

論文内容の要旨

博士論文題目

Application of *in vivo* CMOS imaging device with microdialysis and optogenetics for studying serotonergic neurons in pain modulation

(疼痛調節におけるセロトニン神経系解明に向けたマイクロダイアリシス・オプトジェネティクス併用 *in vivo* CMOS イメージングデバイス)

氏名 LATIFULAKBAR

(論文内容の要旨)

セロトニンは疼痛処理と密接に関連する神経伝達物質であり、疼痛調節の際には多様な神経投射とセロトニン作動性経路が関与している。背側縫線核 (DRN) は、脳内のセロトニン作動性ニューロンの主要な供給源として重要な役割を果たしており、中枢扁桃体 (CeA) や前帯状皮質 (ACC) など、痛みの調節に広く関与していることが知られており、様々な領域を制御している。これらの異なる領域を自由行動下の動物で同時に直接観察することは疼痛機構解明にとって極めて重要である。本研究では、セロトニン作動性ニューロンを研究するための信頼性の高い方法論確立を目指して、イメージングマイクロダイアリシスプラットフォーム (IMS)、デュアルイメージングシステム (DIS)、オプトイメージングシステム (OIS) の3つのシステムを開発した。

IMS では、イメージングデバイスは DRN に、マイクロダイアリシスプローブは ACC と CeA に埋植した。セロトニン放出はマイクロダイアリシスで測定した。G-CaMP6 遺伝子改変マウスを用い、後肢にホルマリンを注射し急性疼痛を誘発した。その結果、ホルマリン注射後に DRN の蛍光強度が増加し、その増加は CeA と ACC の両方におけるセロトニン放出の上昇と高い相関があった。蛍光強度の増加は急性期と炎症期に生じたことから、痛みの二相性反応が示唆され、更に蛍光強度の増加は舐める行動と正の相関があった。

DIS では DRN と ACC に2つのセンサを同時に埋植した。ここではセロトニン作動性ニューロンを特異的に検出するために SERTCre マウスを用いた。GCaMP6 発現細胞を DRN で撮像し、セロトニンの動態を調べるために GRAB-5HT を用いて ACC で撮像した。ホルマリン誘発性疼痛では DRN と ACC で蛍光強度が増加した。このことは、痛みの調節にセロトニン作動性ニューロンが関与していることを示唆している。

最後に、セロトニン作動性経路の神経活動を同時に操作・記録するための OIS を開発した。光クロストークを避けるため、RGECO センサとチャネルロドプシン2 (ChR2) を発現させた。イメージングデバイスのフィルターは、RGECO イメージングに対応するように改良した。光刺激システムを確認するために、青色 LED を用いて DRN の ChR2 を刺激し、ACC と CeA におけるセロトニン放出をマイクロダイアリシスを用いて測定した。OIS では、DRN の ChR2 を光刺激することで DRN-ACC の疼痛回路の観察を行い、それに続く ACC の反応を RGECO センサを用いて画像化した。本論文の研究は、DRN、CeA、ACC の領域間セロトニン作動性接続を明らかにしただけでなく、CMOS 植え込み型デバイスが、マイクロダイアリシスおよびオプトジェネティクス・システムと組み合わせることでマルチサイトの埋植が可能であり、脳内の異なる領域を同時にマルチモーダル観察できることを実証した。

本研究において得られた成果や知見は、埋植小型 CMOS イメージングデバイスの新

たな可能性を広げ、疼痛機構の解明に加え、その他の神経疾患の機構解明や診断への応用など関連分野、医療用途への展開が可能である。

(論文審査結果の要旨)

セロトニンは疼痛処理と密接に関連する神経伝達物質であり、疼痛調節の際には多様な神経投射とセロトニン作動性経路が関与している。背側縫線核 (DRN) は、脳内のセロトニン作動性ニューロンの主要な供給源として重要な役割を果たしており、中枢扁桃体 (CeA) や前帯状皮質 (ACC) など、痛みの調節に広く関与していることが知られており、様々な領域を制御している。これらの異なる領域を自由行動下の動物で同時に直接観察することは疼痛機構解明にとって極めて重要である。本研究では、セロトニン作動性ニューロンを研究するためのデバイスの確立を目指して、イメージングマイクロダイアリスシステム (IMS)、デュアルイメージングシステム (DIS)、オプトイメージングシステム (OIS) の3つのシステムを開発した。

IMS では、イメージングデバイスは DRN に、マイクロダイアリスプローブは ACC と CeA に埋植した。セロトニン放出はマイクロダイアリスで測定した。G-CaMP6 遺伝子改変マウスを用い、後肢にホルマリンを注射し急性疼痛を誘発した。その結果、ホルマリン注射後に DRN の蛍光強度が増加し、その増加は CeA と ACC の両方におけるセロトニン放出の上昇と高い相関があった。蛍光強度の増加は急性期と炎症期に生じたことから、痛みの二相性反応が示唆され、更に蛍光強度の増加は舐める行動と正の相関があった。

DIS では DRN と ACC の各々にセンサを同時に埋植した。ここではセロトニン作動性ニューロンを特異的に検出するために SERTCre マウスを用いた。DRN では GCaMP6 発現細胞を撮像し、ACC ではセロトニンの動態を調べるために GRAB-5HT を用いて撮像した。ホルマリン誘発性疼痛では DRN と ACC で蛍光強度が増加し、痛みの調節にセロトニン作動性ニューロンが関与していることを確認した。

最後に、セロトニン作動性経路の神経活動を同時に操作・記録するための OIS を開発した。光クロストークを避けるため、RGECO とチャネルロドプシン 2 (ChR2) を発現させた。イメージングデバイスのフィルターは、RGECO イメージングに対応するように改良した。光刺激を確認するために、青色 LED を用いて DRN の ChR2 を光刺激し、ACC と CeA におけるセロトニン放出をマイクロダイアリスで計測した。OIS では、DRN の ChR2 を光刺激することで DRN-ACC の疼痛回路の観察を行い、それに続く ACC の反応を RGECO 用イメージングデバイスを用いて計測した。

本論文の研究は、複数領域間セロトニン作動性接続を明らかにしただけでなく、CMOS 埋植型デバイスがマイクロダイアリスおよびオプトジェネティクス・システムと組み合わせることで脳内の異なる領域を同時に観察できることを実証した。本研究において得られた成果や知見は、疼痛疾患に加え、脳神経系疾患の診断など関連分野、医療用途への展開が可能である。その成果は、学術的に新しい知見を見出していると判断され、審査委員一同は、本論文が博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認めた。