

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16474

研究課題名(和文)フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いたミクログリアの神経障害性疼痛への関与の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the involvement of microglia in neuropathic pain using flavoprotein autofluorescence imaging

研究代表者

番場 景子 (BAMBA, KEIKO)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：60790871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：最初にSNIモデルマウスを作成し、von Frey testにより術後4日目以降21日目まで機械的逃避閾値が低下していることを確認した。続いて、同モデルマウスの大脳皮質一次体性感覚野(S1)及び脊髄においてAFIを用いて神経活動を測定したところ、S1では経時的な神経活動の増強を認めたが、脊髄では増強変化は認めず、むしろ減弱傾向を認めた。次に、ミノサイクリン投与によるミクログリア活性阻害の神経障害性疼痛への影響を調べた。同モデルマウスに対しミノサイクリン投与を行うと機械的逃避閾値の低下を防ぐことができた。一方、AFIではミノサイクリン投与によるSNIモデルマウスの脊髄の応答の回復は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、末梢神経損傷モデルマウスにおいて、脊髄後角の興奮性は変化していないか、あるいは低下傾向であるにも関わらず、S1の興奮性が徐々に増加していることを示した。さらに、S1の興奮性の増加と動物の痛み行動が一致しないことからS1の興奮性の増加が動物の痛み行動の原因ではない可能性がある。また、末梢神経損傷に伴う脊髄へのミクログリア活性の関与は行動実験では確認されたものの、FAIによる神経活動の変化には影響を与えなかった。痛み行動と脊髄における神経活動の変化の結果の乖離は脊髄後角細胞やS1領域の興奮性増強が神経障害性疼痛を直接反映するのではなく、他の機序が存在することを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：First, SNI model mice were created, and it was confirmed by the von Frey test that the mechanical withdrawal threshold decreased from the 4th day to the 21st day after the operation. FAI measurements of neural activity in the primary somatosensory cortex (S1) and spinal dorsal horn of the same mouse model showed that S1 showed enhancement over time, whereas spinal cord showed no enhancement but rather a decreasing trend. Next, the effect of inhibition of microglial activity by administration of minocycline on neuropathic pain was examined. Administration of minocycline to the same model mice was able to prevent a decrease in the mechanical withdrawal threshold. On the other hand, the neural activity measurement by FAI did not show the recovery of spinal cord response of SNI model mice by administration of minocycline.

研究分野：麻酔科学

キーワード：フラビン蛋白蛍光イメージング法 神経障害性疼痛 in vivoイメージング 大脳皮質一次体性感覚野 脊髄後角 ミクログリア

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は自発痛、アロディニア、痛覚過敏などの症状を呈する難治性疼痛である。近年、神経細胞とグリア細胞の相互作用による変化が神経障害性疼痛の発言に深くかかわっていることが示唆されてきている。特に末梢神経障害により脊髄でM1ミクログリアが早期に増加しているという報告やミクログリア上のTLR4の活性化によりGABAによる抑制性シナプス伝達が抑制されるといった報告がありこれらが神経障害性痛の原因となっている可能性が示唆されている。しかし、これまでの研究では、in vivoでの検討はなされていない。

本研究では生体での脊髄後角や大脳皮質一次体性感覚野での神経活動を容易かつ低侵襲に記録できるフラビン蛋白蛍光イメージング法(FAI : Flavoprotein Auto fluorescence Imaging)を用いて神経障害性疼痛の発症機序、特にミクログリアの関連性を明らかにしたい。

2. 研究の目的

FAIを用い、神経障害性疼痛モデルマウスのin vivoでの大脳皮質一次体性感覚野および脊髄の神経活動とミクログリアの活性化との関連性を明らかにすることを目的とする。

FAIは刺激に対するin vivoでのマウスの神経活動を測定するのに非常に適した手法である。ミトコンドリア内の電子伝達系に存在するフラビン蛋白の光学的性質を利用して神経活動を測定する手法で、内因性蛋白を利用することから外因性色素を注入する必要はない。また、実験動物に頭蓋骨が薄く透見できるマウスを用いることで開頭の必要もなく、容易かつ非侵襲的にin vivoでの測定が可能である。本法を用いることにより、脊髄後角細胞の興奮性と大脳体性感覚野の神経活動の関連性をin vivoで測定が可能である。

本研究では、神経障害による脊髄でのミクログリアの活性化が脊髄での抑制性ニューロンの神経活動を低下させ、大脳皮質一次体性感覚野での神経興奮を来しているという仮説を立て、ミクログリアの活性化を抑制することによりSNIモデルマウスの神経可塑性変化を防ぎ、痛みの発生を抑制できるのかをFAI及び行動実験、免疫組織学的実験により仮説検証を行う。

