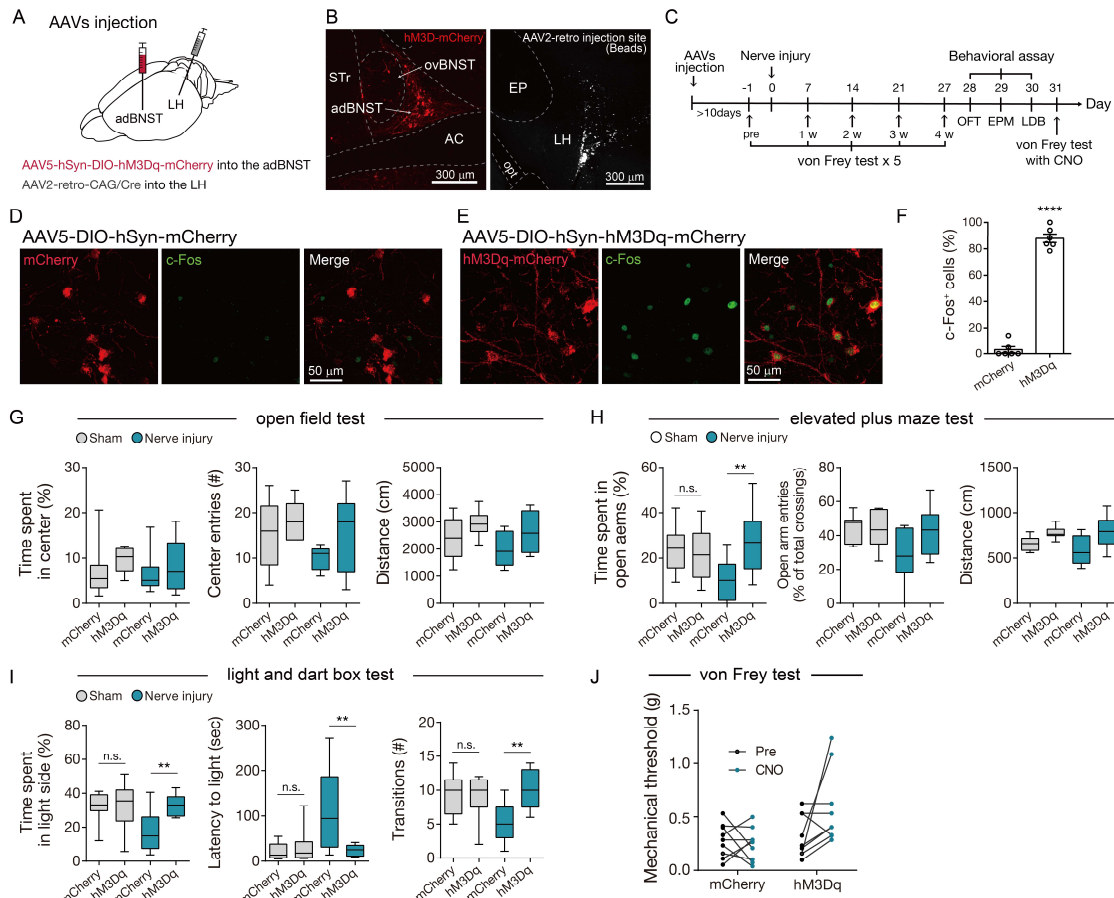


Figure 8. 外側視床下部へ投射する分界条床核神経の活性化による不安様行動の軽減

(A) 実験の模式図。(B) 分界条床核における hM3Dq-mCherry の発現と外側視床下部における AAV2 の投与位置。

Scale bars, 300 μ m. (C) 実験のタイムスケジュール。(D and E) CNO (1 mg/kg, i.p.) 後の mCherry (赤) 発現細胞もしくは hM3Dq-mCherry (赤) 発現細胞における c-Fos (緑) 発現。CNO 投与 180 分後に脳を摘出し、解析に用いた。

Scale bars, 50 μ m. (F) 陽性細胞の定量グラフ。mCherry: n = 5 sections from 2 mice, hM3Dq: n = 6 sections from 2 mice.

(G) オープンフィールド試験における各指標の定量グラフ。n = 9 mice per group. (H) 高架式十字迷路試験における各指標の定量グラフ。n = 9 mice per group. (I) 明暗箱試験における各指標の定量グラフ。n = 9 mice per group. (J) von Frey 試験における疼痛閾値。mCherry: n = 9, hM3Dq: n = 9. 棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。箱ひげ図は中央値、四分位範囲、および 10-90 パーセンタイルを示している。統計学的有意差は、two-tailed unpaired Student's *t*-test (F), two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (G, H, and I), および two-way repeated ANOVA (J)を用いて解析した。n.s., not significant, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Sham マウスにおいては center zone 滞在時間および open arms 滞在時間に変化がなかった (Fig. 8G and H)。一方で、慢性痛によって減少していた open arms 滞在時間および light side 滞在時間が (Nerve injury-mCherry 群)、外側視床下部へ投射する分界条床核神経を活性化させた群 (Nerve injury-hM3Dq 群) では増加した (Fig. 8H and I)。次に、痛みの感覚的側面を

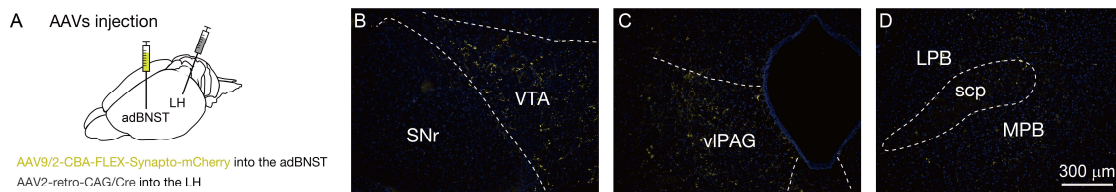


Figure 9. 外側視床下部へ投射する分界条床核神経の他領域への投射

(A) 実験の模式図。(B-D) 外側視床下部へ投射する分界条床核神経に由来する synaptophysin-mCherry の蛍光写真。

SNr: 中脳黒質網様部、VTA: 腹側被蓋野、vIPAG: 中脳水道周囲灰白質腹外側部、LPB: 外側腕傍核、MPB: 内側腕傍核、scp: 上脊髄小脳脚。Scale bar; 300 μm.

