

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H06268・19K21360

研究課題名(和文) 視床下部神経ペプチドにおける慢性疼痛に対する神経可塑性に及ぼす分子基盤の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the molecular mechanism of hypothalamic neuropeptide on neuroplasticity for chronic pain

研究代表者

松浦 孝紀 (Matsuura, Takanori)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：90821679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：視床下部オキシトシン(Oxytocin: OXT)を中心とする神経ペプチドと慢性疼痛に対する中枢神経系のシナプスの可塑性変化に着目し、電気生理学手法を用いて検討した。その結果、OXTは大脳辺縁系の前帯状回領域において、記憶・学習のメカニズムの一つとされる長期増強(Long-term potentiation; LTP)に影響を及ぼしていることが示唆された。次に視床下部OXTニューロンに着目し、慢性炎症関節炎モデルラットのOXTニューロンのシナプスの可塑性についても検討した。慢性炎症関節炎モデルラットでは、OXTニューロンのシナプスの可塑性変化にも影響を及ぼしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

視床下部系・下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシン(oxytocin: OXT)の生理的役割は、近年では記憶、学習、信頼形成ならびに疼痛調整等の種々の中枢神経系を介した生理的作用が明らかになりつつある。本研究は、慢性疼痛に関与する中枢神経領域に注目し、OXTと中枢神経系(特に大脳辺縁系)の神経可塑性との関連性について検討した。OXTは前帯状回における神経の可塑性に影響を及ぼしていることを明らかにした。また慢性疼痛モデルにおいて、OXTニューロン自身も神経の可塑性変化を来していることが明らかとなり、視床下部OXT系の動態は疼痛逃避行動ならびに情動に影響を及ぼすことを示した。

研究成果の概要(英文)：We focused on relation between neuropeptides of hypothalamic oxytocin (OXT) and plasticity changes in synapses of the central nervous system for chronic pain. As a result, it was suggested that OXT affects long-term potentiation (LTP), which is one of the mechanisms of memory and learning, in the anterior cingulate cortex. Next, we focused on hypothalamic OXT neurons, and examined the synaptic plasticity of OXT neurons in adjuvant arthritis rats who is a model rat of chronic inflammatory arthritis, it was revealed that hypothalamic OXT neurons also affected synaptic plasticity in chronic inflammatory arthritis model rats.

研究分野：疼痛

キーワード：慢性疼痛 神経可塑性 視床下部オキシトシン 慢性関節炎モデル ホールセルパッチクランプシステム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高齢社会が進む日本において、整形外科医が日常診療の中で慢性疼痛や難治性疼痛を抱える患者といかに向き合うかというのは大きな課題の一つである。慢性的に持続する疼痛は QOL を低下させ、情動面にも悪影響を及ぼすとされており、慢性疼痛に対する疼痛緩和治療を行うことは、患者の QOL 向上においても非常に重要である。慢性疼痛や難治性疼痛については、侵害受容性疼痛のみが関与するのではなく、神経障害性や中枢機能障害性が関与するとされているが、これらの脳内メカニズムについては未だ不明な点が多い。

近年、慢性関節リウマチ (rheumatoid arthritis: RA) 治療においては、生物学製剤の進歩により、臨床的寛解・炎症フリーが達成されることが出来るようになってきているが、RA 罹患期間が長い症例では、CRP 等の炎症所見が消失した後にも疼痛が持続する患者が臨床現場では多く存在する。現在、このような残存する痛みについては、臨床の場では第一選択薬として NSAIDs を使用され、効果が得られない場合はプレガバリン、トラマドールならびにデュロキセチン等が使用される機会が多い。しかし、これらの薬剤には副作用があり、常用出来ない患者さんがいるのが現状である。これらの慢性疼痛に対する分子基盤を解明することは新たな創薬の可能性を拡大することにつながると考えている。私達整形外科医は慢性疼痛の機序についてさらに理解し、適切な疼痛治療薬を選択することが RA 治療においても真の臨床的寛解につながると考えている。

