

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K16909

研究課題名（和文）痛みに応答する一次体性感覚野神経細胞の不安障害及び睡眠障害への影響

研究課題名（英文）The effects pain related neuronal ensembles in primary somatosensory cortex for anxiety or sleep disorder.

研究代表者

石川 達也 (Ishikawa, Tatsuya)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：00750209

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）：慢性疼痛患者の多くは不安障害や睡眠障害も同時に発症し、不快な痛みに加えてこれら症状がQOL低下の原因となっている。先行研究から大脳皮質一次体性感覚野(S1)は痛覚認知に関与すると示唆されているが、S1が不安や睡眠障害との関連を有しているか不明である。したがって、本申請課題では化学遺伝学的手法を痛み刺激に応答するS1の神経細胞に適用し、人為的にこの細胞の神経活動を制御することが可能なマウスを作製する。このマウスを用いてS1の特定の神経細胞の活動亢進が不安様行動や睡眠・覚醒に与える影響を行動学薬理学的手法により解明し、痛みに伴う不安障害や睡眠障害に対する効果的な治療法の構築を目指した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本申請課題ではS1の痛み刺激に応答する神経細胞集団が痛みだけでなく痛みに伴う情動の変化や睡眠障害へ及ぼす影響を検討する。更に、痛みの感覚的側面と情動的側面の両方を司る神経回路も同定することを試みる。これら研究成果は脳と痛みや痛みに伴うその他諸症状の関連を明らかにし、当該疾患の治療法や予防法確立の一助となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The quality of life of patients is detrimentally affected due to chronic pain and acute pain, often leading to mood disorders, such as depression and anxiety, or sleeping disorders. However, the mechanisms of causing chronic and acute pain are still unclear in the brain which contributes to pain perception, mood disorders, and sleep disorders. Although, previous studies indicated that primary somatosensory cortex (S1) receives the information of pain from periphery, it was unknown that S1 contributes to mood or sleeping disorders induced by pain. Thus, the aim of this study is to examine whether S1 contributes to anxiety and sleeping disorders. In this study, we prepared mice which can control the pain related S1 neuronal activities by using a viral-mediated TRAP and DREADD systems. Using the above mice, we considered whether pain related S1 neuronal population contributes not only pain but, also anxiety and sleep disorders.

研究分野：神経解剖学

キーワード：疼痛 不安様行動 大脳皮質一次体性感覚野 DREADDシステム TRAPシステム in vivo 2光子イメージング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛患者の多くは不安障害や睡眠障害も同時に発症し慢性的に続く不快な痛みに加えてこれら症状が QOL 低下の原因となっている。しかしながら、不安障害や睡眠に深く関わる脳において痛覚認知(障害部位および痛覚強度の認知)とこれら症状の関係は未だ不明な点が多く、脳における痛覚認知の解明は急性痛や慢性疼痛の発症メカニズムの解明につながり、更には当該疾患の効果的な治療法や予防法確立の一助となることが期待される。

これまでの研究から、痛覚認知には大脳皮質一次体性感覚野(以下、S1)が深く関与していることが示唆されていたが、S1 での痛覚認知が情動および睡眠・覚醒に影響を及ぼしているか詳細は不明であった。

2. 研究の目的

S1 は痛み以外の侵害刺激や触覚等の情報も受容しているが、痛覚認知および情動や睡眠に影響を及ぼす可能性のある神経細胞種についてはこれまで検討されていなかった。したがって、本研究の目的は S1 の中でも痛み刺激に応答した神経細胞のみの活動を人為的に制御し、「痛みに関わる S1 の神経細胞が情動および睡眠・覚醒に与える影響、更にそれを司る神経回路」を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

痛み刺激に応答する S1 の神経細胞の活動を人為的に制御するため、本申請課題では Targeted-Recombination-in-Active-Populations(TRAP) システムと化学遺伝学的手法(Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug, DREADD システム)を利用した。これら方法により痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が痛覚認知だけでなく不安様行動や睡眠・覚醒にも影響を及ぼしているか、行動薬理または神経回路学的手法を用いて検討した。方法の詳細については次の(1)-(4)に記す。なお、S1 の痛み刺激に応答する神経細胞が睡眠へ及ぼす影響については再現性が得られていないため、本成果報告書では S1 の痛み刺激に応答する神経細胞が痛覚過敏と不安様行動に及ぼす影響について報告する。