評価するためこれら慢性痛モデルマウスを用いて von Frey 試験を行った。hM3Dq を発現する慢性痛モデルマウスにおいて、CNO (1.0 mg/kg) の腹腔内投与後に疼痛閾値の回復傾向が観察された (Fig. 8J)。このアロディニア抑制作用は、外側視床下部へ投射する分界条床核神経が有する側鎖性の神経投射に起因している可能性が考えられる。すなわち、当該神経細胞は外側視床下部へ投射するのみではなく、痛みの感覚的側面を制御する脳領域へ同時に神経投射を送っている可能性がある。これを検証するため、シナプス小胞の膜に発現する糖たんぱく質である Synaptophysin を蛍光たんぱく質で標識したものを、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞に選択的に発現させた (Fig. 9A)。脳内における蛍光標識 synaptophysin の局在を組織学的に解析したところ、中脳水道周囲灰白質、腹側被蓋野、および腕傍核において局在が確認された (Fig. 9B-D)。中脳水道周囲灰白質は、内因性の疼痛抑制機構において重要な脳領域である^{47,48}。腹側被蓋野は、ドパミン作動性神経を豊富に含む脳領域であり、それら神経細胞の活動は脳内報酬系に対して重要であるとともに、その機能低下はアロディニアの発症に寄与する⁴⁹。腕傍核は侵害受容情報を脊髄後角から直接入力される脳領域である²。よって、外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞は、これら領域への神経投射を介して痛みの感覚的側面への調節にも寄与している可能性が示された。以上より、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の活性化は、慢性痛により惹起された不安を軽減するとともに、痛みの感覚を制御する脳領域への投射を介してアロディニア抑制作用を発揮する可能性が示された。

第3節 考察

本章では以下のことを明らかにした。慢性痛モデルマウスは、高架式十字迷路試験および明暗箱試験において不安様行動の亢進を示した。これはげっ歯類において慢性痛が情動変容を惹起することを示した多くの先行研究や、臨床において慢性痛が精神疾患のリスクファクターになることと一致する。また、これら慢性痛モデルマウスにおいて、外側視床下部

へ投射する分界条床核の神経細胞に対する抑制性入力が増加することを明らかにした。そこで、薬理遺伝学的手法を用いて外側視床下部へ投射する分界条床核神経の活動を操作することで、抑制性入力増加と不安惹起との因果関係を調べた。その結果、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制は不安様行動を亢進させること、さらにその活性化は慢性痛による不安様行動亢進を抑制することが明らかになった。すなわち、分界条床核→外側視床下部神経路の機能低下は、慢性痛による不安惹起に重要な役割を果たしていることが考えられる。これは、光遺伝学的手法を用いた分界条床核→外側視床下部の選択的活性化が抗不安作用を示すという報告とも一致する³³。すなわち、分界条床核→外側視床下部は動物の正常な不安レベルを維持するのに機能しており、慢性痛時には当該神経路の機能が破綻することで異常な不安レベルがもたらされるものと考えられる。

分界条床核では GABA 作動性の局所神経回路が形成されていることを考えると⁴⁶、外側視床下部へ投射する分界条床核神経細胞に対する抑制性シナプス伝達の増加は、分界条床核に内在する抑制性介在神経の活動上昇によることが考えられる。この考えは、活動電位の軸索伝導を阻害する TTX を処置した条件下で計測した mIPSC では、その頻度に慢性痛モデルマウスと対照群との間で差が見られなかったという結果からも支持される。類似した研究として、Pati (2019) らは、分界条床核内の抑制性介在神経細胞の興奮性増大が、分界条床核から外側視床下部あるいは腹側被蓋野に投射する出力細胞への抑制性伝達を増加させることをアルコール依存マウスにおいて報告している⁵⁰。他にも、分界条床核内の神経細胞の活動が不安惹起に関連することが報告されている。例えば、薬理遺伝学的手法を用いた分界条床核 GABA 神経の直接的な活性化は不安様行動を亢進させる⁵¹。以上を考え合わせると、慢性痛による不安惹起には、分界条床核内の神経細胞の活動、特に、抑制性介在神経の活動が上昇することで、分界条床核内の出力神経への抑制が増加するという機構が推測される。

痛みを片側性に与えているのにも関わらず、慢性痛による可塑的变化は両側性に観察された。片側性の慢性痛による両側性の脳内可塑的变化は、前脳皮質においても報告されている。例えば、坐骨神経を片側性に傷害したマウスを用いた研究では、内側前頭前野から中脳水道周囲灰白質に投射する錐体細胞における内的興奮性が両側性に増大することが報告されている⁵²。侵害受容情報は脊髄内で交叉し、侵害刺激が加わった部位とは反対側の脳半球へと伝導されることを考えると、片側性の慢性痛がどのようにして両側性の可塑的变化を誘導しているのかという疑問が生じる。その機構として以下の3つの可能性が考えられる。1つ目は、脳半球間の連絡を介して生じている可能性である⁵³。例えば、脳梁を介した脳半球間の相互抑制性伝達は感覚情報のプロセッシングを担っており^{54,55}、末梢から反対側の脳半球に上行した侵害受容情報が、脳半球間の連絡を介して脳両側へと拡散されることが考えられる。これが両側性の可塑的变化の起因となり得る。2つ目は、同側性の侵害受容情報伝達経路を介して生じている可能性である。脊髄後角第I層の細胞は、同側の脳半球における外側腕傍核へ少なからず直接的な神経投射を送っている⁵⁶。このような同側性の伝達経路を介

した情報伝達により反対側の脳半球に加えて、同側の脳半球にも可塑的变化が生じる可能性がある。3つ目は、液性因子が関与する可能性である。慢性痛はサイトカインやケモカインなどの液性因子を、グリア細胞を介して増加させる^{57,58}。これら免疫システムは脳神経との相互作用を有し^{59,60}、神経細胞へ影響を及ぼす⁶¹。これによって左右の脳半球に関係なく可塑的变化を生じさせる可能性がある。今後、慢性痛が両側性の可塑的变化を誘導する機構に着目し研究することは、さらなる神経機構の解明につながるものと期待できる。

外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞が電気生理学的に不均一な細胞集団、すなわち、 I_h -positive な細胞と I_h -negative な細胞で構成されていることは着目すべき点である。慢性痛による可塑的变化は I_h -negative な細胞でのみ観察され、 I_h -positive な細胞では変化が認められなかった。また、対照群において、これら細胞集団に対する抑制性シナプス伝達の頻度が異なることから、これら神経に対する入力元は異なることが示唆される。すなわち、これら細胞は自信の電気生理学的性質だけでなく、神経回路形成の点においても異なる性質であることが示唆される。近年、分界条床核内の異なる神経ペプチドを発現する神経細胞集団、すなわち、コルチコトロピン放出因子を発現する神経細胞集団とコレシストキニンを発現する神経細胞集団が、外側視床下部の異なる神経細胞集団に各々シナプス接続を形成するとともに、情動行動を相反的に制御することが報告された⁶²。 I_h -positive な細胞と I_h -negative な細胞も同様に外側視床下部に対して異なるシナプス接続を形成し、不安様行動を制御している可能性が考えられる。しかし、 I_h -negative な神経細胞選択的に遺伝子を発現させるためのマーカー遺伝子がないため、外側視床下部へ投射する I_h -negative な分界条床核神経のみの活動操作は本研究において実現できなかった。ただし、外側視床下部へ投射する分界条床核神経のうち、 I_h -positive な神経細胞が占める割合は小さい。したがって、全体の活動操作を行った際の影響は I_h -negative な神経細胞の活動操作の影響を強く反映しているものであると考えられる。

