

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09207

研究課題名(和文) Fos-TRAP法による脳内痛みニューロンの機能的同定とその慢性痛での役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of the functional role of pain-associated neurons identified by Fos-TRAP method

研究代表者

高橋 由香里 (Takahashi, Yukari)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：20613764

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)：非器質性に維持される慢性痛の本態である痛みの脳内可塑的变化の機構の解明を目指し、特定の状態で活動したニューロンのみ人工機能分子を発現させる実験手法「Fos-TRAP法」を導入することにより、多様な機能を担うニューロンの中から痛みで活性化したニューロンを機能特異的に標識・操作・解析した。炎症性侵害刺激で活性化される痛み上行路、腕傍核-扁桃体中心核経路において、痛み活性化ニューロン同士の腕傍核-扁桃体中心核興奮性シナプスは、非特異的腕傍核-痛み活性化扁桃体中心核ニューロン間のシナプスに比べて強い機能的結合を示す事実を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年開発・実用化されてきた神経活動依存的特異的分子発現法を駆使し、痛みによって活性化するニューロン・シナプス伝達(これらを「痛み活性化ニューロン」、「痛み特異的シナプス」と呼ぶ)のみを抽出し、解析することで、神経核同士の結合をまとめて解析する従来の手法では見出しえなかった機能特異的シナプス結合の特徴を明らかにしたことは学術的に新規性が高く、意義がある。また、近年提唱された、痛覚変調性疼痛の背景に、本研究で明らかにしたような痛み特異的シナプス伝達の可塑的变化が関与する可能性が示唆され、さらにメカニズム解明を継続することで中枢性の痛みの治療法開発に大きく寄与する知見が得られることが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to elucidate the brain mechanisms underlying plastic changes associated with chronic pain, an essential process of persistent pain. We employed an experimental approach called Fos-TRAP (targeted recombination in active populations) method, which allows the selective expression of artificial functional molecules in neurons that were specifically activated under certain conditions. By functionally labeling neurons that were activated during the early painful period among a diverse population of neurons, we analyzed their synaptic connections. In the spino(trigemino)-parabrachio-amygdaloid pathway, a pathway for nociceptive information to the brain, we found stronger functional connections between pain-activated neurons compared to that of non-specific synapses between neurons of the lateral parabrachial nucleus and central amygdala.

研究分野：神経科学

キーワード：扁桃体 腕傍核 活動依存的分発現 痛みの慢性化

1. 研究開始当初の背景

(1) 急性の痛みが傷害や損傷の結果として生じることから、3か月以上持続・反復する慢性痛もなんらかの障害の持続の結果ではないかと解釈され、それに基づき慢性痛の末梢機構の研究が長らく進められてきた。しかし、近年の痛み研究、特に、慢性痛患者を対象とした脳科学研究の結果、慢性の痛みの原因が脳内ネットワークの可塑的な変化にある事実が示された(図1)。2018年のICD-11には「一次性(原発性)慢性痛(primary chronic pain)」すなわち、線維筋痛症や非特異性腰痛などのように、明白な組織損傷や炎症がないにも関わらず痛みの訴えが続く病態が疾病分類として採り上げられた。また、組織損傷や炎症を伴う場合でも、痛みの訴えと障害の強さとの乖離が多く報告され、脳内の痛みネットワークの活動が痛みを大きく修飾する可能性が示されてきている。このような状況を反映し、国際疼痛学会は、侵害受容

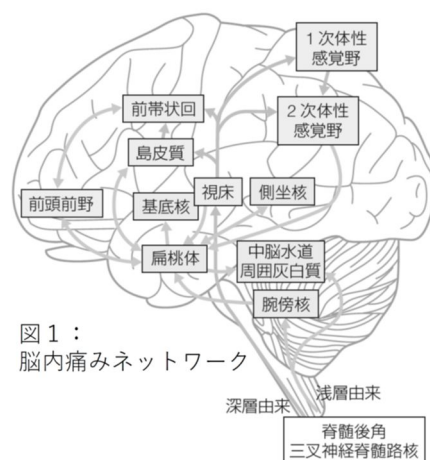


図1：
脳内痛みネットワーク

(nociceptive) や神経障害(neuropathic)などの末梢や侵害受容情報処理系の異常に加え、痛み神経機構の可塑的な変化によって生じる「nociplastic」という慢性痛の新たな発生機序を提案した。しかし、「慢性痛において、どのような脳内可塑性機構が、どのように痛みネットワークの活動を変え、あるいは活動に伴って変化し、痛みを生み出し、増強するのか」は未解明な点が多い。

