

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18079

研究課題名（和文）生理活性物質・神経回路・加齢の視点からのアプローチによる慢性疼痛メカニズム解明

研究課題名（英文）Elucidation of chronic pain mechanism by approach from physiologically active substances, neural circuits and aging

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛において、大脳辺縁系を含む中枢神経系の変化は情動面の恐怖や不安という感情にも関与しており重要な領域であるとされている。今研究の目的は、加齢に伴い増加する慢性疼痛のメカニズムが、末梢組織から放出される炎症性サイトカインならびにマトリックスプロテアーゼ（MMP）をはじめとする生理活性物質により、中枢神経領域（特に慢性疼痛に関与する領域）における神経可塑性変化ならびに下行性疼痛抑制系（特に視床下部オキシトシン系に着目）の低下との関連について、ホールセル・パッチクランプ法を用いて検討し、その分子基盤の一部を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会の日本において、運動器の慢性変性疾患を扱う整形外科医にとって、日常診療の中で骨粗鬆症ならびに変性疾患に伴う慢性疼痛患者といかに向き合うかというのは大きなテーマの一つである。近年、骨粗鬆症ならびに変性疾患の病態として持続性慢性炎症説があり、注目を集めているが、これらの慢性炎症性物質と慢性疼痛のメカニズムの関与については不明な点が多い。今研究では加齢に伴い増加する慢性疼痛の機序が、大脳辺縁系領域での神経可塑性変化にて来たすこと、また神経ペプチドを中心とする下行疼痛抑制系の低下にて来たす可能性があることを報告した。

研究成果の概要（英文）：In chronic pain, changes in the central nervous system, including the limbic system, are considered to be an important area involved in emotions such as fear and anxiety. In this study, we investigated the mechanism of chronic pain, which increases with age, in relation to neuroplastic changes in the central nervous system (especially in areas involved in chronic pain) and descending pain inhibiting pathway (especially the hypothalamic oxytocin system) by means of bioactive substances such as inflammatory cytokines and matrix proteases (MMPs) released from the peripheral tissues. We investigated the relationship between the neuroplasticity in the central nervous system (especially in areas involved in chronic pain) and the decrease in the descending pain inhibiting pathway (with a particular focus on the hypothalamic oxytocin system) by using the Whole Cell Patch Clamp technique, and clarified part of the molecular system of this relationship.

研究分野：Chronic pain

キーワード：慢性疼痛 神経可塑性 視床下部 オキシトシン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会になった日本において、整形外科医にとって日常診療の中で骨粗鬆症ならびに変性疾患に伴う慢性疼痛患者といかに向き合うかというのは大きなテーマの一つである。近年、骨粗鬆症ならびに変性疾患の病態として持続性慢性炎症説があり、注目を集めているが、これらの慢性炎症性物質と慢性疼痛のメカニズムの関与については不明である。