痛みの感覚的側面に関して、外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制は、アロディニアを誘導するのに十分ではなかった。一方で、当該神経の活性化は統計学的な有意差はなかったもののアロディニアを抑制する傾向を示した。この結果は、分界条床核が痛みの感覚的側面の制御にも関与しているという新たな知見を提供する。外側視床下部へ投射する分界条床核神経は、中脳水道周囲灰白質および腹側被蓋野にも神経投射を送ることが本研究より明らかとなった。中脳水道周囲灰白質は、内因性の疼痛抑制機構に重要な脳領域である^{47,48}。分界条床核の GABA 作動性神経は、中脳水道周囲灰白質において GABA 作動性介在神経を抑制することでグルタミン酸作動性神経の脱抑制を誘導し、内因性疼痛抑制機構を活性化する可能性がある⁶³。また、腹側被蓋野ドパミン作動性神経の活動が慢性痛により抑制され、この抑制がアロディニアの発症に関与するとされている⁴⁹。分界条床核 GABA 作動性神経は、腹側被蓋野 GABA 作動性神経にシナプスを形成するため¹³、当該経路を介した腹側被蓋野ドパミン神経の脱抑制がアロディニアを軽減させた可能性も考えられる。アロディニア抑制作用が軽微であったのは、これら神経路の一部、すなわち、中脳水道周囲灰

白質や腹側被蓋野に投射する神経細胞のうち、外側視床下部にも投射するもののみの活性化であったためであると考えられる。今後、分界条床核から中脳水道周囲灰白質や腹側被蓋野に投射する神経細胞を選択的に活性化することにより、それらの神経路が痛みの感覚的側面にどのような影響を及ぼすかを検討する必要がある。

第3章 神経細胞種選択的な機能解析

第1節 諸言

前章では、慢性痛モデルマウスを用いて、外側視床下部へ投射する分界条床核神経における抑制性伝達の増加を明らかにした。しかし、抑制性入力がどのような神経回路を介して増加するのか不明であった。分界条床核は主として GABA 作動性神経から構成される領域であるとともに¹³、局所神経回路の存在が示されている⁴⁶。また、分界条床核の活動は不安と相関することが知られている^{21,22,51,64}。そこで、「分界条床核内の抑制性介在神経の興奮性が増大することで、出力を担う神経細胞への抑制性入力が増加する」との仮説を考えた。この仮説の検証には、分界条床核内の抑制性介在神経を特定し、その電気生理学的特性や神経活動操作が不安情動に与える影響を調べる必要がある。またそのためには、分界条床核内の抑制性介在神経に特異的に発現するマーカー遺伝子が必要となる。神経ペプチド cocaine amphetamine regulated transcript (CART) は、代謝関連ペプチドであり⁶⁵、不安情動との関連も報告されている⁶⁶。分界条床核内には、その亜核である oval 領域に CART 陽性神経細胞が局在する (Allen brain atlas: <http://www.brain-map.org>)。当該領域の神経細胞は分界条床核内に抑制性シナプスを形成することが報告されている³²⁻³⁴。これらの知見から、CART の前駆体である Cartpt をコードする遺伝子が、分界条床核内の抑制性介在神経の同定と操作のためのマーカー遺伝子になると考えた。本章では、Cartpt プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現するトランスジェニックマウス (Cart-Cre マウス) を用いて、CART 陽性の分界条床核神経細胞に着目した解析を行った。

第2節 結果

1) 分界条床核内における抑制性神経回路の形成

CART 陽性神経細胞の局在を調べるため、Cre 依存的に mCherry を発現させる AAV5 を、Cart-cre マウスの分界条床核へ投与した (Fig. 10A)。それらマウスから冠状断脳切片を作製し、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、CART 陽性神経細胞は、oval 領域に密に局在することが観察された (Fig. 10B and C)。Protein kinase C δ (PKC δ)を発現する oval 領域における分界条床核の神経細胞は、分界条床核内に軸索を伸ばしていることが報告されている³⁴。免疫組織染色により CART 陽性神経細胞は PKC δ 陽性神経細胞集団の一部であることが明らかになった (Fig. 10D and E)。さらに、蛍光標識された CART 陽性神経細胞の軸索が、分界条床核内に確認された (Fig. 10C)。以上より、CART 陽性神経細胞は分界条床核内にシナプス接続を形成していることが示唆される。機能的なシナプス接続を調べるため、AAV 投与により Cre 依存的に CART 陽性神経細胞に ChR2 を発現させるとともに逆行性神経トレー