(1) 痛み刺激に応答した神経細胞への遺伝子導入

痛み刺激に応答した神経細胞集団のみの活動を人為的に制御させるため、マウスの左脳 S1 に神経活動依存的に Cre 組換え酵素を発現するアデノ随伴ウイルス(AAV)(cFos-Cre)と、Cre 組換え酵素存在下でヒトムスカリン受容体を改変したデザイナー受容体{hM3Dq(興奮性誘導)もしくは hM4Di(抑制性誘導)}を神経細胞膜上に発現する AAV(D10-hM3Dq-mCherry もしくは D10-hM4Di-mCherry)のカクテルを投与した。このマウスに一時的な疼痛を経験させるため、右後肢の足蹠に 5%ホルマリンを投与し hM3Dq や hM4Di をホルマリン刺激に応答した神経細胞に発現させた。このマウスにデザイナー薬剤(クロザピン N オキシド、CNO)を腹腔内投与することで hM3Dq や hM4Di を介し神経活動を人為的に制御した(Fo-TRAP-Gq または Fo-TRAP-Gi)。また、右後肢への生理食塩水投与刺激に応答した S1 の神経細胞に hM3Dq もしくは hM4Di を発現させたマウスを対照群とした(Sa-TRAP-Gq または Sa-TRAP-Gi)。

(2) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が痛覚認知と不安様行動へ及ぼす影響の検討

Fo-もしくは Sa-TRAP-Gq マウスに CNO を腹腔内投与し S1 の神経細胞を活性化させ、痛覚認知および不安様行動への影響を検討した。痛覚認知への影響は von Frey hair テスト、不安様行動は Open field および Elevated plus maze テストにより評価した。一方で、Fo-もしくは Sa-TRAP-Gi マウスの右足蹠へ痛発物質(カラゲニン)を投与後、CNO も腹腔内投与し痛覚閾値の変化および不安様行動への影響を前述と同様の方法で評価した。

(3) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が有する神経回路の同定

(1)の方法で hM3Dq または hM4Di を発現させた神経細胞には mCherry もマーカーとして発現しているため、免疫組織化学法により mCherry 陽性の軸索および軸索終末を脳全体で観察することで痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が有する投射先の脳領域を検討した。

(4) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞と視床束傍核間の神経回路が痛覚過敏と不安様行動へ及ぼす影響の検討

(3)の研究結果より、痛み刺激に応答した S1 の神経細胞のうち視床束傍核に投射するものが痛みとそれに伴う不安様行動に関与している可能性が示唆されたため、この神経回路が痛覚過敏と不安様行動に関与するか次の方法により作製したマウスを用い検討した。申請者は S1 へ AAV-cFos-Cre、束傍核には AAV retrograde-hSym-D10-hM3Dq-mCherry を各々投与することで、当該神経回路にのみ DREADD システムを構築した。このマウスの腹腔内に CNO を投与し von Frey hair テスト、open field テスト、elevated plus maze テストにより痛覚閾値や不安様行動を各々検討した。

また、本研究は金沢大学の定める規則に則り動物実験計画書を作成・提出し本学動物実験委員会により承認を得た後に開始した。また、動物愛護・生命倫理の観点に配慮し実験動物に苦痛を与えないよう十分注意を払った。

4. 研究成果

(1) 痛み刺激に応答した神経細胞への遺伝子導入

Fo-TRAP-Gq マウスの腹腔内に CNO を投与すると mCherry 陽性細胞(痛み刺激に応答した S1 の神経細胞)に最初期遺伝子 cFos の発現が亢進することを免疫組織化学により明らかにし、痛み刺激に応答した S1 の神経細胞の活動を人為的に制御可能なことを確認した。

(2) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が痛覚認知と不安様行動へ及ぼす影響の検討

Fo-TRAP-Gq マウスの腹腔内に CNO を投与すると痛覚閾値の減弱が誘導された(図 1)。更に、このマウスは Sa-TRAP-Gq マウスに比べ不安様行動も亢進することが open filed と elevated plus maze テストにより明らかとなった(図 2)。また、Fo-TRAP-Gi マウスの右足蹠へ痛発物質(カラゲニン)投与後 CNO を腹腔内に投与すると痛覚閾値の減弱を抑制し、痛みに伴う不安様行動の誘導も抑制することを前述と同様の方法で確認した。

(3) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞が有する神経回路の同定

mCherry 陽性の軸索もしくは軸索終末が前帯状回、線条体、視床下部や視床束傍核等において確認された。特に Fo-TRAP-Gq マウスへ CNO を腹腔内投与すると Sa-TRAP-Gq マウスのそれと比較して視床束傍核の神経細胞で cFos の発現量が亢進することを申請者は見出したため、痛み刺激に応答する S1 の神経細胞と束傍核間の神経回路が痛覚過敏や不安様行動に関与する可能性が示唆された。

