

ショウジョウバエモデルによる下行性侵害受容制御機構の研究（21-47）

主任研究者 本庄 賢 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長室・
研究員

研究要旨

健康長寿社会を実現していく上で、加齢に伴い深刻化することが知られる痛みの問題解決は喫緊の課題である。これまでに脳から脊髄へのトップダウン入力により痛覚シグナルを調節する下行性侵害受容制御系の機能が慢性疼痛患者や高齢者における痛みの慢性化に関わる可能性が指摘されてきており、疼痛疾患の原因究明と治療法開発に向けて注目されている。しかし、これまで痛覚研究に主に用いられてきたげっ歯類などの哺乳類モデルにおいて、下行性侵害受容制御系の動作原理の解明は十分なスピードで進んでいるとは言い難い。主任研究者はこれまでの研究で、無脊椎遺伝学モデル生物であるショウジョウバエが下行性侵害受容制御系の有効な研究モデルとなる可能性を見出してきた。そこで本研究ではショウジョウバエの下行性侵害受容制御系の機能解明を目指してショウジョウバエの優れた遺伝学を活用した解析を進めた。

主任研究者

本庄 賢 国立長寿医療研究センター 認知症先進医療開発センター長室・研究員

A. 研究目的

痛みは直接我々の心身の健康に影響を与えるだけでなくフレイル、認知症、そしてうつ病のリスク因子としても知られる。また、高齢者で慢性疼痛疾患の罹患率が上昇することは良く知られており、その適切なコントロールは健康寿命延伸を目指す上で極めて重要な課題と言える。先行研究で、脳から脊髄へのトップダウン入力により痛覚シグナルを調節する下行性侵害受容制御系の加齢に伴う機能低下が、高齢者における痛みの慢性化に寄与している可能性が指摘されてきた。下行性侵害受容制御系の機能異常は慢性疼痛疾患患者においても数多く報告されており、このシステムは疼痛の慢性化メカニズムの理解、そして慢性疼痛に対する有効な治療方策の開発に向けて重要な研究標的と目される。しかし、

ヒトおよび哺乳類の巨大かつ複雑な中枢神経系において、下行性侵害受容制御系の動作原理の解明は十分に進んでいない。主任研究者は無脊椎動物であるショウジョウバエに下行性侵害受容制御系の存在を見出してきた。そこで本研究ではショウジョウバエをモデルとした下行性侵害受容制御系の動作原理解明を目的とした。

B. 研究方法

1：ショウジョウバエ幼虫の CCK 作動性下行性侵害受容制御機構に関する論文発表

これまでの研究でショウジョウバエ幼虫において進化的に保存された CCK 作動性の下行性ニューロンが下行性侵害受容制御に機能する可能性が高いことを見出してきた。そこで、この CCK 作動性ニューロンの侵害受容制御機能をはっきりと示すための実験を実施し、その論文報告を行った。

2：下行性侵害受容制御系ニューロンの新規探索

ヒトやげっ歯類の下行性侵害受容制御は、CCK 以外にも様々なシグナル伝達系と神経経路が相互作用しながら機能する極めて複雑なシステムであることが判明してきていることから、ショウジョウバエの遺伝学ツールを活用した新規スクリーニングのアプローチによりショウジョウバエの下行性制御系構成ニューロンの探索を実施した。

3：下行性侵害受容制御系の機能変化を生じる感覚刺激経路の探索

ヒトや哺乳類においては、下行性侵害受容制御機構は様々な感覚刺激やストレスなどの生体内情報の入力を受けて痛覚シグナルを調節することが示唆されてきている。そこで、神経遺伝学的手法を用いてショウジョウバエの下行性侵害受容制御系機能に変化を及ぼす因子の探索を実施した。

(倫理面への配慮)

本研究は遺伝子組換え実験を含むため、すべて国立長寿医療研究センターの遺伝子組換え実験安全委員会での承認（承認番号：遺 3-1-R2）の下、国の法令および所内規定を遵守した上で実施した。

C. 研究結果

1：ショウジョウバエ幼虫の CCK 作動性下行性侵害受容制御機構に関する論文発表

本年度は、CCK 作動性ニューロンがショウジョウバエ幼虫において下行性侵害受容制御系として機能することを直接的に示すデータを新たに取得し、これを追加して論文投稿を行い最終的に eLife 誌への掲載が決定した。

本論文への eLife 誌からの公開アセスメントの結果は、

“This is a very interesting and **important** study that **convincingly** demonstrates a descending pathway for the control of nociception in non-mammalian organisms.”

と非常に高いものであった (<https://elifesciences.org/reviewed-preprints/85760#tab-content>)。また、査読者からの公開コメントにおいても、

“This is an exceptional study that provides conclusive evidence for the existence of a descending pathway from the brain that inhibits nociceptive behavioral outputs in larvae of *Drosophila melanogaster*.”