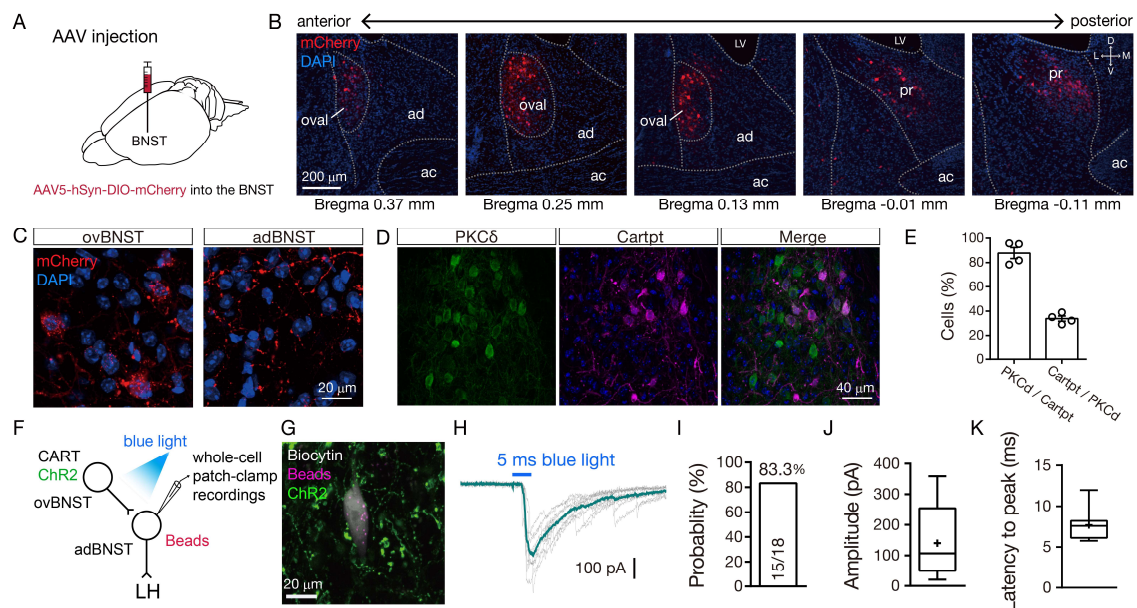


Figure 10. 分界条床核における CART 陽性神経細胞の局在とシナプス形成

(A) 実験の模式図。(B) 分界条床核における CART 陽性神経細胞の蛍光写真。ac: 前交連, ad: anterodorsal 領域, oval: oval 領域, pr: principle 領域。Scale bar, 200 μ m. (C) Oval 領域および anterodorsal 領域における強拡大画像。Scale bar, 20 μ m. (D) 免疫染色による PKC δ の標識と、mCherry の発現による CART 陽性神経細胞の標識、およびその共局在を示す写真。CART 陽性神経細胞の標識は AAV 投与により行った。(E) 陽性細胞の定量グラフ。n = 4 mice. (F) 実験の模式図。(G) 記録細胞を biocytin により染色した。(H) 光応答性の抑制性シナプス後電流の記録例。(I) 記録した細胞における光応答性の抑制性シナプス後電流が見られた確率。(J and K) 光応答性の抑制性シナプス後電流の振幅とピークまでの潜時。n = 15 cells from 2 mice. 棒グラフは平均値 $\pm$ SEM を示している。箱ひげ図は中央値、四分位範囲、および 10-90 パーセンタイルを示している。

サー投与により外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞を可視化した (Fig. 10F and G)。ChR2 は青色光が照射されると発現している神経を脱分極させる。外側視床下部へ投射する分界条床核神経からホールセルパッチクランプ記録により膜電流を測るとともに、青色光の照射により CART 陽性神経細胞を活性化したところ、記録した神経細胞中の 83.3% の細胞 (18 細胞中 15 細胞) で青色光応答性の抑制性シナプス後電流が確認された (Fig. 10H and I)。その振幅と潜時を Fig. 10J and K に示す。これにより、CART 陽性神経細胞が外側視床下部へ投射する分界条床核の神経細胞に抑制性シナプスを形成していることが示された。CART 陽性神経細胞が分界条床核内の抑制性介在神経細胞として機能していることが示唆される。

2) 慢性痛による CART 陽性神経細胞の電気生理学的性質の変化

慢性痛により、CART 陽性神経細胞の性質が変化しているか調べるため、慢性痛モデルマウスの CART 陽性神経細胞よりホールセルパッチクランプ記録を行った (Fig. 11A)。CART 陽性神経細胞の標識には、Cre 依存的に蛍光タンパク質を発現する AAV5 を分界条床核に投与した。対照群と慢性痛モデルマウスの静止膜電位に差はなかった (Fig. 11B)。しかし、活動電位の閾値および基電流において、慢性痛モデルマウスには有意な減少が確認された (Fig. 11C)。また、基電流の減少に一致して膜抵抗の増加が観察された (Fig. 11D)。さらに、活動電位の振幅においても増加が確認された (Fig. 11E)。これらの結果は、慢性痛下では CART 陽性神経細胞において活動電位が発生しやすくなっていること示しており、慢性痛により CART 陽性神経細胞の興奮性が増大していることを示唆している。

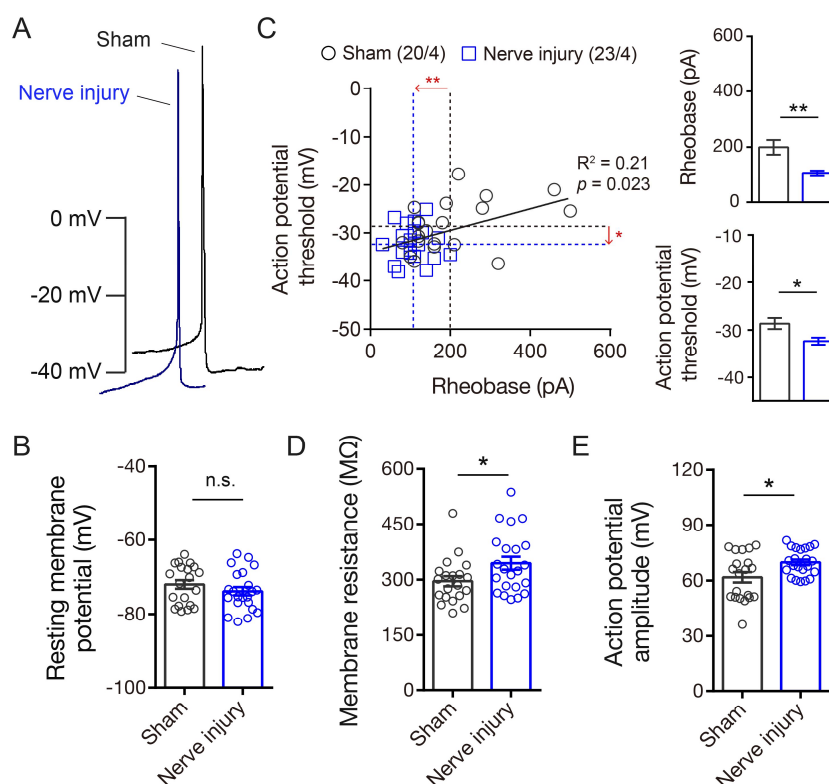


Figure 11. 慢性痛による CART 陽性神経細胞の興奮性変化

(A) Sham (黒) および Nerve injury (青) の CART 陽性神経細胞における活動電位の代表例 (B) 静止膜電位。 (C) 活動電位の閾値と基電流。 (D) 膜抵抗。 (E) 活動電位の振幅。サンプル数 (細胞/マウス) はグラフに記載した。棒グラフは平均値±SEM を示している。統計学的有意差は、two-tailed unpaired Student's *t*-test を用いて解析した。n.s., not significant, **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

3) CART 陽性神経細胞の興奮性増大による影響

CART 陽性神経細胞の興奮性増大が、下流である外側視床下部へ投射する分界条床核神経における抑制性伝達へ及ぼす影響を調べた。これを検討するため、AAV 投与により以下の3つの実験グループを作製した。1) CART 陽性の分界条床核神経細胞に hM4Di-mCitrine を発現する Sham 処置マウス、2) CART 陽性の分界条床核神経細胞に EYFP のみを発現する慢性痛モデルマウス、3) CART 陽性の分界条床核神経細胞に hM4Di-mCitrine を発現する慢性痛モデルマウスである。これらマウスの外側視床下部に逆行性神経トレーサーを投与することで、外側視床下部に投射する分界条床核の神経細胞を可視化した。可視化した神経細胞のうち I_h -negative な細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、sIPSC を測定した (Fig. 12A)。前述のように、CNO (10 μ M) を処置する前では、Sham 群に比較して慢性痛モデルマウス群においては sIPSC の頻度が大きかった (Fig. 12B)。CNO 処置により、hM4Di を発現する Sham 群および EYFP のみを発現する慢性痛モデルマウス群では、sIPSC の頻度に変化がなかったのに対して、hM4Di を発現する慢性痛モデルマウス群で sIPSC の頻度が有意に低下した (Fig. 12C)。また、CNO 処置前後での sIPSC 頻度の変化量を比較すると、hM4Di を発現する慢性痛モデルマウス群は他群に比べて大きく減少していた (Fig. 12D)。以上より、慢性痛によって CART 陽性神経細胞の興奮性が増大した結果、外側視床下部へ投射する分界条床核神経への抑制性シナプス伝達が増加していると考えられる。次に、慢性痛による CART 陽性神経細胞の興奮性増大が動物の不安惹起に関与しているか調べるため、CART 陽性神経細胞を抑制した際の高架式十字迷路試験における不安様行動を測定した。Cre 依存的に hM4Di を発現させる AAV を分界条床核に投与したマウスに慢性痛を負荷し、4 週間経過した後、CNO (1.0 mg/kg) の腹腔内投与により CART 陽性神経細胞を抑制した。対照群である mCherry のみを発現する慢性痛モデルマウスに比べ、CART 陽性神経細胞を hM4Di により抑制した群では open arms 滞在時間が有意に増加した (Fig. 12E)。