3. 研究の方法

(1) SNI (Spared Nerve Injury) モデルマウス作成、機械的痛覚過敏の測定

4-6週齢のC57BL/6N雄マウスを1-3%イソフルラン吸入により麻酔し、左大腿部に約1cmの切開を加え、坐骨神経を露出・剥離し、坐骨神経の分枝である総腓骨神経、脛骨神経を6-0絹糸で結紮し、遠位部を切断する。腓腹神経を温存し、閉創する。Sham群として、同様に左大腿部筋層まで剥離したマウスを作成する。SNI施行前及び施行後7-21日にvon Frey testを用いて疼痛閾値の変化を測定する。

(2) 大脳皮質一次体性感覚野のフラビン蛋白蛍光イメージング

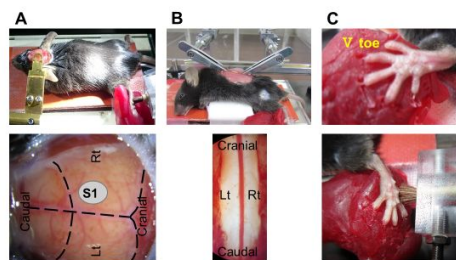
SNI、Sham各群の6 - 9週齢のC57BL/6Nマウスにウレタン1.5g/kgを腹腔内投与して麻酔を行う。マウスの気管切開後、頭部皮膚を切除し、動かないように頭蓋骨を固定する(図1A)。大脳皮質一次体性感覚野を暗視下に置く。経頭蓋的に青色励起光(450-490nm)を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光(500-550nm)を冷却CCDカメラにより撮影する。反応は大脳皮質一次体性感覚野より1秒当たり10フレームの頻度で撮影し、50秒毎に繰り返して得られた画像データ

を30回施行分加算平均した後、5×5マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させる。刺激直前の5フレームの平均を基準値 (F0) とし、蛍光強度変化(F/F0)を算出し、疑似カラーを表示する。足底を刺激し(図1C)、対側の体性感覚野のフラビン蛋白応答を観察・測定し、そのピーク値、経時変化、反応領域面積を解析する。

(3) 脊髄後角のフラビン蛋白蛍光イメージング

図 1

上記と同様の方法で、マウスをウレタンの腹腔内投与によって麻酔を行う。L1,L2の椎弓を切除し脊髄背面を露出する。硬膜は正常のままとして脊髄固定具(STS-A;Narishige)を用いて椎体を固定する(図1B)。青色励起光を脊髄に照射し、神経活動に伴って発せられる緑色自家蛍光を冷却CCDカメラにより撮影する。SNI、Sham各群の足底に振動刺激を与え、同側の脊髄のフラビン蛋白応答を観察・測定する(図1C)。



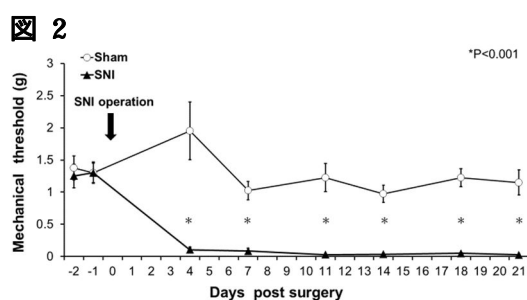
(4) 神経障害性疼痛モデルにおいてミクログリア活性阻害した場合の機械的逃避閾値の測定、脊髄におけるフラビン応答の変化、免疫組織学的実験

ミクログリアの応答を抑制すると報告されているミノサイクリン50mg/kg/dayを腹腔内投与し、in vivoにおける大脳皮質一次体性感覚野および脊髄におけるフラビン蛋白応答の変化を測定する。また、ミクログリアと興奮性、抑制性シナプス伝達物質との関連性を免疫組織染色により検討する。