本研究にて注目した長期増強 (Long-term potentiation; LTP) システムはシナプス間の結合強度の持続的増加のことであり、記憶・学習のメカニズムの一つとされる [1]。このメカニズムは、記憶情報を司る海馬以外にも、侵害受容に関与する脊髄後角、前帯状回、扁桃体ならびに島皮質などでも引き起こされることが知られている。これらの中枢神経系領域にて、長期増強が引き起こされると (神経の可塑性変化をもたらすと) シナプスの伝導効率が増強し、知覚過敏を引き起こすとされている。

視床下部系・下垂体後葉ホルモンの一つであるオキシトシン (oxytocin: OXT) の生理役割は、古典的には分娩時の子宮筋収縮・授乳期の射乳反射の惹起作用等の内分泌作用はよく知られていたが、近年では記憶、学習、信頼形成ならびに疼痛調整等の種々の中枢神経系を介した生理的作用が明らかとなった。疼痛分野において、脊髄レベルでの OXT 系の研究は比較的進んでおり、抑制系ニューロンを介した鎮痛作用に対するメカニズムについては解明されつつある [2]。しかし、侵害受容に関与する脳内での中枢神経系の役割については未だ不明な点が多い。我々は、慢性疼痛に関与する中枢神経領域に注目し、視床下部神経ペプチドと LTP システムの関連性について解明することである。

2. 研究の目的

本研究は、侵害受容に関与する中枢神経領域である前帯状回などの大脳辺縁系で引き起こされる LTP システムに着目し、慢性疼痛モデルである関節炎モデルを用い、視床下部神経ペプチドである OXT の影響について研究することを目的とした。慢性疼痛という感覚情報は、中枢神経系にて記憶され、シナプスの伝導効率が増強したことで、痛みの閾値を低下させる原因となりえる。このシステムには、情動面の恐怖や不安という感情も強く関与しているとされ、慢性疼痛モデル・マウスでは、不安も同時に誘発することが報告されている [3]。不安という感情単独でも長期増強を引き起こすとされているが、慢性疼痛モデル・マウスの長期増強システムと異なっているとされる。尚、慢性疼痛と感情に及ぼす影響の相互関連に対するメカニズムについては不明な点が多い。

私はこれまで、視床下部 OXT 系に着目し、急性疼痛・慢性疼痛モデルにおいて、視床下

部・神経核にて OXT の合成が増加することを報告した [4, 5]。OXT の活性動態については、疼痛に対する生体防御作用があると考えられるが、詳細な中枢性の役割については不明な点が多い。

OXT 受容体は中枢神経系にも幅広く存在しており、特に近年 OXT 受容体は脊髄後角部以外に、大脳辺縁系の前帯状回 [6]、扁桃体ならびに海馬 [7]などでも報告されている。これらの中枢神経領域は知覚、情動反応ならびに記憶・学習においても重要な役割を果たしている。視床下部 OXT 系を含め様々な神経ペプチドは、脊髄レベルでの鎮痛調節作用の他に、脳内における中枢神経系を介し、疼痛緩和作用を有している可能性があり、この作用メカニズムの一つが LTP システムの抑制が考えられる。本申請課題では、視床下部 OXT 系を中心に神経ペプチドと中枢神経系のシナプスの可塑性変化に着目し、慢性疼痛ならびに難治性疼痛のメカニズムの解明ならびに治療への応用性について検討することである。

3. 研究の方法

(1) オキシトシン (Oxytocin: OXT) と大脳辺縁系における中枢神経系のシナプスの可塑性変化に着目した。C57BL/6 マウスを頸椎脱臼後に脳をすみやかに取り出し、人工脳脊髄液灌流下で前帯状回を含む 300 μ M 脳スライス切片を作製し、スライス・ホールセル・パッチクランプ法にて検討した。顕微鏡下にて前帯状回の錐体細胞のニューロンにパッチし、まずは自発性 (興奮性・抑制性) シナプス応答 (電流) を記録し、OXT の薬理学的作用について検討した。次に、記録する細胞のシナプス前に刺激電極を置き、誘発性興奮性シナプス応答 (電流) を記録し、電極を通して神経細胞に LTP を誘発させる刺激を行う。OXT のチャンパーへの還流によりこれらの神経細胞の LTP に変化を及ぼすかについて記録・解析した。

