

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16932

研究課題名(和文) 全身性炎症による脳内痛みネットワークの可塑的变化と痛覚過敏への関与の解明

研究課題名(英文) Systemic inflammation-induced pain-network plasticity and hyperalgesia

研究代表者

杉村 弥恵 (Sugimura, Yae)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20825997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：炎症が痛みを引き起こす仕組みを解明するために、痛覚過敏を呈する全身性炎症モデルマウスを用いて、炎症・侵害受容情報を処理する外側腕傍核(LPB)、その入力を統合する扁桃体中心核(CeA)、そして、疼痛閾値を制御する中脳水道周囲灰白質(PAG)を結ぶ神経回路のシナプス伝達を解析した。PAGに投射するCeAニューロンがLPBからの直接的興奮性入力とCeA局所回路を介した間接的抑制性入力を受ける事実、および、全身性炎症がこの興奮性入力を増大しCeA局所回路活動の変調を生じさせる事実を明らかにした。炎症による痛覚過敏の発症にこれらの扁桃体シナプス伝達の可塑的变化が関与する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は初めてPAGに投射するCeAニューロンからLPB由来シナプス入力に対する応答を記録した。これまで離れた神経核を結ぶネットワークをシナプスレベルで詳細に解析することは技術的に困難であったため、本研究で得られたデータは貴重である。痛覚過敏を呈する全身性炎症モデルにおいてLPB-CeAシナプス伝達の可塑的变化を捉えたことは今後の痛みに関する脳内ネットワークの全容解明と痛覚過敏を伴う慢性痛の新たな治療法の開発に寄与すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Aiming to reveal the neural mechanisms underlying pain sensitization in patients with systemic inflammation, I analyzed the synaptic activity of the central pain network in mice with lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation. In brain slices of the mouse, synaptic inputs from the CGRP-expressing neurons in the lateral parabrachial nucleus (LPB), a nucleus receiving nociceptive and inflammatory signals, were light-evoked and the synaptic responses were recorded from neurons in the central nucleus of the amygdala (CeA) projecting to the periaqueductal grey (PAG), a central origin of the descending pain modulatory systems, as identified by retrograde labeling. I found that in PAG-projecting CeA neurons, the excitatory inputs from the LPB was enhanced and the balance between the direct excitatory and indirect inhibitory inputs via the CeA local circuit was modified in systemically inflamed mice with hyperalgesia, suggesting these plastic changes underlie inflammation-induced pain

研究分野：神経生理学

キーワード：全身性炎症 外側腕傍核 扁桃体中心核 中脳水道周囲灰白質 カルシトニン遺伝子関連ペプチド シ
ナプス伝達 痛覚過敏

1. 研究開始当初の背景

痛みは傷害やそれに関連して述べられる「不快な感覚的・情動的体験」である。原因となる傷害や損傷が治癒したのちも、痛みが持続的に続く慢性痛は、治療に難渋し長期化するため、医療経済上も重大な問題である。特に慢性痛に特有の症候として、通常は無～低侵害性の刺激が強い痛みを生じさせる痛覚過敏があり、患者は苦しい生活を余儀なくされている。痛みの発症は多くの場合、傷害・損傷部位を中心とした炎症を伴う。一方、リポ多糖類 lipopolysaccharide (LPS) 投与による全身性炎症も痛覚過敏を引き起こす事実が広く知られているが、その機序は未解明である。

