

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21604

研究課題名(和文)慢性疼痛発症における一次体性感覚野の役割～ニューロン・グリア関連の解明～

研究課題名(英文)The role of primary somatosensory cortex in chronic pain

研究代表者

石川 達也 (Ishikawa, Tatsuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教

研究者番号：00750209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はミラーイメージペイン発症に一次体性感覚野(S1)の神経回路再編が関与するか検討する事を目的とした。慢性疼痛時、患肢と同側のS1では1層抑制性神経細胞およびアストロサイトの活動亢進が認められ、2/3層錐体細胞の活動は抑制されている事を見出した。この抑制活動をGABAA受容体の拮抗薬により慢性的に抑制すると、神経回路再編が生じ健常肢に疼痛様行動が誘発されたが、アストロサイトの活動を抑制すると、これら現象が生じない事を明らかにした。したがって、ミラーイメージペイン発症にはS1の神経回路再編が関与しており、再編には興奮性神経細胞およびアストロサイトの活動亢進が必要であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Some chronic pain patients have an abnormal pain sensation in contralateral limb to injury, which is called mirror image pain. Since synaptic remodeling in the primary somatosensory cortex (S1) has critical roles in induction of chronic pain, cortical reorganization in the S1 ipsilateral to injured limb may contribute to mirror image pain. However, contribution of cortical cells in the S1 in mirror image pain remain completely unknown. In the present study, we found that inhibitory neuronal activities and astrocytic activities increased in the S1, while excitatory neuronal function decreased. Disinhibition of ipsilateral S1 induced by chronic application of GABAA receptor antagonist caused enhancement of neuronal activities, synaptic remodeling and chronic pain, and these are blocked by inhibition of astrocytic activities. Therefore, present results indicate that disinhibition of ipsilateral S1 to injured limb may contribute to induction of mirror image pain with synaptic remodeling.

研究分野：神経科学

キーワード：神経回路再編 ニューロン・グリア関連 慢性疼痛 ミラーイメージペイン in vivo 2光子イメージング 免疫電子顕微鏡法 凍結切断レプリカ法

### 1. 研究開始当初の背景

不快な痛みが長期間持続する病態を示す慢性疼痛の発症には中枢神経系の可塑的変化が関与することが示唆されている(Ikeda et al., 2007)。これまで、慢性疼痛モデルマウスを用いて患肢の責任領域である対側の大脳皮質一次体性感覚野(以下、contra-S1)の、5層錐体細胞の樹状突起スパインの形成・消失や運動性の亢進が生じることを明らかにした(Kim and Nabekura, 2011; Kim, Ishikawa et al., 2011)。これは大脳皮質の神経回路再編が慢性疼痛の原因となりうることを示唆している。

一方、慢性疼痛患者の一部に患肢と対側肢においても疼痛が出現することがある(ミラーイメージペイン、Watkins and Maier, 2002)。しかし、脊髄を当疾患の発症機序とした検討が進められてはいるが(Cheng et al., 2014)、大脳皮質の関与については検討されていない。さらに疼痛モデルマウスにおいて、障害肢と同側の一次体性感覚野(以下、ipsi-S1)で同様な回路再編が起きているかどうか不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、慢性疼痛モデルマウス(障害肢のみ疼痛を発症するモデル)を用いて多光子励起レーザー顕微鏡による *in vivo* イメージングを行い、ipsi-S1の神経細胞とグリア細胞(アストロサイト)の活動を観察し、ipsi-S1における神経回路再編がミラーイメージペイン発症の機序となりうるかを検討し、当疾患の治療・予防戦略構築の一助とすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)慢性疼痛モデルは右後肢の坐骨神経を部分結紮し作製した。(2)慢性疼痛時の ipsi-S1における1層抑制性神経細胞、2/3層錐体細胞およびアストロサイトの活動を明らかにするため、2光子励起レーザー顕微鏡を用いて各々の自発活動をカルシウム応答により計測した。(3)ipsi-S1の抑制性神経細胞の過剰な抑制活動を慢性的に抑制し、健常肢に痛みが誘発されるか検討するため、GABA<sub>A</sub>受容体のアンタゴニスト(SR95531)を含んだ徐放性ポリマー(elvax)を ipsi-S1の直上に留置した。(4)疼痛モデルマウスの ipsi-S1において神経回路再編が生じることで、健常肢に疼痛様行動が誘発されるか検討するため、(3)の処置を行ったマウスの ipsi-S1における5層錐体細胞の樹状突起スパインを処置前後で繰返し観察しスパインの形成および消失を計測した。また、健常肢の痛み行動は von frey filament に対する後肢の逃避閾値を指標に測定した。(5) ipsi-S1におけるアストロサイトの活動亢進が、神経回路再編および健常肢における機械刺激に対する閾値の低下に関与するか検討するため、アストロサイト特異的 TCA サイ

