

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：34519

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H05074

研究課題名（和文）感覚と感情が相互に増強する慢性疼痛の神経分子機構

研究課題名（英文）Interactions between sensory and emotions for chronic pain

研究代表者

古賀 浩平（KOGA, KOHEI）

兵庫医科大学・医学部・講師

研究者番号：50768455

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 19,000,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛は感覚と情動が相互に作用し合っているが、感覚・情動の神経分子機構は不明である。慢性疼痛と不安に関わる前帯状回に着目して、シナプス前長期増強を形成する投射選択性を調べた。前帯状回は視床から単シナプス性および多シナプス性の入力を受けて長期増強に関わることを明らかにした。

さらに、慢性疼痛モデルの前帯状回では抑制性シナプス伝達が減弱すること、前帯状回ムスカリンM1受容体を活性化すると抑制性シナプス伝達を活性化して機械性過敏行動を改善することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

前帯状回皮質は、慢性疼痛と不安の形成に関わる大脳皮質の一つである。前帯状回における興奮性シナプスおよび抑制性シナプスが慢性疼痛によっていかに可塑的变化を形成するかや皮質内の局所神経回路が明らかになると、前帯状回における慢性疼痛や不安の仕組みが解明される。本研究結果は、上位中枢に作用する慢性疼痛に対する創薬開発に役立つ可能性がある。さらに、このような感覚がいかに情動や感情を形成し、相互に作用し合うかの神経分子機構が明らかとなると、様々な感覚-情動系の解明に発展する広範囲な神経科学分野に貢献できる。

研究成果の概要（英文）：Chronic pain consists of sensory and emotional aspects, and both two aspects interact each other. However, the neural mechanisms and circuits on sensory-emotional interactions are still unknown. We focused on the anterior cingulate cortex (ACC), which is involved in chronic pain and anxiety, and studied the selective projections to form presynaptic long-term potentiation in the ACC. We found that the ACC receives inputs from thalamus mono-synaptically as well as poly-synaptically. Furthermore, an animal model of chronic pain attenuated GABAergic inhibitory synaptic transmission in the ACC. An electrophysiological study showed that a chronic pain model reduced the release of GABA. When we activate muscarinic M1 receptors within the ACC, mechanical hypersensitivity was alleviated through facilitating muscarinic M1 receptors on GABAergic transmissions in the ACC.

研究分野：疼痛学

キーワード：前帯状回

## 1. 研究開始当初の背景

痛覚過敏や神経因性疼痛に抗炎症性鎮痛薬や麻薬性鎮痛薬が効きにくく有効な治療法が確立されていない事実は、慢性疼痛機序に関する現在の常識の限界を示すとともに、従来型の発想の発展ではなく、全く異なる発想で機序を考える必要性を訴えている。慢性疼痛は感覚と感情の2つの側面から形成され、感覚が感情(例えば、不安やうつ)を形成し、一方で感情が感覚の受容を増強する。このように感覚と感情は相互に作用することが慢性疼痛の理解を困難にしている(Bushnell et al., *Nature Rev Neurosci* 2013)。これまでのヒトのイメージング法を用いた報告から、前帯状回は感覚と感情の両方に関与することが明らかとなっており、前帯状回は慢性疼痛を司るセンターの一つとして働き、感覚と感情の情報が統合される可能性が示唆されている(Zhuo, *Trends in Neurosci* 2016; Bliss et al. al., *Nature Rev Neurosci* 2016)。しかしながら、ヒトのイメージング法は時間分解能に乏しいため、この手法では解明できない神経分子機構が存在すると推測される。特に、いかに感覚と感情が相互に作用して慢性疼痛の状態を増強するか、の神経分子機構については不明である。

## 2. 研究の目的

(1) 前帯状回に入力する投射線維の興奮性シナプス応答: これまでの解剖学的手法を用いた先行研究において、前帯状回は視床の背内側核および扁桃体から投射を受け、シナプスを形成していることが明らかとなっている。さらに視床の背内側核は、その軸索が前帯状回の脳梁末端付近を通過することが明らかになっている(Lee et al., *Euro J Neurosci* 2007)。そこで、脳スライス標本を用いて、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、刺激電極を脳梁末端に留置して脳梁付近を通過する視床背内側由来の誘起性シナプス伝達が mono-synaptically か poly-synaptically かについて解析した。