全身性の炎症が起きると炎症性シグナルが脳に伝達され、脳内ネットワークの可塑的变化を介して、内臓や四肢の痛覚過敏を引き起こすと想定される。我々は、以下の5つの実験事実から、全身性炎症による痛覚過敏発症機構の中核をなす脳内ネットワークとして、脳幹の外側腕傍核 (LPB) と扁桃体中心核 (CeA) の間の連絡に着目した。1) LPS 投与によって、LPB や CeA に最初期遺伝子 (Fos) が発現する (1,2)。2) CeA に投射する LPB の CGRP 陽性ニューロンは、侵害受容および LPS 投与によって興奮する (3)。3) LPB は脊髄後角侵害受容特異的ニューロンの大多数、ならびに、内臓情報の脳内標的である孤束核から入力を受ける (4)。4) LPB-CeA シナプス伝達は内臓痛や炎症性疼痛、神経障害性疼痛など様々なモデルにおいて増強する (5)。5) CeA 内側部のニューロンは下行性疼痛制御系の起始核である中脳水道周囲灰白質 (PAG) に投射し (6)、その活動は侵害受容閾値を制御する (7)。また、我々は光遺伝学的手法を用いて、LPB と CeA のシナプス連関と痛みの影響について、1) LPB 由来入力による CeA 局所回路活動の修飾、2) 後肢炎症性疼痛ラットの遅発性発火型 CeA ニューロンにおける LPB-CeA 興奮性シナプス伝達増強 (8)、3) CeA 内側部ニューロンから PAG 腹外側部ニューロンへの単シナプス性抑制性投射の可塑的变化を明らかにしてきた。以上から、全身性炎症が LPB-CeA 系を活性化することで同シナプスの可塑的变化をもたらす、その結果、痛覚過敏が生じる、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、全身性炎症による LPB-CeA シナプス伝達、および CeA 局所回路と出力系の可塑的变化を解析することを通じ、「全身性炎症が LPB-CeA 系を活性化することで同シナプスの可塑的变化をもたらす、その結果、痛覚過敏が生じる」という仮説を検証することである。

3. 研究の方法

CGRP 遺伝子の下流に Cre リコンビナーゼを発現する Calca^{Cre} マウスの LPB に光活性化陽イオンチャネル (ChR2) 発現アデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを微量注入し、LPB の CGRP 陽性ニューロン特異的に ChR2 を発現させた。また、PAG に蛍光ビーズを注入し、PAG 投射 CeA ニューロンを逆行性標識した。脳内微量注入操作から 4 週間以上経過後に、LPS (0.1 mg/kg) または対照群として生理食塩水を腹腔内投与し、2 時間後に扁桃体を含む急性脳スライス標本を作製した。顕微鏡下で蛍光標識された PAG 投射 CeA ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ記録を行い、膜電位固定下で光刺激によって誘発されるシナプス応答を、また、膜電流固定下で活動電位発生パターンを記録した。

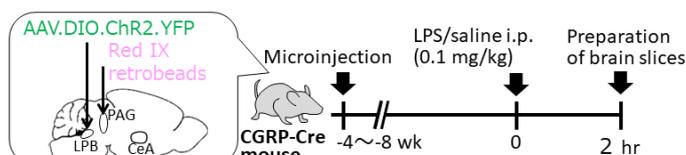


図1 実験プロトコール

4. 研究成果

CeA の特に内側部に逆行性標識された PAG 投射ニューロンが多くみられた (図 2A)。PAG 投射 CeA ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行い、光刺激によって LPB の CGRP 陽性ニューロンの神経線維・終末を特異的に活性化したところ、-60 mV 膜電位固定下で内向き電流を示すニューロン、+15 mV 膜電位固定下で外向き電流を示すニューロン、-60 mV 膜電位固定下で内向き電流を、+15 mV 膜電位固定下で外向き電流を示すニューロン、応答を示さないニューロンの 4 つのパターンが認められた (図 2B)。内向き電流は LPB からの直接的な興奮性入力、外向き電流は CeA 局所回路を介した間接的な抑制性入力であり、PAG 投射 CeA ニューロンはどちらの入力も受けていることが明らかになった。LPS 投与群と生理食塩水投与群において各パターンを示すニューロンの観察頻度に差はなかった。また、約 25% のニューロンにおいて、膜電流固定下で過分極後に段階的に脱分極パルスを与えると、潜時が短く、burst 状に活動電位が発生する発火パターンが認められた (図 2C1)。過分極を与えずに脱分極パルスを与えると、このような burst 状の発火はみられないことから (図 2C2)、T 型 Ca チャネルの関与が示

唆される。このような活動電位発生パターンは CeA 外側部のニューロンではみられず、CeA 内側部に存在する PAG 投射 CeA ニューロンに特徴的であった。この興奮特性は、入力を受けて素早く発火し、PAG に情報を伝える機能に貢献すると考えられる。LPS 投与群と生理食塩水投与群において各パターンの発生頻度に差はなかった。