第3節 考察

分界条床核において CART 陽性神経細胞は oval 領域に局在していた。Oval 領域の神経細胞は、分界条床核内に抑制性シナプスを形成することが報告されていたが³²⁻³⁴、光遺伝学的解析を用いた本研究においても CART 陽性神経細胞は分界条床核の出力神経細胞に対して抑制性シナプスを形成していることが明らかになった。すなわち、CART 陽性神経細胞は分界条床核内の抑制性介在神経として機能していると考えられる。さらに、CART 陽性神経細胞は、慢性痛により興奮性が増大することが明らかになった。この興奮性増大は、外側視床下部へ投射する分界条床核神経に対する抑制性入力が増加に寄与するとともに、不安様行動の亢進に関与していることが明らかになった。以上の結果は、「分界条床核内の抑制性介在神経の興奮性が増大することで、分界条床核からの出力を担う神経細胞への抑制性入力が増加する」との仮説を支持する。

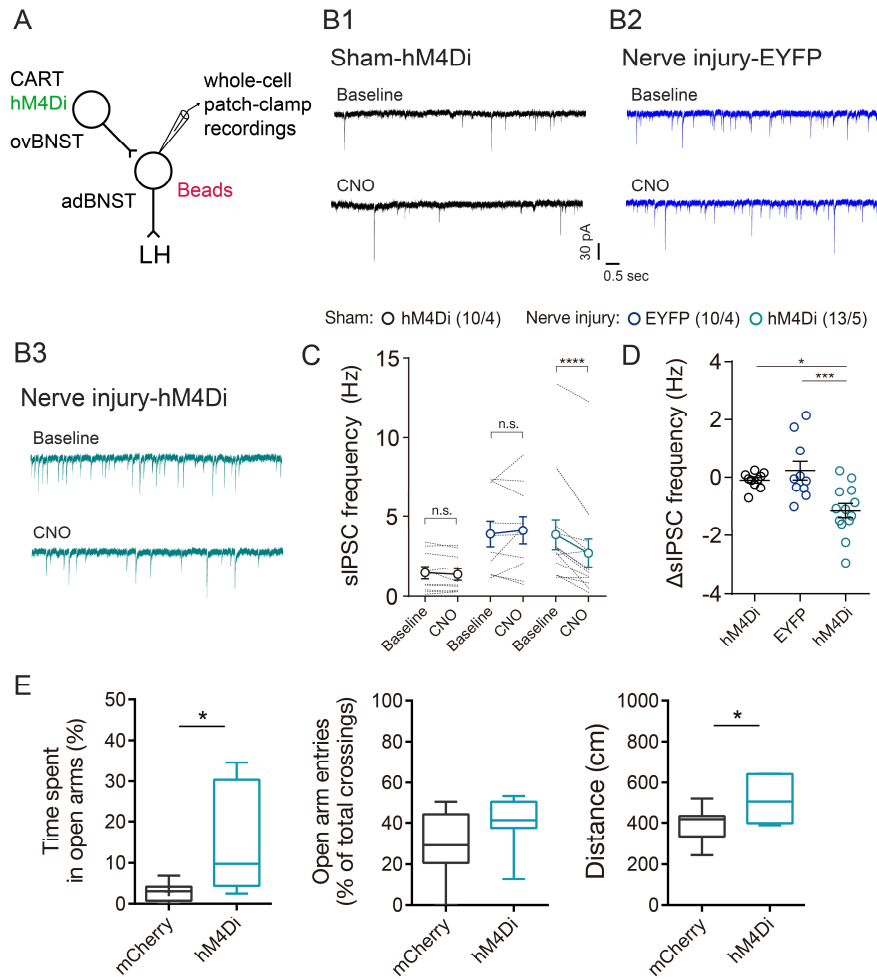


Figure12. CART 陽性神経細胞の興奮性増大が及ぼす影響の電気生理学的・行動薬理学的解析

(A) 実験の模式図。(B) sIPSC の記録代表例。(C) CNO 処置前後における sIPSC 頻度。(D) NO 処置前後における sIPSC 頻度の変化量。サンプル数（細胞/マウス）はグラフに記載した。(E) CART 陽性神経細胞を hM4Di で抑制した際の高架式十字迷路試験における各指標の定量グラフ。mCherry: $n = 8$, hM4Di: $n = 7$. 箱ひげ図は中央値、四分位範囲、および 10-90 パーセンタイルを示している。統計学的有意差は、two-way repeated ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (C), one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test (D), および two-tailed unpaired Student's *t*-test (E) を用いて解析した。n.s., not significant, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

電気生理学的解析により、慢性痛時に CART 陽性神経細胞の発火閾値および基電流が低下していることを明らかにした。この結果は、慢性痛による CART 陽性神経細胞の興奮性増大を意味する。このような変化は、活動電位の発生に関与するイオンチャネルなどの機能変化に由来すると考えられる。実際に、慢性痛がイオンチャネルの変化をもたらすことが多くの報告より知られている。例えば、L5/L6 神経の結紮による慢性痛モデル動物では、末梢神経における電位依存性ナトリウムチャネルサブユニット $Na_{v1.8}$ の発現や、その電流量が変化する⁶⁷⁻⁶⁹。また、L4/L5 神経の結紮により $Na_{v1.3}$ の脊髄後根神経節（DRG）における発現