(2) 慢性疼痛モデルの前帯状回における抑制性シナプス伝達のシナプス可塑性: 前帯状回を含む大脳皮質は、グルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性シナプス伝達と GABA を伝達物質とする抑制性シナプス伝達が皮質内で神経回路を作っている。これまでの先行研究では、興奮性シナプスの可塑的变化が調べられてきた一方(Zhuo, *Trends in Neurosci* 2008)、慢性疼痛が及ぼす抑制性シナプス伝達における可塑的变化は明らかとなっていない。また、前帯状回の抑制性シナプス伝達は不安様行動に重要であることから(Kim et al., *Mol Brain* 2011)、慢性疼痛モデルにおける前帯状回の GABA 抑制性シナプス伝達の可塑性を調べた。

(3) 前帯状回の抑制性シナプス伝達を制御するアセチルコリン $\mu$ スカルリン受容体の機能的意義: アセチルコリン作動性神経は前帯状回を含む脳の広範囲に投射して、前帯状回に $\mu$ スカルリン受容体の作動薬を投与すると抗侵害効果を示すことを既に報告している(Koga et al., *Mol Pain* 2017)。ここでは、神経損傷モデルの前帯状回において、 $\mu$ スカルリン受容体の作動薬を局所投与した時に慢性疼痛モデルの機械性過敏行動を改善できるかについて検討した。

## 3. 研究の方法

(1) 前帯状回に入力する投射線維の興奮性シナプス応答: オスの成熟マウス(8-12週齢、C57/BL6)を用いて、冠状断脳スライス標本作製した。前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、保持電位を $-70$  mV に固定して興奮性シナプス後電流を記録した。刺激電極を脳梁末端付近に留置して視床から前帯状回に投射する線維を刺激して誘発性興奮性シナプス電流を記録した。10 Hz の頻回刺激を与えた時に、誘発性電流に failure が発生するかを調べた。そして、視床から前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞が視床から単シナプス性に投射してるかもしくは、多シナプス性に入力するかを明らかにした。

(2) 慢性疼痛モデルの前帯状回における抑制性シナプス伝達のシナプス可塑性: 完全フロインドアジュバンドを成熟マウス(雄、8-12週齢、C57/BL6)の左後肢に投与して、慢性炎症性モデルを作製した。完全フロインドアジュバンドを投与して2-3日後に、マウスの左足後肢に von Frey filament による機械性刺激を与え、慢性炎症モデルの機械性感覚過敏行動を確認した。

冠状断脳スライス標本作製して、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、保持電位を $0$  mV にして GABA<sub>A</sub> 受容体を介する抑制性シナプス後電流を解析した。シナプス下で一過性の応答: 微小および自発性抑制性シナプス後電流の発生頻度と振幅、そしてシナプス外の GABA<sub>A</sub> 受容体を介する持続的シナプス伝達の基線の変化を解析項目として、慢性炎症性モデルと正常マウスで比較・検討した。さらに、慢性炎症性モデルの前帯状回において、GABA の放出が減少する仕組みについてウエスタンブロッティング法を用いて GABA をシナプス小胞に貯蔵する役割を果たす小胞 GABA トランスポーターおよび種々の GABA<sub>A</sub> 受容体サブユニットのタンパクの発現量の変化を調べた。