など非常に高い評価を受けることができた (<https://elifesciences.org/reviewed-preprints/85760/reviews#tab-content>)。

2：下行性侵害受容制御系ニューロンの新規探索

ヒトやげっ歯類の下行性侵害受容制御は、CCK 以外にも様々なシグナル伝達系と神経経路が相互作用しながら機能する極めて複雑なシステムであることが判明してきている (Chen and Heinricher, 2019; Ossipov et al., 2014)。そこで、本計画 2 では計画 1 で見出してきた CCK シグナル系以外にもショウジョウバエに下行性侵害受容制御系が存在する可能性を探索した。

これまでに行ってきたショウジョウバエの侵害受容制御に関わる神経ペプチドのスクリーニングから見出した候補遺伝子について新たな解析したところ、新しい方法からは既存の仮説に反するデータが得られてきたことから、この候補遺伝子に注目するこれまでの探索戦略は再考を余儀なくされることとなった。そこで、ショウジョウバエ幼虫の下行性制御系構成ニューロンを探索していく新しい手法として、近年ショウジョウバエで作成・公開された系統ライブラリを用いる新しい戦略から研究を進めたところ、幼虫の新規下行性侵害受容制御ニューロンの候補を複数発見することができた。

3：下行性侵害受容制御系の機能変化を生じる感覚刺激経路の探索

ヒトや哺乳類においては、下行性侵害受容制御機構は様々な感覚刺激やストレスなどの生体内情報の入力を受けて痛覚シグナルを調節する、感覚情報統合システムとして機能していることが示唆されてきている。しかし、そうした下行性侵害受容制御機構の動作原理がショウジョウバエでも共通している可能性は高いものの、実際にそれを示す研究証拠は全く得られていない。

これまでに組織染色手法を用いて下行性侵害受容制御の動作に関わる因子の探索を進めてきたが、非常に効率が悪くまたはっきりとした結果を得ることが難しかった。そこで本年度は、下行性侵害受容ニューロンの活動に影響を与える感覚刺激経路をよりシステムチックに広く探索できる新しい研究戦略として①シングルセル RNA-seq を用いる手法と②神経活動可視化ツールを用いる手法を考案・開発し研究を進めることとした。

①のシングルセル RNA-seq を用いた探索については、研究所の FACS Aria II を用いて

ショウジョウバエ幼虫の脳から GFP でマークしたニューロンと考えられる単一細胞を分取するプロトコルを作成した。②の神経活動可視化ツールを用いる手法については、405nmUV 光を用い in vivo にての神経活動可視化が可能な CaMPARI2 を用いる実験系を確立することができた。またこれを用いて CCK 作動下行性侵害受容抑制ニューロンの神経活動状態の観察を試み、このニューロンが何の刺激も与えられない平常時においても高い神経活動状態を維持している可能性を示唆するデータを得た。

D. 考察と結論

1：ショウジョウバエ幼虫の CCK 作動性下行性侵害受容制御機構に関する論文発表

本年度の研究で得たデータにより、ショウジョウバエに哺乳類との間で保存された下行性侵害受容制御機構が存在するという十分な説得力を持って明らかにし、非哺乳動物における下行性侵害受容制御系の存在を示す世界初の報告として発表することができたと考えている。

2：下行性侵害受容制御系ニューロンの新規探索

これまでの研究計画から想定していた結果が得られず計画変更を余儀なくされたが、新たに着想した探索のアイデアから実際にショウジョウバエ幼虫で下行性侵害受容制御に関わると考えられる新規のニューロンを複数見出すことができた。これらのデータはショウジョウバエ幼虫の下行性制御系が哺乳類同様に促進系と抑制系からなるある程度複雑なシステムである可能性も示唆しており、今後このさらなる解析を進めることで、ショウジョウバエの下行性侵害受容制御系について、哺乳類との類似点と相違点を詳しく明らかにしその共通動作原理を探っていけるものと考えている

3：下行性侵害受容制御系の機能変化を生じる感覚刺激経路の探索

下行性侵害受容制御の活動制御因子の探索では予定した実験計画で顕著な変化が認められなかったが、この失敗に触発される形で着想したより優れた探索解析手法について検討し、ほぼ確立に至ることができた。今後はこの新手法を用いて計画通り下行性侵害受容制御系の神経活動変化を引き起こす感覚刺激やストレス刺激の探索を進めていく予定である。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Yoshida A., Hamajima, M., Tanimoto, T., Furukubo-Tokunaga, K., Honjo, K. (2023) A descending inhibitory mechanism of nociception mediated by an evolutionarily conserved neuropeptide system in

Drosophila. eLife <https://doi.org/10.7554/eLife.85760>

2. 学会発表

1) Honjo, K., Oikawa, I., Kondo, S., Hashimoto, K., Kashiwabara, A., Tanimoto, H., Furukubo-Tokunaga, K. A descending inhibitory mechanism of nociception evolutionarily conserved in *Drosophila*. 第45回日本基礎老化学会大会 2022.7.28 オンライン参加

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし