

令和 3 年 10 月 20 日現在

機関番号：63905

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09051

研究課題名(和文)慢性疼痛時の一次体性感覚野における触覚・痛覚異常回路形成機構の解明

研究課題名(英文) formation of the abnormal neuronal circuit between the touch-sensitive and pain-sensitive neuronal circuit in the primary somatosensory cortex during chronic pain

研究代表者

江藤 圭 (Eto, Kei)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：30545257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛は痛みが長期間持続する病態であり、触られただけで痛みを生じる。末梢神経損傷後に一次体性感覚野(S1)における神経回路の再編成することが慢性疼痛の発症・維持に関係することが最近明らかになったことから、末梢神経傷害後、S1の触応答神経回路と痛み応答神経回路の混線によって慢性疼痛が生じるのではないかと考えた。本課題では、触応答神経回路と痛み応答回路の可視化、及び末梢神経損傷後の機能の変化を解明することを目指して研究を行った。その結果、触応答神経細胞の一部は痛み刺激に応答することが明らかになった。また、慢性疼痛の一つであるミラーイメージペインにおけるS1の役割についても明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では未だに有効な治療法に乏しい慢性疼痛の新たな機序を明らかにできたことから、学術的に意義がある。また、大脳皮質に着目した新たな治療法の確立のきっかけになる可能性を有しており、社会的意義も有する。

研究成果の概要(英文)：Chronic pain is a pathological condition in which pain lasts for a long time, and touch stimulation causes pain or pain is enhanced in this condition. Recently, it has shown that the reorganization of neural circuits in the primary somatosensory cortex (S1) is associated with the onset and maintenance of chronic pain after peripheral nerve injury. Thus, it is possible that chronic pain might be caused by crosstalk between touch-sensitive neural circuit and pain-sensitive neuronal circuits in the S1. The purpose of this study was to visualize the touch- and pain-sensitive neuronal circuits and to clarify how these neuronal activities change after peripheral nerve injury. As a result, it was revealed that a part of the touch-sensitive neurons responded to the pain stimulus. Moreover, it was clarified the new role of S1 in the mirror image pain, which is one of chronic pain.

研究分野：神経科学

キーワード：痛み 2光子顕微鏡 一次体性感覚野 神経細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は長期間痛みが持続する病態であり、触刺激などの弱い刺激に対して生じる痛みであるアロディニアや痛み刺激に対する感受性が亢進する痛覚過敏などの症状を呈する。これらの症状は、中枢神経系の異常な神経回路形成によって誘導されると考えられている。痛みの情報処理に関与する脳領域の一つである一次体性感覚野(S1)は、痛みの強度、部位、刺激時間の認知に重要な役割を担っており、慢性疼痛における役割が近年明らかにされている。ヒトにおいては慢性疼痛によりS1脳機能が亢進し(Lotzeら、2008 Brain)、げっ歯類の慢性疼痛モデルではS1興奮性神経細胞活動が亢進すると共に、興奮・抑制バランスの破綻が起きることで疼痛行動が惹起される(研究代表者、2011 JNeurosci; 研究代表者、2012 JNeurosci)。さらに末梢神経傷害で誘発される神経因性疼痛モデルマウスにおいて、神経傷害後S1内でシナプス形成・消失が一過性に亢進し新たな神経回路が形成され、このシナプス再編成が痛み発生に寄与する可能性が示唆されている(Kim et al., 2016 J Clin Invest)。このことを、慢性疼痛時には触刺激を痛みと認識したり(アロディニア)痛み刺激に対する感度が亢進すること(痛覚過敏)と併せて考えると、S1でシナプスが新たに形成されることで痛み刺激に应答する神経回路が触応答性の神経回路と混線を引き起こしている可能性、及び痛覚シナプスの機能が強化されている可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本課題では、(1)慢性疼痛時にS1で触覚がどのように痛覚へと変化しアロディニアが発症するか、(2)痛覚神経回路活動の変化が痛覚過敏に寄与しうるかを神経回路活動に着目し明らかにすることを目的とする。特に、S1内のどの層における神経回路の変化がアロディニア・痛覚過敏の発症に寄与するかを詳細に検証するために、第2/3層と第4層の神経活動を計測する。そのために、生きたマウスS1の複数の層における多数の神経細胞活動を2光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより観察し、正常時の触・痛みの情報処理機構を明らかにするとともに、末梢神経傷害によりその情報処理機構がどのように変化するかを検討する。