クル阻害薬であるフルオロアセテートと SR95531 を含む elvax を ipsi-S1 に留置し、神経回路再編の有無を *in vivo* 2光子イメージングにより観察し、健常肢の痛み行動も計測した。(6) ipsi-S1におけるアストロサイトの活動亢進機序を明らかにするため、ipsi-S1におけるアストロサイトの代謝型グルタミン酸受容体5型(mGluR5)の発現密度を免疫電子顕微鏡法(Pre-embedding法および凍結切断レプリカ法)により観察し発現密度を計測した。

### 4. 研究成果

(1)ミラーイメージペイン発症における ipsi-S1の役割

本研究ではまず、慢性疼痛時 ipsi-S1における神経細胞およびグリア細胞では何が起きているか明らかにするため、右後肢の坐骨神経を部分結紮した慢性疼痛モデルマウスの ipsi-S1における興奮性・抑制性神経細胞およびアストロサイトのカルシウム活動を *in vivo* 2光子カルシウムイメージング法により計測した。

その結果、1層抑制性神経細胞の自発活動の亢進が認められ、これは contra-S1からの入力に依存して生じていることも明らかにした。その一方で、坐骨神経結紮後2/3層錐体細胞の自発活動は減弱していた。これらの結果は、慢性疼痛発症時 ipsi-S1では抑制性神経細胞が興奮性神経細胞の活動を抑制していると示唆された。また、慢性疼痛モデルマウスの ipsi-S1においてアストロサイトの自発活動亢進も認められた。これは一次体性感覚野の後肢領域にのみ認められ、坐骨神経結紮後14日まで観察されたが、28日後には認められなかった。さらに、ipsi-S1のアストロサイトの活動亢進は脳梁を介した contra-S1からの興奮性入力に依存していた。

次に、ミラーイメージペインの発症に大脳皮質一次体性感覚野の神経回路再編が関与しているか検討するため、ipsi-S1で生じている抑制性神経細胞の抑制活動を SR95531の慢性投与により抑制した。その結果、5層錐体細胞の神経回路再編(樹状突起スパインの形成・消失の増加)が生じ、健常肢への刺激に対する2/3層神経細胞のカルシウム応答性の亢進および健常肢での疼痛様行動(ミラーイメージペイン)が誘発されることを明らかにした。

アストロサイトが放出するグリオトランスミッターと呼ばれる分子はシナプス形成に関与することが報告されている(Eroglu et al., 2009)。さらに慢性疼痛発症時 contra-S1においても、5層錐体細胞の神経回路再編(樹状突起スパインの形成・消失の亢進)には、アストロサイトの活動亢進も必要であることを我々は報告している(Kim, Ishikawa et al., 2016)。本研究においても、ipsi-S1のアストロサイトの活動亢進が認められた慢性疼痛モデルマウスに SR95531 を慢性投与し

た場合のみ神経回路再編が生じたことから、神経回路再編に興奮性神経細胞だけでなくアストロサイトの活動亢進も関与する可能性が示唆された。これを検証するために、慢性疼痛モデルマウスの ipsi-S1 にフルオロアセテートと SR95531 を含んだ elvax を留置し、樹状突起スパインの形成・消失を観察した。その結果、フルオロアセテートと SR95531 を投与したグループでは SR95531 のみを投与したグループに対しスパインの形成・消失が、有意に減少しており、ipsi-S1 においても神経回路再編には興奮性神経細胞とアストロサイト両方の活動亢進が必要であることを見出した。さらに、フルオロアセテートと SR95531 を ipsi-S1 に慢性投与した慢性疼痛モデルマウスの健常肢には疼痛様行動は誘発されなかった。