4. 研究成果

(1) SNI 手術後の後肢逃避反応の機械的閾値の低下

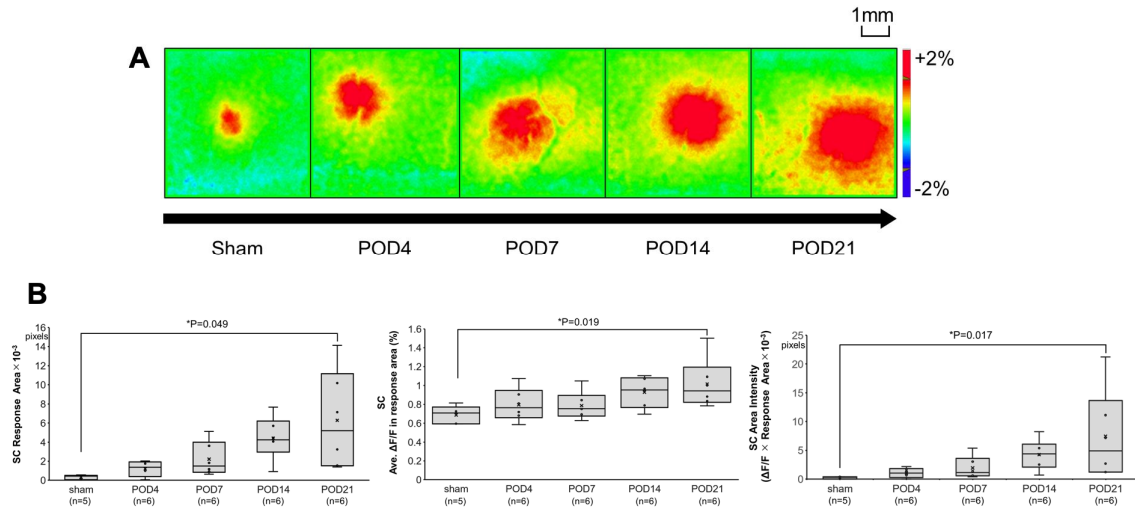
後肢逃避反応の機械的閾値を測定するために、von Frey filament を用いて後肢足底外側(腓腹神経領域)を刺激した。SNI 術後4日目に低下し、機械的刺激に対する痛覚過敏は、その後の3週間を通して安定して持続した。シャム群の逃避閾値は、実験期間を通して変化しなかった(図2)。



(2) SNI モデルマウスの S1 領域において神経活動は亢進した

本研究では、SNI 手術後の第5趾の非侵害機械的刺激によって誘発される同側 S1 反応の経時変化を調べた。SNI 側左第5趾刺激後、右 S1 領域の応答領域、応答領域の信号強度変化率の平均値、面積強度は術後4日目から増加傾向を示したが(図3A) 統計学的には有意な変化ではなく、術後21日目に初めて有意な増強となった(図3B)。

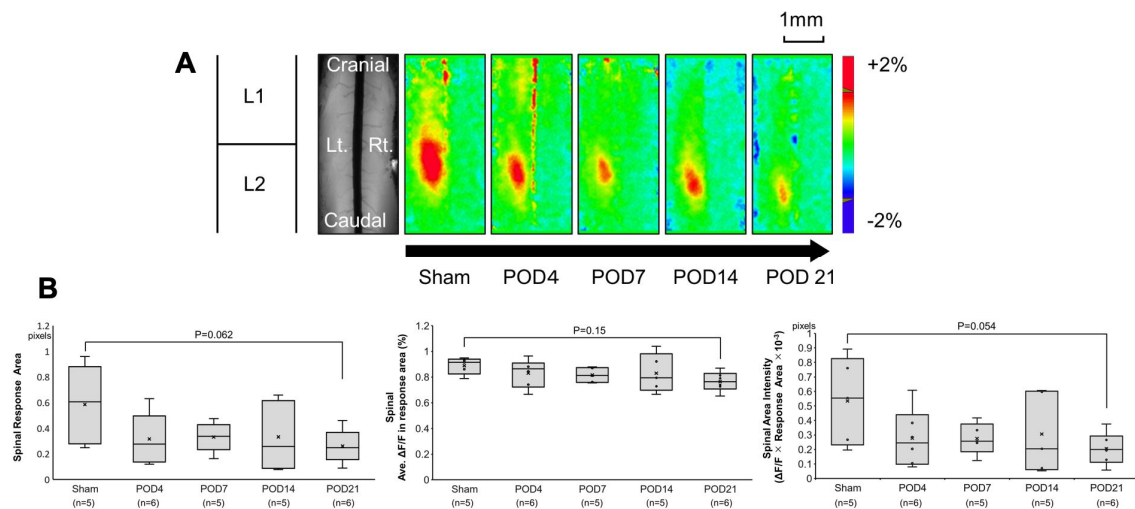
図 3



(3) SNI 術後の背側脊髄において神経活動の増加は認められない

S1 領域での測定と同様に、SNI 手術後 4 日目、7 日目、14 日目、21 日目のマウスの脊髄の蛍光強度値を測定し、シャムマウスと比較した。我々の予想に反して、S1 での測定結果とは異なり、神経損傷後の後肢刺激に応答する脊髄後角の神経活動の面積および強度は、いずれも経時的な増強変化は認めず、統計学的な有意差はないものの、むしろ減少傾向を示した (図 4A, B)。