(2) この問題に答える研究を行うにあたり、従来は方法論的困難があった。それは、図1の痛みネットワークを構成する神経核群のうち、痛みだけに特化した脳部位が存在しないこと、すなわち、各神経核が痛みだけではなく多様な機能に関与するニューロン群から構成されているということである。多様な機能を担う神経回路の中で、痛みニューロン、痛みシナプスだけを操作・解析してその慢性痛による変化を明らかにした研究はほぼない。

(3) そこで、研究代表者らは、近年開発・実用化されてきた神経活動依存的特異的分子発現法Fos-TRAP(targeted recombination in active populations)法を導入することにした。Fos-TRAP法は、特異的刺激で活性化し最初期転写因子c-Fosを発現するニューロン選択的にCreリコンビナーゼを発現させ、その細胞でCre依存的に機能分子の発現の誘導を可能にする。また、4-ヒドロキシタモキシフェン(4-OHT)投与タイミングで、Creリコンビナーゼの核内移行を調節し、特定の時間窓において活性化したニューロンに時間限局的に分子発現を行うことができる。この実験手法により、痛みによって活性化するニューロン(「痛み活性化ニューロン」と呼ぶ)の標識、および、痛み活性化ニューロン同士のシナプス伝達(これらを「痛み特異的シナプス」と呼ぶ)への機能的介入を行うことにより、痛みの慢性化におけるニューロン活動変化の解析が可能となると考えた。

2. 研究の目的

(1) 本計画では「慢性痛において、どのような脳内可塑性機構、具体的に、どの脳領域の、どのタイプのニューロン・シナプスが、どのように痛みネットワークの活動を変え、あるいは活動に伴って変化し、痛みを生み出し、増強するのか」という学術的に問いに答えることを目指し、中枢性感作を示す慢性痛モデルの痛みネットワーク、特に、研究代表者らが今までにその研究成果を報告し、重要な痛み回路として注目を浴びている外側腕傍核(LPB)-扁桃体中心核(CeA)-中脳水道周囲灰白質(PAG)疼痛制御システムが示す変化とその痛み行動に及ぼす影響を、ニューロン・シナプス・ネットワークの水準で答えることを本研究の目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) 上述のFos-TRAPシステムを保有するFosTRAP2マウスとCre依存的に赤色蛍光タンパクを発現するAi14マウスを交配し得られたFosTRAP2::Ai14マウスに対し、口唇部ホルマリン投与による局所炎症性侵害刺激を与え、痛みで活性化し最初期転写因子c-Fosを発現するニューロン選択的にCreリコンビナーゼを発現させた。ホルマリン刺激後数時間以内に4-OHTを腹腔内投与し、炎症性疼痛で活動増加したニューロン(痛み活性化ニューロン)を標識した。加えて、Cre依存的に光活性化チャネル(チャネルロドプシン(ChR2))を発現させるウイルスベクターをあらかじめLPBに局所微量投与しておき、痛み活性化LPBニューロンにおいてChR2を発現させた。比較対象として、ニューロンに非特異的に感染しChR2を発現させるウイルスベクターをLPBに局所微量投与した。これらのマウスから急性脳スライス標本作製し、痛み活性化ニューロン同士の「痛み特異的LPB-CeAシナプス伝達」と、機能非特異的LPB-CeAシナプス伝達をそれぞれ記録し比較した(図2)。

(2) (1)と同様に、FosTRAP2::Ai14 マウスに対し、あらかじめ CeA に Cre 依存的に興奮性人工受容体 (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs, DREADD) を発現させるウイルスベクターを局所感染させ、痛み活性化 CeA ニューロンを人工的に興奮させた際の機械性疼痛閾値を評価した。

(3) (1)と同様に、FosTRAP2::Ai14 マウスに対し、あらかじめ CeA に Cre 依存的に黄色蛍光タンパクを発現させる逆行性ウイルスベクターを局所感染させ、CeA に炎症性侵害刺激情報を伝える上流の痛み活性化神経核を探索した。