(4) 痛み刺激に応答した S1 の神経細胞と視床束傍核間の神経回路が痛覚過敏と不安様行動へ及ぼす影響の検討

研究の方法(4)で作製したマウスに CNO を投与し、痛み刺激に応答した S1 の神経細胞のうち束傍核に投射するものみの神経活動を活性化させると、痛覚閾値の減弱と不安様行動の亢進が行動薬理的に認められた。

以上の研究から、S1 に存在する神経細胞の中でも痛み刺激に応答する神経細胞集団が痛覚認知だけでなく不安様行動にも関与することが明らかとなった。更に、痛み刺激に応答した S1 の神経細胞のうち視床束傍核と神経回路を有しているものが、これら痛みの感覚的側面と情動的側面を司っていることも示唆された。

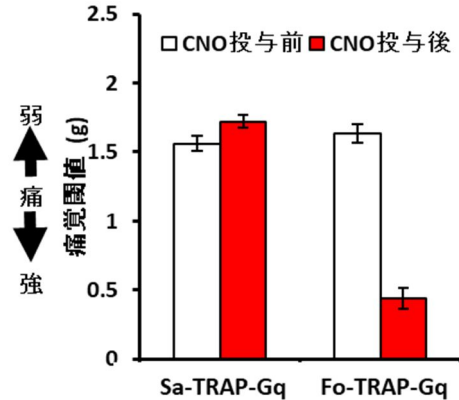


図 1 CNO 投与前後の後肢の痛覚閾値の変化
Fo-TRAP-Gq に CNO を投与すると後肢の痛覚閾値が低下した。

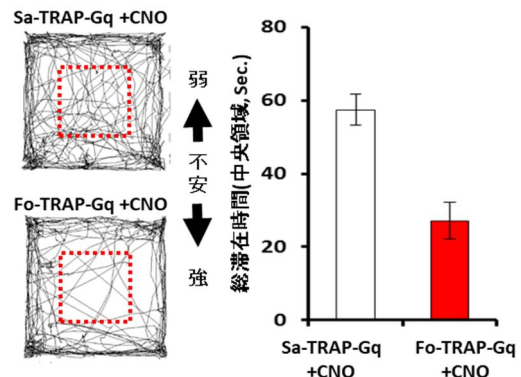


図 2 Fo-TRAP-Gq マウスに CNO を投与した際の不安様行動 (Open filed テスト)

各マウスにおける中央領域(赤枠)の滞在(右図;Fo-もしくは Sa-TRAP-Gq マウスの軌跡)。CNO 投与時 Fo-TRAP-Gq マウスは中央領域の滞在時間が短くなった(左図;不安様行動の誘発)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Ishikawa T, Murata K, Okuda H, Potapenko I, Hori K, Furuyama T, Yamamoto R, Ono M, Kato N, Fukazawa Y, Ozaki N.	4. 巻 26(4)
2. 論文標題 Pain-related neuronal ensembles in the primary somatosensory cortex contribute to hyperalgesia and anxiety.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 iScience.	6. 最初と最後の頁 106332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2023.106332.	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 -
1. 著者名 Kimura M, Nakase J, Ishikawa T, Asai K, Yoshimizu R, Kanayama T, Yanatori Y, Ozaki N, Tsuchiya H.	4. 巻 5
2. 論文標題 Growth-related changes in the ultrastructure of the quadriceps tendon.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Knee.	6. 最初と最後の頁 357-363
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.knee.2023.04.014.	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 -
1. 著者名 Okuda H, Ishikawa T, Hori K, Kwankaew N, Ozaki N.	4. 巻 162(2)
2. 論文標題 Hedgehog signaling plays a crucial role in hyperalgesia associated with neuropathic pain in mice.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Neurochem.	6. 最初と最後の頁 207-220
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jnc.15613.	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 -
1. 著者名 Danjo Y, Shigetomi E, Hirayama YJ, Kobayashi K, Ishikawa T, Fukazawa Y, Shibata K, Takahashi K, Parajuli B, Shinozaki Y, Kim SK, Nabekura J, Koizumi S	4. 巻 4;219(4)
2. 論文標題 Transient astrocytic mGluR5 expression drives synaptic plasticity and subsequent chronic pain in mice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Exp Med.	6. 最初と最後の頁 e20210989.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1084/jem.20210989	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 -