(2) 視床下部 OXT ニューロンに着目し、慢性疼痛モデルでの OXT ニューロン自身のシナプスの可塑性についても検討した。視床下部 OXT ニューロンの識別には、OXT-monomeric Red fluorescent Protein 1 (mRFP1) トランスジェニックラットを用いた。上記と同様の手技で視床下部を含む 300 μ M 脳スライス切片を作製した。方法としては、結核死菌を用いて慢性関節リウマチモデルの一つであるアジュバント関節炎ラットを作製した。結核死菌投与後 14 日目に、関節炎が発症しているのを関節炎スコアにて確認し、対照群である無治療群ラットならびにアジュバント関節炎ラットに対し、頸椎脱臼後に脳をすみやかに取り出し、脳スライス切片を作製し、ホールセル・パッチクランプ法を行った。人工脳脊髄液灌流下で、mRFP1 で蛍光標識した視床下部 OXT ニューロンにおいて、自発性 (興奮性・抑制性) シナプス応答 (電流) を記録・解析した。次に、アジュバント関節炎ラットにおける OXT ニューロンのフィードバック・システムについて検討を行なった。OXT の受容体拮抗薬である L-368,899 を用いて、自発性 (興奮性・抑制) シナプス応答 (電流) の変化を記録・解析した。

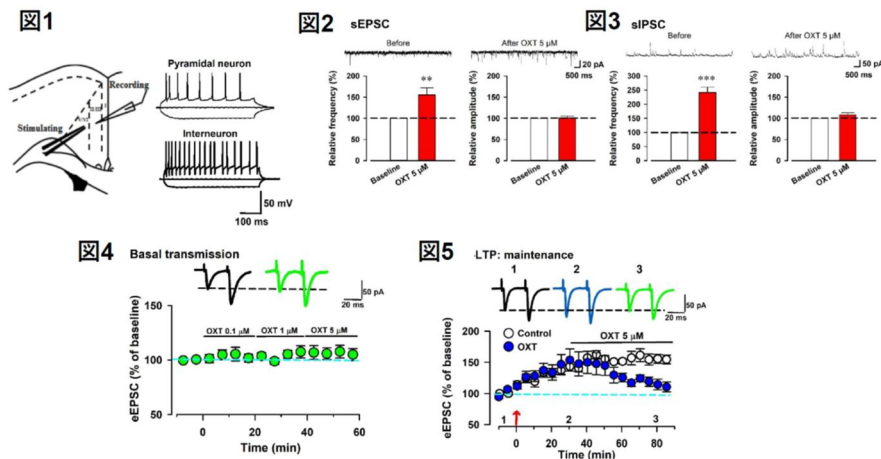
(3) 無治療群ラットの脳スライスにて刺激電極を置き、OXT-mRFP1 ニューロンにおける誘発興奮性シナプス電流の記録し、刺激による LTP の誘発の有無について検討した。最後に、結核死菌投与後 14 日目にアジュバント関節炎ラットに対し、OXT-mRFP1 ニューロンに対して LTP の誘発に対して行った。最終的に、LTP の起こるシグナル経路についても検討した。

4. 研究成果

(1) C57BL/6 マウスから、脳スライスでのホールセル・パッチクランプ法にて前帯状回皮質構造 / 領域のニューロンから記録した (図 1)。錐体細胞から自発性興奮性シナプス

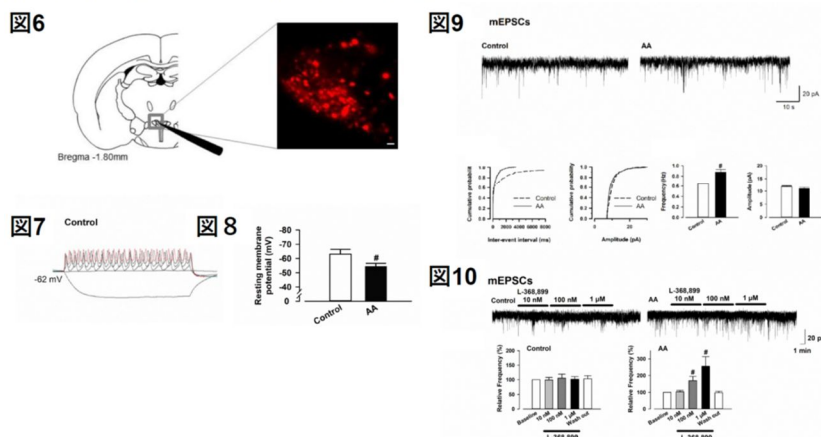
応答・電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) を記録し、OXT をチャンバー内に還流させると、sEPSC ならびに sIPSC が優位に増加することが明らかとなった(図 2、3)。次に刺激電極を前帯状回皮質構造の / 領域に置き、前帯状回領域の錐体細胞から誘発興奮性シナプス電流の記録を行った。長期増強 (Long-term potentiation; LTP) を誘発させる特殊な刺激を行った上で OXT を灌流させ、LTP への影響を確認した。結果、OXT が LTP を減弱することが明らかとなった (図 4、5)。