4. 研究成果

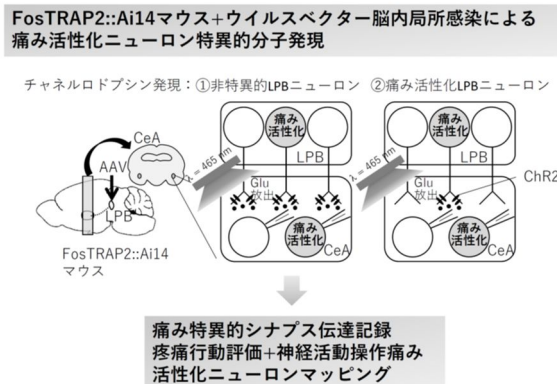
(1) 局所炎症刺激による LPB、CeA ニューロンの痛み活性化ニューロンの分布と投射：ホルマリン局所投与マウスでは、対象群 (生理食塩水局所投与マウス) に比べ、LPB、CeA とともに、赤色蛍光タンパクでラベルされた痛み活性化ニューロンが多く観察された。CeA 内では、CeM, CeL, CeC (medial, lateral and capular part of the CeA) の3つの部位の中で、CeC において最も多く痛み活性化ニューロンが分布し、その部位には、痛み活性化 LPB ニューロン軸索終末が、最も密に投射していた。このことから、痛み活性化 CeA ニューロン数は侵害刺激による LPB からの入力に依存する可能性が考えられる。また、CeA 内の痛み活性化ニューロンの分布は吻尾レベルによって発現部位が異なり、CeA 内に侵害受容情報を入力する経路が LPB 以外にも存在する可能性が示唆された。

(2) 痛み特異的シナプス伝達の有無の検証：痛み活性化 LPB ニューロン 痛み活性化 CeA ニューロン間のシナプス伝達と、非特異的 LPB ニューロン - 痛み活性化 CeA ニューロン間のシナプス伝達を比較し、前者のシナプス後電流の振幅の方が後者よりも大きい事実が見出された。痛み活性化ニューロン同士のシナプス伝達で大きな振幅が観察された背景機構として、もともと機能的つながりの強いシナプス結合をもつ LPB、CeA ニューロンが存在し、それらが炎症性侵害受容情報入力を受けて活動した可能性、および、一度炎症性侵害受容情報を伝達した LPB-CeA シナプスで可塑的变化が生じそれが固定化された可能性がある。痛み特異的シナプス伝達の強い機能的結合の背景機構を明らかにするために、追加の炎症刺激介入によって同シナプス伝達がどのような影響を受けるかを調べた。口唇部局所炎症での活性化ニューロンを標識した後、2週間以上経過した時点で、急性脳スライス標本作製前日にホルマリン足底投与による局所炎症 (局所炎症追加群) または、リボ多糖 (0.5 mg/kg i.p.) による全身炎症 (全身炎症追加群) を惹起し、痛み特異的シナプス伝達を記録した。それらの比較の結果、痛み活性化ニューロン同士の LPB-CeA 興奮性シナプス伝達は、局所炎症追加群と全身炎症追加群で異なる変化を示した。その差異の背景として、LPB-CeA 経路における各刺激活性化ニューロンのポピュレーションの違いや、興奮性入力 GABA 作動性ニューロンで構成される CeA 抑制性回路の活動に与える影響の違いなどが考えられる。今後 CeA の抑制性局所回路に焦点を当てたさらなる解析が必要である。また、CeA からの下行性疼痛制御系への出力として PAG への投射に計画当初注目していたが、計画期間中は LPB-CeC シナプス伝達に着目したことから、CeC ニューロンは直接 PAG へ出力するよりも、CeA 内の局所回路情報処理を受けた後に PAG へ出力する可能性が高いため単シナプス性投射を介した LPB-CeA-PAG 回路は解析対象としなかった。今後 PAG などへの多シナプス性出力も含め、LPB-CeA 痛み特異的シナプス伝達増強が、疼痛閾値制御ネットワークへ与える影響を解析していく必要がある。

(3) 痛み活性化ニューロンの人工的活性化による疼痛閾値への影響：口唇部炎症刺激を受けたマウスは、刺激後数時間~10日程度の間、中枢性疼痛制御系の活動を背景とする異所性痛覚過敏が生じる。そこで、口唇部炎症刺激による異所性痛覚過敏が生じている時に活性化した、痛み活性化 CeA ニューロンに興奮性 DREADD 受容体(hM3Dq)を発現させ、数週間後、特異的リガンド deschloroclozapine (DCZ) により DREADD 受容体発現ニューロンを興奮させ、後肢における機械性疼痛閾値を評価した。その結果、口唇部炎症を惹起した場合と同様に後肢機械性疼痛閾値が低下する傾向が観察された。また、DCZ 投与によって疼痛閾値低下以外の自発行動も誘導されたため、ウイルス感染部位の限局性、および、痛み活性化ニューロンが関与する痛覚過敏以外の他の行動表現型の検討が必要である。

(4) 痛み活性化 CeA ニューロンの上流神経核の探索：口唇部炎症刺激による CeA での c-Fos の

図2：痛み活性化ニューロン特異的分子発現を利用した研究戦略



発現が BLA での c-Fos 発現と相関が高い事実（研究代表者共著者論文 Miyazawa et al., Mol pain 2018）および、CeC 以外の CeA 部位でも痛み活性化ニューロンが観察された事実（研究成果 (1)）を受け、LPB 以外の侵害受容情報伝達経路を探索するため、逆行性ウイルスベクターを用い CeA に炎症性侵害受容情報を伝える痛み活性化ニューロンの分布を Fos-TRAP 法で標識した。LPB 以外にも島皮質や室傍核などの数か所の脳部位で密な痛み活性化ニューロンの発現が観察された。これらの脳部位からの侵害受容情報が CeA に収束している可能性がある。