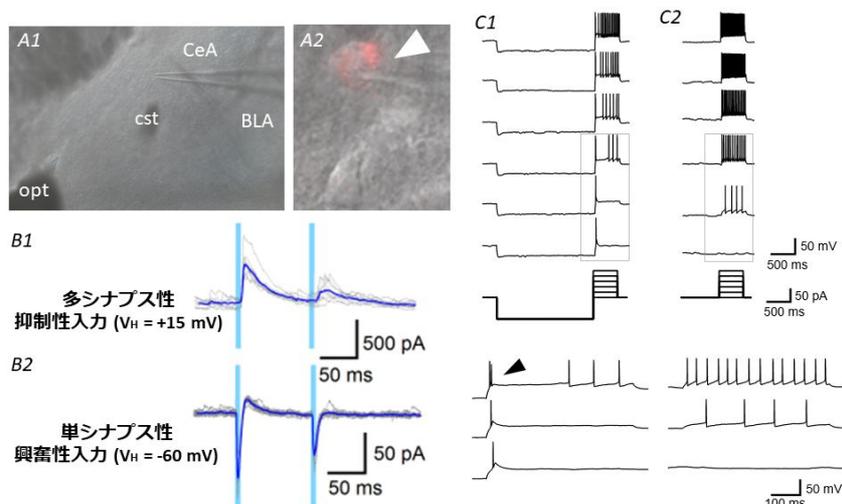


図2 PAG投射CeAニューロンからのホールセルパッチクランプ記録

A1) CeAを含む急性脳スライス標本; A2) 赤色蛍光色素で逆行性標識されたPAG投射CeAニューロン (矢頭は記録電極がニューロンと接していることを示す); B1) +15 mV膜電位固定下での記録; B2) -60 mV膜電位固定下での記録; C1) 膜電流固定下で過分極後に段階的に脱分極パルスを与えた時の記録 (下段は拡大図で、矢頭はburst状の発火を示す); C2) C1と同じニューロンで過分極パルスを与えなかった時の記録 (burst状の発火を認めない)

PAG 投射 CeA ニューロンの内向き電流の振幅、外向き電流の振幅に有意な差は認められなかった (図 3A, B)。短期可塑性の指標である paired pulse ratio は生理食塩水投与群と比較して、LPS 投与群で低下していたことから (図 3C)、興奮性シナプス伝達の増強が示唆される。また、直接的な興奮性入力に対して、どの程度 CeA 局所回路を介した抑制性入力を受けているかの指標である、外向き電流の比については LPS 投与群で減少傾向が認められたことから (図 3D)、LPS 投与によって CeA 局所回路活動を維持する機構が変化した可能性がある。以上の結果から、CeA は侵害受容情報を受け取り、ネットワーク内で情報処理して下行性疼痛制御系に出力する、上行性経路と下行性経路の「折り返し」統合点としての機能を持つ事実、そしてその機能が LPS 投与によって影響を受けることが炎症に伴う痛覚過敏発症機構の一因である可能性が示唆された。

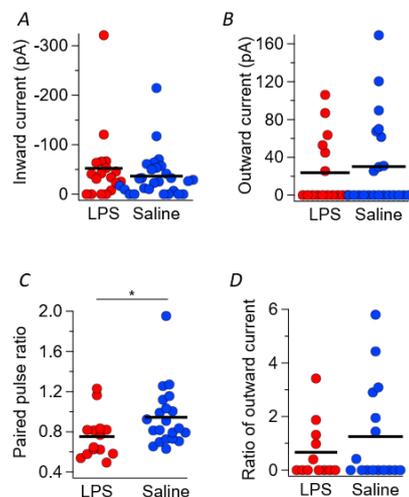


図3 PAG投射CeAニューロンのLPB由来シナプス入力に対する応答

A) -60 mV膜電位固定下での内向き電流の振幅; B) +15 mV膜電位固定下での外向き電流の振幅; C) 内向き電流のpaired pulse ratio; D) 内向き電流に対する外向き電流の比; *P < 0.05, Mann-Whitney U test

<引用文献>

1. Richard S, Engblom D, Paues J, Mackerlova L, Blomqvist A. Activation of the parabrachio-amygdaloid pathway by immune challenge or spinal nociceptive input: A quantitative study in the rat using Fos immunohistochemistry and retrograde tract tracing. *J Comp Neurol.* 2005;481(2):210–9.
2. Skelly DT, Hennessy E, Dansereau MA, Cunningham C. A Systematic Analysis of the Peripheral and CNS Effects of Systemic LPS, IL-1B, TNF- α and IL-6 Challenges in C57BL/6 Mice. *PLoS One.* 2013;8(7):1–20.
3. Campos CA, Bowen AJ, Roman CW, Palmiter RD. Encoding of danger by parabrachial CGRP neurons. *Nature.* 2018 Mar 21;555(7698):617–22.