が急速に上昇する⁷⁰。Nav1.8の発現増加による神経細胞の興奮性上昇や、Nav1.3の発現増加による異所性放電の促進は、神経障害性疼痛の発生および維持に関与すると考えられている^{69,71,72}。とくにNav1.3は、Nav1.1, Nav1.2, Nav1.6と併せて脳に発現するサブタイプであるとともに⁷³、慢性痛モデルマウスのDRG神経細胞においては、その活動電位の閾値低下に寄与している⁷⁴。本研究で用いた慢性痛モデル動物においても同様に、Nav1.3のような電位依存性ナトリウムチャネルの発現量増加がCART陽性神経細胞で生じている可能性がある。これとは別に、リン酸化もイオンチャネルのコンダクタンスを変化させる要因であり、これら機構が相乗してCART陽性神経細胞の興奮性を変化させている可能性がある。例えば、痛覚過敏を誘導するプロスタグランジン、アデノシン、セロトニンは、TTX抵抗性の電位依存性ナトリウムチャネルのリン酸化を介して神経細胞の発火閾値を低下させる^{75,76}。以上のことから、慢性痛による情動変容についても、上位中枢におけるイオンチャネルの機能変化が原因となっている可能性が考えられる。今後、慢性痛によって分界条床核内のCART陽性神経細胞においてどのようなチャネルの発現あるいは機能変化が生じているのか、またどのような機構を介してそのような変化が生じているのかを明らかにし、慢性痛による情動変容の責任分子を同定することが重要である。

CART陽性神経細胞は、慢性痛下では興奮性増大により活動電位を発生しやすい状態にあることが明らかになった。これによりCART陽性神経細胞はより多くの活動電位を発生させ、下流への情報伝達が行われると考えられる。実際に、Sham処置マウスのCART陽性神経細胞を抑制した際、下流である外側視床下部へ投射する分界条床核神経への抑制性伝達に変化を示さなかった一方で、慢性痛モデルマウスのCART陽性神経細胞を抑制した際には抑制性伝達の有意な減少が見られた。この減少分は、慢性痛によるCART陽性神経細胞の興奮性増大による活動電位発生が増大に由来することが考えられる。これらの結果から、健常な状態では分界条床核におけるCART陽性神経細胞は静止状態にある一方で、慢性痛状態に移行することでその活動が活発化し、下流への抑制性情報伝達を持続的に増加させることが考えられる。また、慢性痛モデルマウスのCART陽性神経細胞を抑制すると、高架式十字迷路試験における不安様行動亢進が消失したことから、慢性痛によるCART陽性神経細胞の興奮性増大は不安惹起に関与していることが示唆される。これは前章で述べたように、下流である外側視床下部へ投射する分界条床核神経の抑制を介したものであると考えられる。

第4章 結語

本研究は、慢性痛による情動変容において、分界条床核における可塑的变化が重要な役割を有することを明らかにした。その機構は以下のとおりである。1) 慢性痛により分界条床核内の CART 陽性神経細胞の興奮性が増大する。2) これにより外側視床下部に投射する分界条床核神経への抑制性シナプス伝達が増加する 3) 分界条床核→外側視床下部の神経路出力が低下し、下流への情報伝達機能が障害されることで不安が惹起される。すなわち本研究は、慢性痛による分界条床核内の特定の神経細胞における可塑的变化を発端として、神経回路機能に破綻が生じ、情動変容が誘導されるということを明らかにしたものである。

侵害情報を上位中枢へと伝導する上行路については古くから研究がなされていたが、それは感覚情報としての痛みに主眼が置かれてきた。痛みの情動的側面、すなわち痛みによる不快情動生成の神経機構は、その生体における警告系としての重要性にもかかわらずいまだ不明な点が多い。また、慢性痛および慢性痛による精神疾患は現代社会において非常に深刻な影響をもたらしているのにもかかわらず、その神経機構にも未解明な点が多い。本研究は、痛みの情動処理機構を担う分界条床核における可塑的变化が不安情動惹起に関わることを明らかにし、その神経機構を細胞および神経回路レベルで明らかにした。これにより、慢性痛による情動変容は、少なくとも一部は、分界条床核内の特定の神経細胞における可塑的变化を原因として生じるということが明らかになった。不安障害患者の分界条床核に異常な活動が見られるという報告を合わせて考えると⁷⁾、分界条床核は生体警告系としての痛みの不快情動生成における役割を担う一方で、慢性痛などの理由によりその正常な機能が破綻した際には、精神疾患を引き起こしている可能性がある。今後、本研究で明らかとなった分界条床核内における可塑的变化の神経機構を分子レベルで解明することにより、慢性痛や精神疾患に対する有望な治療標的の創出につながることを期待する。

参考文献

1. Kuner, R. Central mechanisms of pathological pain. *Nat. Med.* **16**, 1258–1266 (2010).
2. Gauriau, C. & Bernard, J. Physiological Society Symposium Nociceptors as Homeostatic Afferents : Central Processing Pain pathways and parabrachial circuits in the rat. *Exp. Physiol.* **87**, 251–258 (2010).
3. Han, S., Soleiman, M., Soden, M., Zweifel, L. & Palmiter, R. D. Elucidating an Affective Pain Circuit that Creates a Threat Memory. *Cell* **162**, 363–374 (2015).
4. Matthew J. Bair, Rebecca L. Robinson, Wayne Katon, K. K. Depression and Pain Comorbidity: a literature review. *Arch Intern Med* **163**, 2433–45. (2003).
5. McWilliams, L. A., Cox, B. J. & Enns, M. W. Mood and anxiety disorders associated with chronic pain: An examination in a nationally representative sample. *Pain* **106**, 127–133 (2003).
6. Barthas, F. *et al.* The anterior cingulate cortex is a critical hub for pain-induced depression. *Biol. Psychiatry* **77**, 236–245 (2015).
7. Koga, K. *et al.* Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. *Neuron* **85**, 377–389 (2015).
8. Matsuzawa-Yanagida, K. *et al.* Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology* **33**, 1952–1965 (2008).
9. Narita, M. *et al.* Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical δ -opioid receptor dysfunction. *J. Neurochem.* **97**, 1369–1378 (2006).
10. Sellmeijer, J. *et al.* Hyperactivity of anterior cingulate cortex areas 24a/24b drives chronic pain-induced anxiodepressive-like consequences. *J. Neurosci.* **38**, 3102–3115 (2018).
11. Yalcin, I. *et al.* A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol. Psychiatry* **70**, 946–953 (2011).
12. Alheid, G. F. & Heimer, L. New perspectives in basal forebrain organization of special relevance for neuropsychiatric disorders: The striatopallidal, amygdaloid, and corticopetal components of substantia innominata. *Neuroscience* **27**, 1–39 (1988).
13. Kudo, T. *et al.* Three Types of Neurochemical Projection from the Bed Nucleus of the Stria Terminalis to the Ventral Tegmental Area in Adult Mice. *J. Neurosci.* **32**, 18035–18046 (2012).
14. Bienkowski, M. S. & Rinaman, L. Common and distinct neural inputs to the medial central nucleus of the amygdala and anterior ventrolateral bed nucleus of stria terminalis in rats. *Brain Struct. Funct.* **218**, 187–208 (2013).
15. Dong, H. W., Petrovich, G. D. & Swanson, L. W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. *Brain Res. Rev.* **38**, 192–246 (2001).