図1 前帯状回領域において錐体ならびに介在ニューロンからスライスパッチ法にて記録する模式図、ならびにそれぞれの発火パターン、 図2 sEPSCにおけるOXTの影響、 図3 sIPSCにおけるOXTの影響、 図4 誘発性EPSCにおけるOXTの影響、 図5 LTP誘導後の誘発性EPSCに対するOXTの影響について。



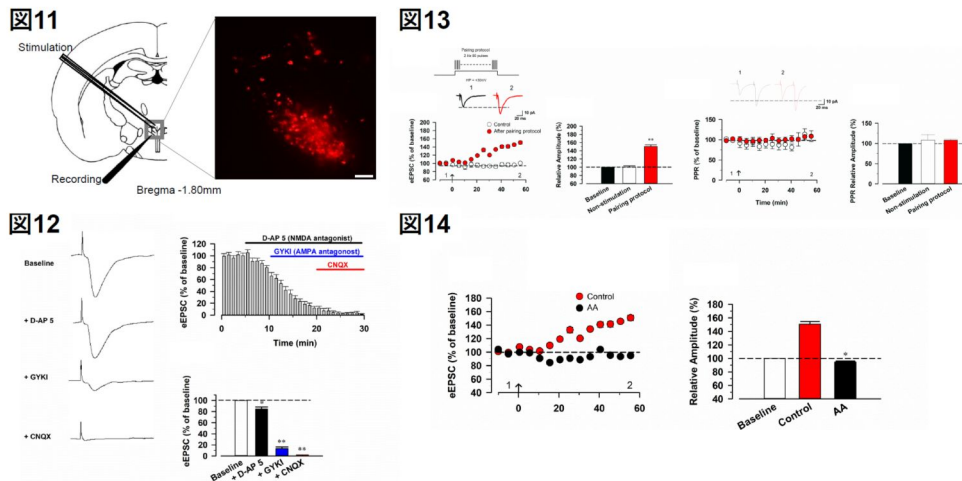
(2) 視床下部 OXT ニューロンに着目し、OXT ニューロン自身のシナプスの可塑性について検討した。視床下部室傍核の OXT-monomeric Red fluorescent Protein 1 (mRFP1) において (図 6、7) 自発性 (興奮性・抑制性) シナプス応答 (電流) を記録した結果、アジュバント関節炎ラット群は、無治療群と比較すると、有意に静止膜電位低下ならびに自発性興奮性シナプス電流の増加 (左方移動) が認められた (図 8、9)。つまり慢性疼痛モデルでの OXT ニューロンは、興奮性のシナプスの上昇もあり、発火しやすい状況であることが示唆された。次に、アジュバント関節炎ラットにおける OXT ニューロンのフィードバック・システムについて検討を行なった。OXT の受容体拮抗薬である L-368,899 を用いて、自発性 (興奮性) シナプス応答 (電流) の変化を記録した結果、無治療群では、L-368,899 還流下において有意な変化は認めなかったが、アジュバント関節炎ラット群においては、ベースラインと比較すると優位に興奮性シナプス電流は有意な上昇が認められた (図 10)。つまり、アジュバント関節炎ラットの視床下部 OXT ニューロンは、放出した OXT を介して自ら興奮を抑え、抑制を増幅させる負のフィードバック・システムがあることが示唆された。