4. Chiang MC, Bowen A, Schier LA, Tupone D, Uddin O, Heinricher MM. Parabrachial Complex: A Hub for Pain and Aversion. *J Neurosci*. 2019 Oct;39(42):8225–30.
5. Kato F, Sugimura YK, Takahashi Y. Pain-associated neural plasticity in the parabrachial to central amygdala circuit: Pain changes the brain, and the brain changes the pain. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1099:157–66.
6. Rizvi TA, Ennis M, Behbehani MM, Shipley MT. Connections between the central nucleus of the amygdala and the midbrain periaqueductal gray: topography and reciprocity. *J Comp Neurol*. 1991 Jan;303(1):121–31.
7. Sugimoto M, Takahashi Y, Sugimura YK, Tokunaga R, Yajima M, Kato F. Active role of the central amygdala in widespread mechanical sensitization in rats with facial inflammatory pain. *Pain*. 2021;162(8):2273–86.
8. Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic and network consequences of monosynaptic nociceptive inputs of parabrachial nucleus origin in the central amygdala. *J Neurophysiol*. 2016;115(6).

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Manami Yajima, Mariko Sugimoto, Yae K Sugimura, Yukari Takahashi, Fusao Kato	4. 巻 210
2. 論文標題 Acetaminophen and pregabalin attenuate central sensitization in rodent models of nociplastic widespread pain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropharmacology	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） 10.1016/j.neuropharm.2022.109029.	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 Mariko Sugimoto, Yukari Takahashi, Yae K Sugimura, Ryota Tokunaga, Manami Yajima, Fusao Kato	4. 巻 162
2. 論文標題 Active role of the central amygdala in widespread mechanical sensitization in rats with facial inflammatory pain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pain	6. 最初と最後の頁 2273-2286
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/j.pain.0000000000002224	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 Daigo Arimura, Kei Shinohara, Yukari Takahashi, Yae K Sugimura, Mariko Sugimoto, Tomokazu Tsurugizawa, Keishi Marumo, Fusao Kato	4. 巻 13
2. 論文標題 Primary Role of the Amygdala in Spontaneous Inflammatory Pain- Associated Activation of Pain Networks - A Chemogenetic Manganese-Enhanced MRI Approach.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in neural circuits	6. 最初と最後の頁 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fncir.2019.00058	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 杉村弥恵
2. 発表標題 電気生理学的実験手技を用いた腕傍核-扁桃体シナプス伝達の可塑的变化機構の解明
3. 学会等名 第43回日本疼痛学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉村弥恵 高橋由香里 奥田崇雄 徳永 亮太 加藤 総夫
2. 発表標題 炎症が痛みの上行性・下行性経路に関わる扁桃体中心核ニューロンに及ぼす影響
3. 学会等名 生理学研究所 痛みの研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉村弥恵 高橋由香里 奥田崇雄 徳永亮太 加藤 総夫
2. 発表標題 炎症による痛みネットワーク可塑的变化における扁桃体の役割
3. 学会等名 第98回日本生理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 杉村弥恵、加藤総夫、高橋由香里、Masoumeh Ghaemi-Jandabi、Zahra Ghasemi
2. 発表標題 侵害受容扁桃体可塑性と炎症性疼痛
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yae K Sugimura, Masoumeh Ghaemi-Jandabi, Zahra Ghasemi, Yukari Takahashi, Fusao Kato
2. 発表標題 Pain-related plasticity in the synaptic transmission from the central amygdala to the periaqueductal grey
3. 学会等名 48th Naito Conference on Integrated Sensory Sciences Pain, Itch, Smell and Taste (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yae K. Sugimura, Daigo Arimura, Yukari Takahashi, Fusao Kato
2. 発表標題 Functional and molecular dissection of nociceptive amygdala
3. 学会等名 8th Asian Pain Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 平井宏和, 日置寛之, 小林和人 (編集)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 285
3. 書名 実験医学別冊 決定版 ウイルスベクターによる遺伝子導入実験ガイド	

〔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