16. Sun, N., Roberts, L. & Cassell, M. D. Rat central amygdaloid nucleus projections to the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res. Bull.* **27**, 651–662 (1991).
17. Gray, T. S. & Magnuson, D. J. Peptide immunoreactive neurons in the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis project to the midbrain central gray in the rat. *Peptides* **13**, 451–460 (1992).
18. Walker, D. L., Miles, L. A. & Davis, M. Selective participation of the bed nucleus of the stria terminalis and CRF in sustained anxiety-like versus phasic fear-like responses. *Prog. Neuro-Psychopharmacology Biol. Psychiatry* **33**, 1291–1308 (2009).
19. Lee, Y. & Davis, M. Role of the hippocampus, the bed nucleus of the stria terminalis, and the amygdala in the excitatory effect of corticotropin-releasing hormone on the acoustic startle reflex. *J. Neurosci.* **17**, 6434–46 (1997).
20. Waddell, J., Morris, R. W. & Bouton, M. E. Effects of bed nucleus of the stria terminalis lesions on conditioned anxiety: aversive conditioning with long-duration conditional stimuli and reinstatement of extinguished fear. *Behav. Neurosci.* **120**, 324–336 (2006).
21. Day, H. E. W., Masini, C. V. & Campeau, S. The pattern of brain c-fos mRNA induced by a component of fox odor, 2,5-dihydro-2,4,5-Trimethylthiazoline (TMT), in rats, suggests both systemic and processive stress characteristics. *Brain Res.* **1025**, 139–151 (2004).
22. Singewald, N., Salchner, P. & Sharp, T. Induction of c-Fos expression in specific areas of the fear circuitry in rat forebrain by anxiogenic drugs. *Biol. Psychiatry* **53**, 275–283 (2003).
23. Braz, J. M., Nassar, M. A., Wood, J. N. & Basbaum, A. I. Parallel ‘pain’ pathways arise from subpopulations of primary afferent nociceptor. *Neuron* **47**, 787–793 (2005).
24. Deyama, S., Nakagawa, T., Kaneko, S., Uehara, T. & Minami, M. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of visceral and somatic pain in rats. *Behav. Brain Res.* **176**, 367–371 (2007).
25. Maruyama, C. *et al.* Suppressive effects of morphine injected into the ventral bed nucleus of the stria terminalis on the affective, but not sensory, component of pain in rats. *Eur. J. Neurosci.* **47**, 40–47 (2018).
26. Hammack, S. E., Mania, I. & Rainnie, D. G. Differential expression of intrinsic membrane currents in defined cell types of the anterolateral bed nucleus of the stria terminalis. *J. Neurophysiol.* **98**, 638–56 (2007).
27. Hazra, R. *et al.* A transcriptomic analysis of type I-III neurons in the bed nucleus of the stria terminalis. *Mol. Cell. Neurosci.* **46**, 699–709 (2011).
28. Rodriguez-Romaguera, J. *et al.* Prepronociceptin expressing neurons in the extended amygdala encode and promote rapid arousal responses to motivationally salient stimuli. *CellReports* **33**, 108362 (2020).
29. Welch, J. D. *et al.* Single-Cell Multi-omic Integration Compares and Contrasts Features of Brain

- Cell Identity. *Cell* **177**, 1873–1887.e17 (2019).
30. Dong, H. & Swanson, L. W. Organization of Axonal Projections from the Anterolateral Area of the Bed Nuclei of the Stria Terminalis. **298**, 277–298 (2004).
 31. Gungor, N. Z. & Paré, D. Functional Heterogeneity in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *J. Neurosci.* **36**, 8038–49 (2016).
 32. Dong, H. W., Petrovich, G. D., Watts, A. G. & Swanson, L. W. Basic organization of projections from the oval and fusiform nuclei of the bed nuclei of the stria terminalis in adult rat brain. *J. Comp. Neurol.* **436**, 430–455 (2001).
 33. Kim, S. Y. *et al.* Diverging neural pathways assemble a behavioural state from separable features in anxiety. *Nature* **496**, 219–223 (2013).
 34. Ye, J. & Veinante, P. Cell-type specific parallel circuits in the bed nucleus of the stria terminalis and the central nucleus of the amygdala of the mouse. *Brain Struct. Funct.* **224**, 1067–1095 (2019).
 35. Yamauchi, N. *et al.* Activation of the neural pathway from the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis to the central amygdala induces anxiety-like behaviors. *Eur. J. Neurosci.* 1–10 (2018) doi:10.1111/ejn.14165.
 36. Davis, M., Walker, D. L., Miles, L. & Grillon, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: Role of the extended amygdala in fear vs anxiety. *Neuropsychopharmacology* **35**, 105–135 (2010).
 37. Boyden, E. S., Zhang, F., Bamberg, E., Nagel, G. & Deisseroth, K. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity. *Nat. Neurosci.* **8**, 1263–1268 (2005).
 38. Armbruster, B. N., Li, X., Pausch, M. H., Herlitze, S. & Roth, B. L. Evolving the lock to fit the key to create a family of G protein-coupled receptors potently activated by an inert ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**, 5163–5168 (2007).
 39. Urban, D. J. & Roth, B. L. DREADDs (designer receptors exclusively activated by designer drugs): Chemogenetic tools with therapeutic utility. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* vol. 55 399–417 (2015).
 40. Jennings, J. H. *et al.* Distinct extended amygdala circuits for divergent motivational states. *Nature* **496**, 224–228 (2013).
 41. Uematsu, A. *et al.* Modular organization of the brainstem noradrenaline system coordinates opposing learning states. *Nat. Neurosci.* **20**, 1602–1611 (2017).
 42. Decosterd, I. & Woolf, C. J. Spared nerve injury: An animal model of persistent peripheral neuropathic pain. *Pain* **87**, 149–158 (2000).
 43. Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M. & Yaksh, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods* **53**, 55–63 (1994).
 44. Alexander, G. M. *et al.* Remote control of neuronal activity in transgenic mice expressing