図6 視床下部OX-mRFP1ニューロンから自発性EPSCならびにIPSCを記録する模式図、 図7 OXT-mRFP1 ニューロンの発火パターン、 図8 無処置群ならびにアジュバント関節炎ラット群における膜電位の変化、 図9 無処置群ならびにアジュバント関節炎ラット群におけるmEPSCの変化、 図10 無処置群ならびにアジュバント関節炎ラット群におけるOXT受容体アンタゴニスト投与における影響の違いについて。



(3) 刺激電極を視床下部室傍核の記録する OXTmRFP1 ニューロンの背側に置き (図 11) 無治療群ラットの OXT-mRFP1 ニューロンにおける誘発興奮性シナプス電流の記録し(図 12)、LTP の誘発の有無について検討した。Pairing-protocol と一般的に呼ばれる特殊刺激により、OXT-mRFP1 ニューロンの LTP が誘発されることを確認した (図 13)。結核殺菌投与後 14 日目のアジュバント関節炎ラット群では、LTP は誘発されなかった (図 14)。OXT-mRFP1 ニューロンで pairing-protocol で引き起こされる LTP は、慢性関節炎ラットの一つのモデルであることが示唆された。今後も視床下部 OXT ニューロンの LTP の起こるシグナル経路については検討していく予定である。

図11 視床下部OXT-mRFP1ニューロンから誘発性EPSCを記録する模式図、図12 視床下部OXT-mRFP1 ニューロンの誘発性EPSCのグルタミン受容体のサブタイプの存在、図13 OXT-mRFP1 ニューロンにおけるLTP誘導、図14 アジュバント関節炎ラット群におけるLTPの誘導の有無について。



引用文献

- Collingridge, G.L. and T.V. Bliss, *Memories of NMDA receptors and LTP*. Trends Neurosci, 1995. **18**(2): p. 54-6.
- Condes-Lara, M., et al., *Hypothalamospinal oxytocinergic antinociception is mediated by GABAergic and opiate neurons that reduce A-delta and C fiber primary afferent excitation of spinal cord cells*. Brain Res, 2009. **1247**: p. 38-49.
- Koga, K., et al., *Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain*. Neuron, 2015. **85**(2): p. 377-89.
- Matsuura, T., et al., *Fluorescent Visualisation of Oxytocin in the Hypothalamo-neurohypophysial/-spinal Pathways After Chronic Inflammation in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rats*. J Neuroendocrinol, 2015. **27**(7): p. 636-46.
- Matsuura, T., et al., *Possible Involvement of the Rat Hypothalamo-Neurohypophysial/-Spinal Oxytocinergic Pathways in Acute Nociceptive Responses*. J Neuroendocrinol, 2016. **28**(6).
- Burkett, J.P., et al., *Oxytocin-dependent consolation behavior in rodents*. Science, 2016. **351**(6271): p. 375-8.
- Mitre, M., et al., *A Distributed Network for Social Cognition Enriched for Oxytocin Receptors*. J Neurosci, 2016. **36**(8): p. 2517-35.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Matsuura Takanori, Li Xu-Hui, Tao Chen, Zhuo Min	4. 巻 15
2. 論文標題 Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on N-methyl-D-aspartate receptor and contribute to long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of adult mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1.74481E+14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919842958	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 松浦 孝紀, Xu-Hui Li, Chen Tao and Min Zhuo
2. 発表標題 成熟マウスの前部帯状回におけるNMDA受容体に対するマトリックスメタロプロテイナーゼ阻害剤の効果ならびに長期増強における関与について
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 T. Matsuura, T. Fujitani, M. Kawasaki, H. Suzuki, Y. Ueta, A. Sakai
2. 発表標題 Presynaptic feedback system of oxytocin-ergic neurons in the hypothalamus of adjuvant arthritic rats.
3. 学会等名 2019 EFIC（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takanori Matsuura, Teruaki Fujitani, Makoto Kawasaki, Hitoshi Suzuki, Yoichi Ueta, Akinori Sakai
2. 発表標題 Presynaptic feedback system of oxytocin-ergic neurons in the hypothalamus of adjuvant arthritic rats.
3. 学会等名 第97回 日本疼痛学会
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
--	---------------------------	-----------------------	----