3. 研究の方法

2光子顕微鏡で神経細胞活動を可視化するために、in vivoカルシウムイメージングを行う。本研究では、S1にAAV-Camk2-GCaMP6fを投与し、カルシウム蛍光指示蛋白質GCaMP6fをS1神経細胞に発現させ、生きたマウスのS1神経細胞活動を観察する。また、複数の層の神経活動を観察するために、ピエゾ素子を用いて対物レンズを高速駆動し、イメージングを行った。グリア細胞の活動はカルシウム蛍光色素を脳内に投与することで染色し、可視化した。痛み行動は細いフィラメントに対する後足の逃避閾値をアロディニアの指標として評価し、熱侵害刺激に対する逃避閾値を痛覚過敏の指標として評価する。

4. 研究成果

2017年度は、触刺激装置の構築、熱を用いた痛み刺激装置の開発を行った。痛み刺激はペルチェ素子の温度を最適に制御することで行う。複数の脳深部領域から同時に画像を撮像するために、ピエゾ素子による対物レンズ制御を行う。当初、顕微鏡の制限により低速でしか画像を取得することができなかったが、顕微鏡メーカーと共同で対応することで、画像撮像速度を大幅に向上することができた。この手法では多数の神経細胞の活動を計測することができ、データ量が膨大であるため、自動解析システムが必要である。そこで、matlabを用いて解析用プログラムを作成し、半自動的に神経活動を解析する系を構築した。

2018年度は、麻酔下のイメージングに加え、覚醒下イメージング実験系の構築を目指した。麻酔は神経活動を減弱するなど大脳皮質神経活動に著しい影響を与えるため、麻酔なしでのイメージングも行う必要がある。そこで、2018度は無麻酔でイメージングを行いつつ感覚刺激を与える系の構築を行った。まず、頭部固定したマウスから安定してイメージングを行う系を確立した。次に、覚醒マウスの足裏を触圧刺激することは難しいため、光刺激を用いて触覚感受性末梢神経を刺激する系の確立を行った。そのために、触覚感受性末梢神経細胞に青色感受性光活性化イオンチャンネルであるチャンネルロドプシンを発現するThy1-Chr2マウスを導入した。マウスの繁殖に時間がかかったが、年度末には繁殖に成功し、2019年度より実験に使用できる準備が整った。

また、本課題を遂行する途中で、慢性疼痛の一種であるミラーイメージペインと呼ばれる現象において、S1アストロサイトが寄与することを明らかにし、論文として報告した(Ishikawa, 研究代表者(共同筆頭著者)ら、2018)。坐骨神経傷害後、傷害肢と同側S1において、神経・グリア細胞活動を計測したところ、アストロサイト、抑制性神経細胞の活動が活性化し、興奮性神経細胞活動は亢進していることが明らかとなった。このことから、抑制性神経細胞活動が増加し、興奮性神経活動が抑制されることが示唆された。次に、この抑制性神経細胞機能亢進の意義についてより詳細に検討した。坐骨神経傷害後、同側S1にGABAA受容体阻害剤を長期投与し、神経活動への影響を検討した。その結果、神経活動はGABAA受容体阻害剤投与により亢進し、可塑的变化を起こした。また、シナプス構造を2光子顕微鏡を用いて繰り返しイメージングすると、脱抑制により、シナプス構造が劇的に変化することを明らかにした。一方、Sham群に対してGABAA受容体阻害剤投与しても、シナプスの再編成は誘導されなかった。このことから、

脱抑制誘発性シナプス再編成には、神経活動の亢進だけでなく他の要因も重要であることが示唆された。さらに、長期の脱抑制により傷害が無い健常な足において慢性疼痛様の症状（アロディニア）が惹起され、GABAA 受容体阻害剤の効果が切れた後もアロディニア様行動が持続した。一方、Sham 群では GABAA 受容体阻害剤投与後のアロディニアの持続は観察されなかった。このことから、S1 の脱抑制による神経活動亢進によりシナプス再編が起き、その結果、疼痛行動が生じることが示唆された。さらに、脱抑制で見られたシナプス構造の変化及び、疼痛行動はアストロサイトの活動抑制により抑制されることを明らかにした。これらの結果から、慢性疼痛において、傷害肢と同側 S1 においてアストロサイトが活性化しており、何らかの要因で抑制性神経細胞機能が欠損することにより、皮質神経回路の可塑性が亢進し、新たに疼痛関連神経回路が形成され、傷害が無い健常な足においてミラーイメージペインが発症することが示唆された。