これらの結果から、慢性疼痛時 ipsi-S1 において興奮性神経細胞およびアストロサイトの活動亢進が生じると神経回路再編が誘発され、健常肢にも疼痛（ミラーイメージペイン）が出現することを明らかにした。したがって、ミラーイメージペインは脊髄だけでなく大脳皮質一次体性感覚野もその発症に関与しており、当疾患においても体性感覚野を対象とした治療・予防戦略の構築が必要と考えられる。

以上の研究成果は、現在投稿準備中である。

## （2） ipsi-S1 におけるアストロサイト活動亢進機序

（1）の研究から慢性疼痛時、ipsi-S1 における神経回路再編がミラーイメージペイン発症に関与することが明らかとなった。この回路再編にはアストロサイトの関与が示唆されているが、活動亢進の機序は不明であった。

ipsi-S1 におけるアストロサイトの活動亢進機序の解明に先がけ、我々は免疫電子顕微鏡法によりアストロサイトの細胞膜上に発現する mGluR5 を観察し、contra-S1 において慢性疼痛発症時 mGluR5 を介したアストロサイトの活動亢進が神経回路再編に関与することを報告した (Kim, Ishikawa et al., 2016) したがって、ipsi-S1 においても同様の機序によりアストロサイトの活動亢進が生じているか検討するため、免疫電子顕微鏡法を用いて mGluR5 の発現密度を計測した。その結果、従来の免疫電子顕微鏡（Pre-embedding）法により、ipsi-S1 のアストロサイトに mGluR5 のシグナルが確認された。さらに、膜分子の局在解析に秀でた凍結切断レプリカ法を用いて ipsi-S1 におけるアストロサイトの mGluR5 の発現亢進が生じているか詳細に検討したが、Pre-embedding 法で用いた抗体では、その特異性を担保できなかった。したがって、現在は脳組織の固定条件や複数の mGluR5 抗体を使用し（既に mGluR5 の発現が報告されている）海馬 CA1 錐体細胞放線層 (García-Negredo et al., 2014) にお

いて抗体の特異性および mGluR5 の標識効率の最適化の検討を行っている。

## 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3件)

Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura J. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro*.

2016 ;3(3). (査読有り)

DOI: 10.1523/ENEURO.0004-16.2016

Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest*. 2016;126(5):1983-97. (査読有り)

DOI: 10.1172/JCI182859

Takatsuru Y, Nabekura J, Ishikawa T, Kohsaka S, Koibuchi N. Early-life stress increases the motility of microglia in adulthood. *J Physiol Sci*. 2015;65(2):187-194. (査読有り)

DOI: 10.1007/s12576-015-0361-z.

### 〔学会発表〕(計4件)

Eto Kei, Ishikawa Tatsuya, Ishibashi Hitoshi, Nabekura Junichi, Contribution of inter-regional regulation of primary somatosensory cortical functional change in chronic pain. 第94回日本生理学会大会, 2017年3月27日, アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

Tatsuya Ishikawa, Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura, The role of primary somatosensory cortex in chronic pain. 第8回アジア・オセアニア生理学会連合(FAOPS) 2015年大会, 2015年11月25日, バンコク(タイ)

石川達也、江藤圭、石橋仁、鍋倉淳一、慢性疼痛発症時における大脳皮質一次

体性感覚野の役割、日本解剖学会第 75 回中部支部集会、日本解剖学会第 75 回中部支部集会、2015 年 10 月 3 日、福井大学（福井県・永平寺町）

Tatsuya Ishikawa, Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura, The role of primary somatosensory cortex in chronic pain. 第 38 回日本神経科学学会大会, 2015 年 7 月 29 日, 神戸国際会議場、神戸国際展示場（兵庫県・神戸市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 達也 (Ishikawa Tatsuya)  
福井大学・学術研究院医学系部門・特命助教  
研究者番号：00750209