(3) 前帯状回の抑制性シナプス伝達を制御するアセチルコリン-ムスカリン受容体の機能的意義：雄成熟ラット (Wistar, 280-300 g) を用いて坐骨神経部分損傷モデルを作製した。前帯状回、脳室内もしくは視床の腹側後外側核に薬物を投与するためのカニューレを挿入した。von Frey filament による機械刺激をラットの左後肢に与えて、神経損傷モデルにおける機械性過敏行動を 30 日間解析した。また、事前に前帯状回、脳室内もしくは視床の腹側後外側核に留置したカニューレにムスカリン M1 受容体の作動薬を投与し、神経損傷モデルの機械性過敏行動が改善されるかを調べた。さらに、GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬や GABA<sub>B</sub> 受容体拮抗薬を局所投与し、ムスカリン M1 受容体を活性化した時の機械性感覚過敏の緩和効果が GABA シナプス伝達を介するかについて検討した。最後に、神経損傷モデルが前帯状回のムスカリン M1 受容体のタンパク発現量をさせるかについてウエスタンブロッティング法で解析した。

#### 4. 研究成果

(1) 前帯状回に入力する投射線維の興奮性シナプス応答：前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行い、刺激電極を脳梁末端に留置して 10 Hz の頻回電気刺激を与えた。その結果、脳梁末端における電気刺激は、多くの第 II/III 細胞からの記録で polysynaptic な誘起性電流を発生させた。

これはすなわち、視床から前帯状回第 II/III 層の錐体細胞に投射する線維は、視床細胞-前帯状回第 II/III 層細胞間で直接的にシナプスを形成しているよりもむしろ、視床細胞-前帯状回内-前帯状回第 II/III 層細胞間で直接のおよび間接的に視床-前帯状回の第 II/III 層間でシナプスを形成している可能性が考えられる。

(2) 慢性疼痛モデルの前帯状回における抑制性シナプス伝達のシナプス可塑性：完全フロインドアジュバンドをマウスの左後肢に投与した慢性炎症性モデルを作製した。完全フロインドアジュバンドを投与して 2-3 日後に、マウスの左足後肢に von Frey filament による機械性刺激を与え機械性感覚過敏行動を確認した。次に、前帯状回において、錐体細胞に投射している GABA シナプスが、可塑的な変化を示すかについて冠状断脳スライス標本を用いたホールセルパッチクランプ記録法により調べた。前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞から記録を行い、保持電位を 0 mV にして抑制性シナプス後電流を解析した。この抑制性シナプス後電流は、GABA<sub>A</sub> 受容体の拮抗薬で完全に消失することから神経伝達物質は GABA であることが確認できた。そして、慢性炎症性モデルの微小および自発性抑制性シナプス後電流の発生頻度を調べると、慢性炎症性モデルの抑制性シナプス後電流の発生頻度は、正常に比べて有意に減少した。また、GABA<sub>A</sub> 受容体を介するシナプス伝達には、上記のシナプス下における一過性のシナプス伝達とシナプス外における持続的なシナプス伝達が存在する。従って、慢性炎症性モデルがシナプス外に発現する GABA<sub>A</sub> 受容体の性質を変化させるかについて調べた。その結果、慢性炎症性モデルは、シナプス外に発現する GABA<sub>A</sub> 受容体の性質は変化させないことが明らかとなった。

さらに、慢性炎症性モデルの前帯状回において、GABA の放出が減少する仕組みについてウエスタンブロッティング法を用いて調べた結果、GABA をシナプス小胞に貯蔵する役割を果たす小胞 GABA トランスポーターのタンパク量が炎症性モデルで顕著に減少した。一方、GABA<sub>A</sub> 受容体を構成する種々のサブユニットのタンパク発現量に変化はなかった。

以上の結果から、慢性疼痛モデルの前帯状回では、GABA の放出が減弱し、その原因の一つに小胞 GABA トランスポーターのタンパク発現量の減少がシナプス下における GABA<sub>A</sub> 受容体を介する一過性の反応を減弱することが明らかとなった。この前帯状回の抑制シナプス伝達の異常な可塑性が、慢性疼痛や不安を形成する可能性が示唆された (Koga et al., Mol Pain 2018)。