2019 度は、触刺激、温熱痛み刺激を用いて正常マウスの S1 神経細胞活動を計測した。温熱痛み刺激はペルチェ素子を用いて温度を変化させることで行った。S1 神経細胞は触刺激、温熱痛み刺激に応答した。触刺激に比べ温熱痛み刺激では多くの細胞が応答し、カルシウム応答の振幅も大きかった。また、触刺激に応答数細胞は一部痛み刺激でも応答した。覚醒下での足裏の温熱痛み刺激は現時点では困難であった。慢性疼痛で触、痛み応答細胞の応答がどのように変化するかは今後明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 3件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura K, Moorhouse AJ, Cheung DL, Eto K, Takeda I, Rozenbroek PW, Nabekura J	4. 巻 69
2. 論文標題 Overexpression of neuronal K ⁺ -Cl ⁻ co-transporter enhances dendritic spine plasticity and motor learning.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol Sci.	6. 最初と最後の頁 453-463
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12576-018-00654-5.	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 該当する
1. 著者名 Takeda Akiko, Shinozaki Youichi, Kashiwagi Kenji, Ohno Nobuhiko, Eto Kei, Wake Hiroaki, Nabekura Junichi, Koizumi Schuichi	4. 巻 66(8)
2. 論文標題 Microglia mediate non cell autonomous cell death of retinal ganglion cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Glia	6. 最初と最後の頁 2366 ~ 2384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/glia.23475	査読の有無 無
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 Eto K, Kim SK, Takeda I, Nabekura J.	4. 巻 126
2. 論文標題 The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience research	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.08.009.	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 該当する
1. 著者名 Tatsuya Ishikawa, Kei Eto, Sun Kwang Kim, Hiroaki Wake, Ikuko Takeda, Hiroshi Horiuchi, Andrew J Moorhouse, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura	4. 巻 159(8)
2. 論文標題 Cortical astrocytes prime the induction of spine plasticity and mirror image pain.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pain	6. 最初と最後の頁 1592-1606
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.pain.0000000000001248.	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 該当する

1. 著者名 Kato D, Eto K, Nabekura J, Wake H.	4. 巻 163(6)
2. 論文標題 Activity-dependent functions of non-electrical glial cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 457-464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvy023.	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 江藤圭、金善光、鍋倉淳一	4. 巻 68
2. 論文標題 慢性疼痛モデルマウスにおける大脳皮質体性感覚野神経回路再編とグリア機能	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 臨床雑誌整形外科	6. 最初と最後の頁 1284-1284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 awano H, Oyabu K, Yamamoto H, Eto K, Adaniya Y, Kubota K, Watanabe T, Hirano-Iwata A, Nabekura J, Katsurabayashi S, Iwasaki K	4. 巻 143(6)
2. 論文標題 Astrocytes with previous chronic exposure to amyloid -peptide fragment 1-40 suppress excitatory synaptic transmission	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 624-634
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.14247.	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 Eto K, Kim SK, Takeda I, Nabekura J.	4. 巻 126
2. 論文標題 The roles of cortical astrocytes in chronic pain and other brain pathologies.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Res.	6. 最初と最後の頁 3-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2017.08.009.	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 江藤 圭
2. 発表標題 大脳皮質体性感覚野神経回路可塑的変容の慢性疼痛における役割
3. 学会等名 第10回日本運動器疼痛学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 3. 江藤 圭
2. 発表標題 一次体性感覚野による慢性疼痛発生機構.
3. 学会等名 第59回基礎歯科医学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura.
2. 発表標題 The role of cortical inhibitory neuronal function in chronic pain.
3. 学会等名 The 40th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society.
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江藤 圭, 鍋倉 淳一
2. 発表標題 グリア細胞による神経回路再編成.
3. 学会等名 第3回CRESTシンポジウム.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤 圭, 鍋倉 淳一.
2. 発表標題 生体イメージングを用いた神経回路再編成の研究
3. 学会等名 CREST 領域連携シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 江藤 圭, 鍋倉 淳一.
2. 発表標題 グリア細胞による神経回路再編成
3. 学会等名 第2回CRESTシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 江藤 圭, 鍋倉 淳一.
2. 発表標題 グリア細胞機能破綻による神経回路長期再編障害の解明.
3. 学会等名 研究会 グリア細胞による脳機能ホメオダイナミクスの制御と&老化による破綻機序の解明を目指して
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 江藤 圭, 竹田育子, 鍋倉淳一	4. 発行年 2018年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 8
3. 書名 実験医学増刊	

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------