(5) 本課題で得られた成果を現在論文化しており、2023 年中には学術誌において公表する予定である。また、本研究期間では、COVID-19 関連対応により、トランスジェニックマウスの供給の滞りなどが生じ、当初計画していた CeA ネットワーク活動解析については報告しうる成果がまだ得られていない。今後、痛み活性化ニューロンの活動や痛み特異的シナプス伝達が CeA 内・CeA 外とのネットワーク活動にどのような経時的影響を与えるかに焦点を当て、詳細な解析を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Suzuki J, Nagase M, Sato N, Takahashi Y, Okamoto A, Kato F.	4. 巻 113
2. 論文標題 Delivery-Dependent Shift in Oxytocin-Responsive Cell Population in the Central Amygdala of the Female Rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroendocrinology	6. 最初と最後の頁 48-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000525860	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 Matsushita T, Otani K, Oto Y, Takahashi Y, Kurosaka D, Kato F.	4. 巻 23
2. 論文標題 Sustained microglial activation in the area postrema of collagen-induced arthritis mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Arthritis Res Ther.	6. 最初と最後の頁 273
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13075-021-02657-x	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 Yamamoto S, Takahashi Y, Kato F.	4. 巻 10
2. 論文標題 Input-dependent synaptic suppression by pregabalin in the central amygdala in male mice with inflammatory pain.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurobiol Pain.	6. 最初と最後の頁 100078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ynpai.2021.100078.	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 Tokunaga R, Takahashi Y, Touj S, Hotta H, Leblond H, Kato F, Piche M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Attenuation of widespread hypersensitivity to noxious mechanical stimuli by inhibition of GABAergic neurons of the right amygdala in a rat model of chronic back pain.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Eur J Pain.	6. 最初と最後の頁 911-928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ejp.1921.	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

1. 著者名 Yajima M, Sugimoto M, Sugimura YK, Takahashi Y, Kato F.	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 109029
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 Sugimoto M, Takahashi Y, Sugimura YK, Tokunaga R, Yajima M, Kato F.	4. 巻 Publish Ahead of Print
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 1-14
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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Okuda T, Uchiyama S, Sato N, Takahashi Y, Kato F.
2. 発表標題 The structures that excite the central amygdala neurons and pain network in orofacial inflammatory pain
3. 学会等名 FENS Forum 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takahashi Y, Okuda T, Uchiyama S, Kato F.
2. 発表標題 Upstream regions underlying central amygdala activation in inflammatory pain
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋由香里, 矢島愛美, 杉本真理子, 宮沢祐太, 内山瑛和子, 奥田崇雄, 加藤総夫.
2. 発表標題 広汎性痛覚過敏を生み出す扁桃体可塑的变化
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 高橋由香里
2. 発表標題 口唇部炎症による慢性痛の成立過程における 扁桃体の関与と意義
3. 学会等名 第25回日本口腔顔面痛学会総会・学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋由香里
2. 発表標題 腕傍核-扁桃体システムによる内臓感覚情報処理機構
3. 学会等名 第126回日本解剖学会総会・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 奥田崇雄, 徳永亮太, 杉村弥恵, 高橋由香里, 加藤総夫
2. 発表標題 侵害受容情報特異的な腕傍核-扁桃体投射のfunctional synaptomics
3. 学会等名 第250回生理学東京談話会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 杉村弥恵, 奥田崇雄, 高橋由香里, 加藤総夫 (編集: 平井宏和, 日置寛之, 小林和人)	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 281
3. 書名 決定版 ウイルスペクターによる遺伝子導入実験ガイド: 培養細胞から個体まで、研究を飛躍させる実践テクニックのすべて	

〔産業財産権〕

〔その他〕

慈恵医大 総合医科学研究センター 神経科学研究部 http://www.jikei-neuroscience.com/website/

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
研究協力者	加藤 総夫 (KATO FUSAO) (20169519)	東京慈恵会医科大学・神経科学研究部・教授 (32651)	
研究協力者	奥田 崇雄 (OKUDA TAKAO)	東京慈恵会医科大学・神経科学研究部・研究生 (32651)	
研究協力者	内山 瑠和子 (UCHIYAMA SAWAKO)	九州大学・大学院薬学研究院薬理学分野・大学院生 (17102)	

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