(3) 前帯状回の抑制性シナプス伝達を制御するアセチルコリン-ムスカリン受容体の機能的意義：ラットの左座骨神経を部分的に結紮する疼痛モデルを作製した。この神経損傷モデルの機械刺激に対する感覚過敏は少なくとも 30 日以上続いた。そして、ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の作動薬を神経損傷モデル 7 日後の前帯状回の片側もしくは脳室内に局所投与すると、機械性過敏行動が改善された。次に、GABA<sub>A</sub> 受容体の作動薬を疼痛モデルの前帯状回に局所投与すると過敏行動を改善した。さらに、前帯状回におけるムスカリン M<sub>1</sub> 受容体作動薬による過敏行動の改善効果が GABA<sub>A</sub> 受容体の拮抗薬で阻害された。一方、ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体作動薬の脳室内投与による過敏抑制効果は、GABA<sub>B</sub> 受容体を介することが明らかとなった。

以上の結果から、前帯状回および脳室内におけるムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の活性化による機械性過敏行動の改善は、GABA<sub>A</sub> シナプス伝達を介する可能性が示唆された (Koga et al., Brain Res 2019)。

#### < 引用文献 >

- Bushnell et al., Nature Rev Neurosci 2013, 14(7):502-11.
- Zhuo, Trends in Neurosci 2016, 39(3):136-145.
- Bliss et al. al., Nature Rev Neurosci 2016, 17(8):485-96.
- Lee et al., Euro J Neurosci 2007, 25(9):2847-61.
- Zhuo, Trends in Neurosci 2008, 31(4):199-207.

Kim et al., Mol Brain 2011, 4:6:1-10.  
Koga et al., Mol Pain 2017, 1744806917692330:1-11.  
Koga et al., Brain Res 2019, 1704:187-195.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Koga K, Yamada A, Song Q, Li XH, Chen QY, Liu RH, Ge J, Zhan C, Furue H, Zhuo M, Chen T.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Ascending noradrenergic excitation from the locus coeruleus to the anterior cingulate cortex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol Brain.	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13041-020-00586-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Uta D, Yoshimura M, Koga K.	4. 巻 160
2. 論文標題 Chronic pain models amplify transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) receptor responses in adult rat spinal dorsal horn.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuropharmacology.	6. 最初と最後の頁 1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neuropharm.2019.107753.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uta D, Kato G, Doi A, Andoh T, Kume T, Yoshimura M, Koga K.	4. 巻 512(2)
2. 論文標題 Animal models of chronic pain increase spontaneous glutamatergic transmission in adult rat spinal dorsal horn in vitro and in vivo.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 352~359
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.03.051.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Koga K, Matsuzaki Y, Migita K, Shimoyama S, Eto F, Nakagawa T, Matsumoto T, Terada K, Mishima K, Furue H, Honda K	4. 巻 1704
2. 論文標題 Stimulating muscarinic M1 receptors in the anterior cingulate cortex reduces mechanical hypersensitivity via GABAergic transmission in nerve injury rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 187~195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Koga K, Shimoyama S, Yamada A, Furukawa T, Nikaido Y, Furue H, Nakamura K, Ueno S	4. 巻 14
2. 論文標題 Chronic inflammatory pain induced GABAergic synaptic plasticity in the adult mouse anterior cingulate cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1~14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806918783478	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Koga K, Shimoyama S, Yamada A, Furue H, Nakamura K, Ueno S.
2. 発表標題 Chronic pain model alters GABAergic synaptic transmission in the mice anterior cingulate cortex.
3. 学会等名 The 9th FAOPS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Koga K
2. 発表標題 Functional roles of presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex for pain and anxiety.
3. 学会等名 第40回 日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古賀浩平
2. 発表標題 前帯状回のシナプス前終末における長期増強の形成と不安様行動
3. 学会等名 第27回 神経行動薬理若手研究者の集い (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Koga K, Yao I, Setou M, Furue H, Zhuo M
2. 発表標題 The ubiquitin proteasome system regulates presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex
3. 学会等名 第95回 日本生理学会大会 (高松)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Koga K, Yao I, Setou M, Furue H, Zhuo M
2. 発表標題 SCRAPPER regulates spontaneous release and presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex
3. 学会等名 第40回 日本神経科学会年会 (千葉)
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考