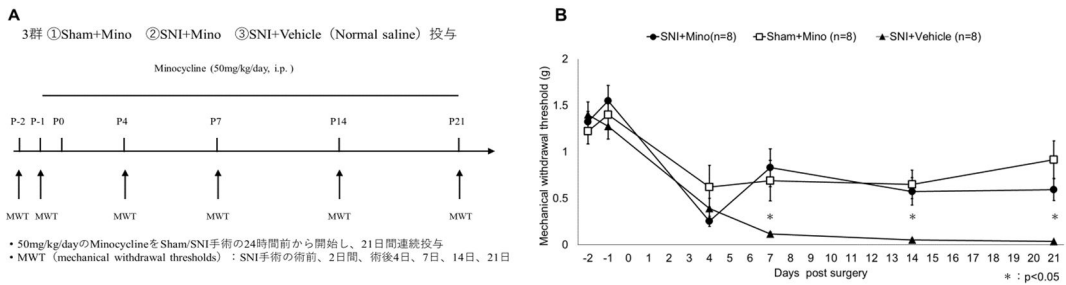
図 4



(4) ミクログリア活性阻害薬投与により機械的逃避閾値の低下を防いだ

Sham + Mino SNI + Vehicle SNI + Mino の 3 群に分けた。ミクログリア活性阻害薬 (ミノサイクリン塩酸塩 (日医工) 50mg/kg/day) を手術の前日から術後 21 日目まで、連日、腹腔内投与した (図 5A)。SNI + Mino 群は SNI + Vehicle 群に比較して、術後 7 日目以降 21 日目まで機械的的刺激による足底逃避閾値は有意に上昇した (図 5B)。

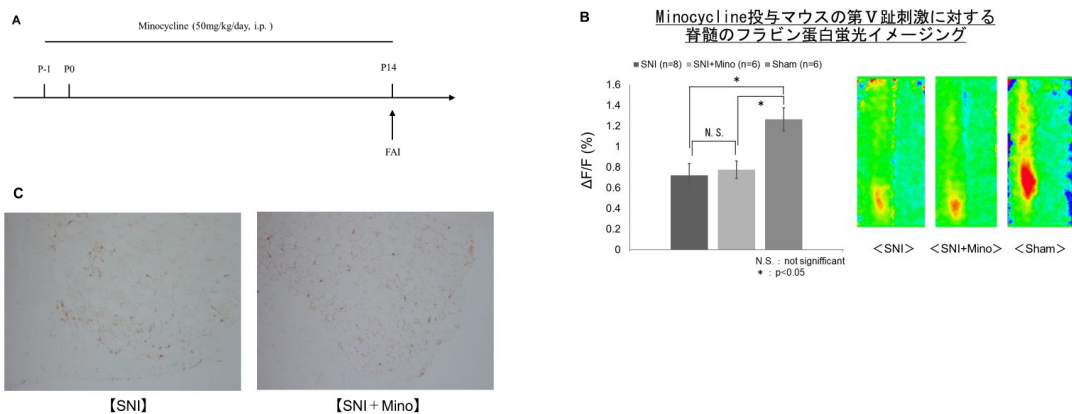
図 5



(5) ミクログリア活性阻害薬では SNI モデルマウスの脊髄の神経活動の低下を回避することはできなかった

SNI 手術前日から術後 14 日まで連日ミノサイクリン(50mg/kg/day)を腹腔内投与し、術後 14 日目の SNI モデルマウスの後肢刺激に対する同側脊髄の神経活動を FAI で測定し、神経可塑性変化へのミクログリアの関与を検討した。本研究では、ミノサイクリン投与による SNI モデルマウスの脊髄の神経活動への変化は認められなかった。また、同モデルマウスの脊髄切片のミクログリア活性を免疫組織化学染色 (Iba-1) で検討したが、SNI 群と SNI + ミノサイクリン投与群の明らかな差は認められなかった。

図 6



本研究では、末梢神経損傷モデルマウスにおいて、脊髄後角の興奮性は変化していないか、あるいは低下傾向であるにも関わらず、S1 領域の興奮性が徐々に増加していることを示した。さらに、S1 領域の興奮性の増加と動物の痛み行動が一致しないことから S1 領域の興奮性の増加が動物の痛み行動の原因ではない可能性が考えられる。末梢神経損傷に伴う脊髄へのミクログリア活性の関与は行動実験では確認されたものの、FAI による神経活動の変化には影響を与えず、痛み行動と神経可塑性変化には乖離がある可能性を示している。本研究はこれまで信じられていた脊髄後角細胞や S1 領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛を直接反映するものではなく、他の機序が存在することを示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 番場 景子
2. 発表標題 フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いたSpared nerve injury(SNI)モデルマウスの解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 番場 景子
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウスの大脳皮質一次体性感覚野及び脊髄後角における神経活動の経時的変化の解析
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Bamba
2. 発表標題 Analysis of Neural Activity in the Neuropathic Pain Mouse Model Using Flavoprotein Fluorescence Imaging
3. 学会等名 Anesthesiology2018 (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----