- evolved G protein-coupled receptors. *Neuron* **63**, 27–39 (2009).
45. Ide, S. *et al.* Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. *J Neurosci* **33**, 5881–5894 (2013).
 46. Marcinkiewicz, C. A. *et al.* Serotonin engages an anxiety and fear-promoting circuit in the extended amygdala. *Nature* **537**, 97–101 (2016).
 47. Behbehani, M. M. Functional characteristics of the midbrain periaqueductal gray. *Prog. Neurobiol.* **46**, 575–605 (1995).
 48. Starowicz, K. *et al.* Tonic Endovanilloid Facilitation of Glutamate Release in Brainstem Descending Antinociceptive Pathways. *J. Neurosci.* (2007) doi:10.1523/JNEUROSCI.3258-07.2007.
 49. Watanabe, M. *et al.* Activation of ventral tegmental area dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve injury or bone cancer. *Mol. Pain* **14**, 2–4 (2018).
 50. Pati, D. *et al.* Chronic intermittent ethanol exposure dysregulates a GABAergic microcircuit in the bed nucleus of the stria terminalis. *Neuropharmacology* 107759 (2019) doi:10.1016/j.neuropharm.2019.107759.
 51. Mazzone, C. M. *et al.* Acute engagement of Gq-mediated signaling in the bed nucleus of the stria terminalis induces anxiety-like behavior. *Mol. Psychiatry* **23**, 143–153 (2018).
 52. Cheriyan, J. & Sheets, P. L. Altered Excitability and Local Connectivity of mPFC-PAG Neurons in a Mouse Model of Neuropathic Pain. *J. Neurosci.* **38**, 4829–4839 (2018).
 53. Bloom, J. S. & Hynd, G. W. The role of the corpus callosum in interhemispheric transfer of information: Excitation or inhibition? *Neuropsychol. Rev.* **15**, 59–71 (2005).
 54. Palmer, L. M. *et al.* The Cellular Basis of GABAB-Mediated Interhemispheric Inhibition. *Science* (80-.). **39**, 989–993 (2012).
 55. Seyal, M., Ro, T. & Rafal, R. Increased sensitivity to ipsilateral cutaneous stimuli following transcranial magnetic stimulation of the parietal lobe. *Ann. Neurol.* **38**, 264–267 (1995).
 56. Spike, R. C., Puskár, Z., Andrew, D. & Todd, A. J. A quantitative and morphological study of projection neurons in lamina I of the rat lumbar spinal cord. *Eur. J. Neurosci.* **18**, 2433–2448 (2003).
 57. DeLeo, J. A., Tanga, F. Y. & Tawfik, V. L. Neuroimmune Activation and Neuroinflammation in Chronic Pain and Opioid Tolerance/Hyperalgesia. *Neuroscientist* **10**, 40–52 (2004).
 58. Gao, Y. J. & Ji, R. R. Targeting Astrocyte Signaling for Chronic Pain. *Neurotherapeutics* **7**, 482–493 (2010).
 59. Arima, Y. *et al.* Regional neural activation defines a gateway for autoreactive T cells to cross the blood-brain barrier. *Cell* **148**, 447–457 (2012).
 60. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels.

- Nature* **523**, 337–341 (2015).
61. Filiano, A. J. *et al.* Unexpected role of interferon- γ 3 in regulating neuronal connectivity and social behaviour. *Nature* **535**, 425–429 (2016).
 62. Giardino, W. J. *et al.* Parallel circuits from the bed nuclei of stria terminalis to the lateral hypothalamus drive opposing emotional states. *Nat. Neurosci.* **21**, 1084–1095 (2018).
 63. Samineni, V. K. *et al.* Divergent modulation of nociception by glutamatergic and GABAergic neuronal subpopulations in the periaqueductal gray. *eNeuro* **4**, (2017).
 64. Duvarci, S., Bauer, E. P. & Paré, D. The bed nucleus of the stria terminalis mediates inter-individual variations in anxiety and fear. *J. Neurosci.* **29**, 10357–10361 (2009).
 65. Lau, J. & Herzog, H. CART in the regulation of appetite and energy homeostasis. *Front. Neurosci.* **8**, (2014).
 66. Stanek, L. M. Cocaine- and amphetamine related transcript (CART) and anxiety. *Peptides* **27**, 2005–2011 (2006).
 67. Decosterd, I., Ji, R. R., Abdi, S., Tate, S. & Woolf, C. J. The pattern of expression of the voltage-gated sodium channels Nav1.8 and Nav1.9 does not change in uninjured primary sensory neurons in experimental neuropathic pain models. *Pain* **96**, 269–277 (2002).
 68. Gold, M. S. *et al.* Redistribution of Nav1.8 in uninjured axons enables neuropathic pain. *J. Neurosci.* **23**, 158–166 (2003).
 69. Lai, J. *et al.* Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin-resistant sodium channel, NaV1.8. *Pain* **95**, 143–152 (2002).
 70. Kim, C. H., Oh, Y., Chung, J. M. & Chung, K. The changes in expression of three subtypes of TTX sensitive sodium channels in sensory neurons after spinal nerve ligation. *Mol. Brain Res.* **95**, 153–161 (2001).
 71. Devor, M., Wall, P. D. & Catalan, N. Systemic lidocaine silences ectopic neuroma and DRG discharge without blocking nerve conduction. *Pain* **48**, 261–268 (1992).
 72. Liu, C. N. *et al.* Tactile allodynia in the absence of C-fiber activation: Altered firing properties of DRG neurons following spinal nerve injury. *Pain* **85**, 503–521 (2000).
 73. Meisler, M.H., and Kearney, J. A. Sodium channel mutations in epilepsy and other neurological disorders. *J. Clin. Invest.* **115**, 2010–2017 (2005).
 74. Xie, M. X. *et al.* Bulleyaconitine A attenuates hyperexcitability of dorsal root ganglion neurons induced by spared nerve injury: The role of preferably blocking Nav1.7 and Nav1.3 channels. *Mol. Pain* **14**, (2018).
 75. England, S., Bevan, S. & Docherty, R. J. PGE2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurones via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol.* **495**, 429–440 (1996).
 76. Gold, M. S., Reichling, D. B., Shuster, M. J. & Levine, J. D. Hyperalgesic agents increase a

- tetrodotoxin-resistant Na⁺ current in nociceptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 1108–1112 (1996).
77. Yassa, M. A., Hazlett, R. L., Stark, C. E. L. & Hoehn-Saric, R. Functional MRI of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis during conditions of uncertainty in generalized anxiety disorder. *J. Psychiatr. Res.* **46**, 1045–1052 (2012).

謝辞

本研究を遂行するにあたってご指導、ご鞭撻いただいた南雅文教授、天野大樹講師、野村洋講師、人羅菜津子助教に心より感謝いたします。南雅文教授には、時に厳しく、温かに、研究を一から教えていただきました。不出来な自分を見限ることなく、ここまで育てて頂いたこと、感謝の念に堪えません。天野大樹講師には、研究の面白さや奥深さを熱心に説いていただき、研究の世界に飛び込むきっかけをいただきました。野村洋講師には、研究に関する多くのご助言を頂くとともに、研究の進め方を学ばせていただきました。人羅菜津子助教には、親身に相談に乗っていただき、幾度も助けていただきました。先生方のおかげで研究者としての一歩を踏み出すことができました。重ねて感謝申し上げます。

研究を行う中で苦楽を共にし、日々励ましやご協力を賜りました薬理学研究室の先輩、同級生、後輩の皆様に深く感謝いたします。つらく苦しいこともありましたが、皆様と過ごした研究生生活は間違いなく充実したものであり、かけがえのない思い出となりました。

最後に、これまでの自分を支えてくれた友人、そして家族に最大限の感謝をいたします。多くの人に支えられることで、これまで進んでくることが出来たのだと思っています。その温かな支援に心からの感謝の意を表し、本論の結びとさせていただきます。