1. 著者名 Kwankaew N, Okuda H, Aye-Mon A, Ishikawa T, Hori K, Sonthi P, Kozakai Y, Ozaki N.	4. 巻 Sep;25(8)
2. 論文標題 Antihypersensitivity effect of betanin (red beetroot extract) via modulation of microglial activation in a mouse model of neuropathic pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur J Pain.	6. 最初と最後の頁 1788-1803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ejp.1790	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 -

1. 著者名 Asai K, Nakase J, Ishikawa T, Yoshimizu R, Kimura M, Ozaki N, Tsuchiya H.	4. 巻 27(2)
2. 論文標題 Differences in cellular and microstructural properties of the semitendinosus muscle tendon between young and adult patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Orthop Sci.	6. 最初と最後の頁 478-485.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jos.2021.01.012.	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 -

1. 著者名 Murata Koshi, Kinoshita Tomoki, Ishikawa Tatsuya, Kuroda Kazuki, Hoshi Minako, Fukazawa Yugo	4. 巻 528
2. 論文標題 Region and neuronal subtype specific expression of Na, ⁺ K ⁺ ATPase α and β subunit isoforms in the mouse brain	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Comp Neurol.	6. 最初と最後の頁 2654-2678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cne.24924	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 -

1. 著者名 Sato-Hashimoto M, Nozu T, Toriba R, Horikoshi A, Akaike M, Kawamoto K, Hirose A, Hayashi Y, Nagai H, Shimizu W, Saiki A, Ishikawa T, Elhanbly R, Kotani T, Murata Y, Saito Y, Naruse M, Shibasaki K, Oldenborg PA, Jung S, Matozaki T, Fukazawa Y, Ohnishi H.	4. 巻 eLife 2019;8
2. 論文標題 Microglial SIRP regulates the emergence of CD11c ⁺ microglia and demyelination damage in white matter.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 elife.	6. 最初と最後の頁 e42025.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.42025.	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

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 黒田一樹, 石川達也, 村田航志, 深澤有吾
2. 発表標題 脳内AMPA受容体のサブユニット構成に基づいた神経細胞膜上での局在解析法の確立
3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村田 航志, 木下 智貴, 石川 達也, 黒田 一樹, 星 美奈子, 深澤 有吾.
2. 発表標題 マウス脳におけるNa,K-ATPase および サブユニットアイソフォームmRNAの発現分布
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 深澤 有吾, Elhanbaly Ruwaida, 石川 達也, 村田 航志, 黒田 一樹.
2. 発表標題 FIB-SEM観察法によるシナプス結合における協調的前後構造の構築を支える分子メカニズムの解析
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒田 一樹, 石川 達也, 村田 航志, 深澤 有吾.
2. 発表標題 神経細胞における凍結割断レプリカ標識法(SDS-FRL法)と免疫タグノックインを組み合わせたNAK 3を含むNa+/K+-ATPaseの定量的分布解析の最適化
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会、第98回日本生理学会大会 合同大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川達也、江藤圭、石橋仁、尾崎紀之、鍋倉淳一
2. 発表標題 侵害刺激に対する一次体性感覚野の役割
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・全国学術集会、第96回日本生理学会大会合同大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川達也、村田航志、黒田一樹、堀紀代美、奥田洋明、尾崎紀之、深澤有吾.
2. 発表標題 Na/K-ATPase 3の神経細胞膜状発現分布の定量的局在解析
3. 学会等名 第125回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Ishikawa, Hiroaki Okuda, Kiyomi Hori, Noriyuki Ozaki.
2. 発表標題 Pain related neurons in primary somatosensory cortex contribute to anxiety behavior
3. 学会等名 International Symposium on NEW FRONTIER in NEUROSCIENCE 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tatsuya Ishikawa, Kei Eto, Noriyuki Ozaki, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura.
2. 発表標題 The role of primary somatosensory cortex in causing mirror image pain
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川達也, 村田航志, 黒田一樹, 尾崎紀之, 深澤有吾.
2. 発表標題 Na/K-ATPaseの神経細胞膜上発現分布の定量的局在解析
3. 学会等名 第28回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田洋明, Nichakarn Kwankaew, 堀紀代美, 石川達也, 小酒井友, 中村恒夫, 白石昌武, 尾崎紀之.
2. 発表標題 痛覚過敏形成におけるHedgehogシグナルの役割の解明
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nichakarn Kwankeaw, Hiroaki Okuda, Kiyomi Hori, Tatsuya Ishikawa, Yu Kozakai, Tsuneo Nakamura, Yoshitake Shiraishi, Noriyuki Ozaki.
2. 発表標題 Betamin (red beetroot extract) attenuates mechanical allodynia via inhibition on microglia activation in the neuropathic pain model in mice
3. 学会等名 第124回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------