加齢と共に慢性疼痛が増加する原因を細胞レベルで考えると、不可逆的に分裂が停止した老化細胞は、IL-1, 6 等の炎症性サイトカインや MMP といった生理活性物質が放出されており、これらの生理活性物質が一つの要因として考えられる。骨粗鬆症モデルである卵巣結紮モデルラットにおいては、骨芽細胞からの IL-1, 6、TNF- α 等の炎症性サイトカインが放出されていると報告がある。また変形性膝関節症においては、関節軟骨が剥がれ、浮遊する微細細片が分子ダメージ関連分子パターン (DAMPs) となって炎症が始まり、IL-1, 6, 8、TNF- α などの炎症性サイトカインが追加され、組織の破壊が進行していくと報告されている。組織の持続性の慢性炎症については、整形外科が扱う疾患に特異的な状態ではなく、生活習慣病においても同様に報告されており、慢性炎症を引き起こす誘因の多くは非感染性 (無菌性炎症) と考えられており、組織傷害により細胞外に放出される DAMPs が自然免疫系の病原体センサーにより認識され、炎症シグナルを活性化するとされる。これらの炎症シグナルと慢性疼痛の機序について理解することは、高齢者に対する疼痛治療を考える上で重要であると考えられる。現在、骨粗鬆症に対して使われているビスフォスフォネート製剤は破骨細胞に吸収され骨吸収抑制作用を有していることは知られている。一方、近年 IL-1, 6 等の炎症性サイトカインの放出を抑制することで、疼痛閾値にも関与していると報告があるが、中枢神経系を含めた慢性疼痛の機序の関与については十分検討されていない。従って、今研究では加齢に伴い増加する慢性疼痛の機序が末梢組織から放出される生理活性物質を要因として、以下の二つの仮説を立て検証する。一つ目は大脳辺縁系領域での神経可塑性変化を来すことである。また、二つ目は神経ペプチドを中心とする下行疼痛抑制系の低下である。前者については、神経可塑性変化モデルである長期増強 (Long Term Potentiation ; LTP) システム (Bliss et al., 1993) に着目する。LTP は、これまで神経の可塑性のモデルとして、分子基盤を解明するために使用されてきた。LTP 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の大脳辺縁系でも引き起こされ、特に前帯状回領域にて LTP 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る。近年、記憶・学習を司る海馬において、炎症性生理活性物質に対する神経可塑性について検討されているが、大脳辺縁系領域での検討は少ない。後者については、これまでの私の研究生活で着目してきた下垂体後葉ホルモンであるオキシトシン (OXT) に着目する。私は、急性・慢性の侵害受容時における OXT の合成増加に伴い、視床下部 脊髄への投射増加について大学院時代に報告してきた (Matsuura et al., 2015, 2016)。近年、OXT が老化に伴う骨格筋の減少に関与すると報告されている (Eland et al., 2013) が、これまでに老化に伴い増加する生理活性物質が OXT の合成低下を来し、痛覚閾値の変化を引き起こすとする報告はない。

2. 研究の目的

慢性疼痛において、大脳辺縁系を含む中枢神経系の変化は情動面の恐怖や不安という感情にも関与しており重要であるとされている。今研究の目的は、加齢に伴い増加する慢性疼痛のメカニズムが、末梢組織から放出される炎症性サイトカインならびにマトリックスプロテアーゼ (MMP) をはじめとする生理活性物質により、中枢神経領域 (特に慢性疼痛に関

与する領域)における神経可塑性変化ならびに下行性疼痛抑制系の低下との関連についての分子基盤をホールセル・パッチクランプ法を用いて解明することが、本研究課題の核心をなす学術的「問い」である。

3. 研究の方法

(1)前帯状回での LTP に対する、骨代謝産物ならびに炎症性生理活性物質の薬理的検討を行うために、スライスでのホールセル・パッチクランプ法にて検討を行う。具体的には、ラットの頸椎脱臼後、脳をすみやかに取り出し、電動スライサーを用いて、前帯状回を含むスライス切片を作成する。人工脳脊髄液灌流下で、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、骨代謝産物ならびに炎症性生理活性の薬理的な作用について検討する。まずは炎症性の生理活性物質として知られている、MMP に着目する。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、この電極を通して神経細胞に LTP を誘発させる刺激を行う。MMP については阻害薬も使用し、チャンバーへの還流によりこれらの神経細胞の LTP に影響を及ぼす影響について解析する。影響を及ぼした薬物については、細胞内シグナリングについても検討した。

(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室傍核を含む 300 μ M 脳スライス切片を作製した。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、(興奮性・抑制性)シナプス応答(電流)を記録・解析した。まずは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上で、自発性(興奮性・抑制性)シナプス応答(電流)も記録した。最終的に、LTP の起こるシグナル経路についても検討した。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 LTP についても検討を行なった。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、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、OXT-mRFP1 ニューロンに対して LTP の誘発を行った。

(3)上記と同様の手技で視床下部視索上核を含む 300 μ M 脳スライス切片を作製し、室傍核と同様の反応を引き起こすか確認した。無治療群ラットの脳スライスにて視索上核の外側に刺激電極を置き、OXT-mRFP1 ニューロンにおける誘発興奮性シナプス電流を記録した。さらに電気刺激による OXT-mRFP1 ニューロンにおける Long-term depression (LTD) の誘発の有無について検討した。

4. 研究成果

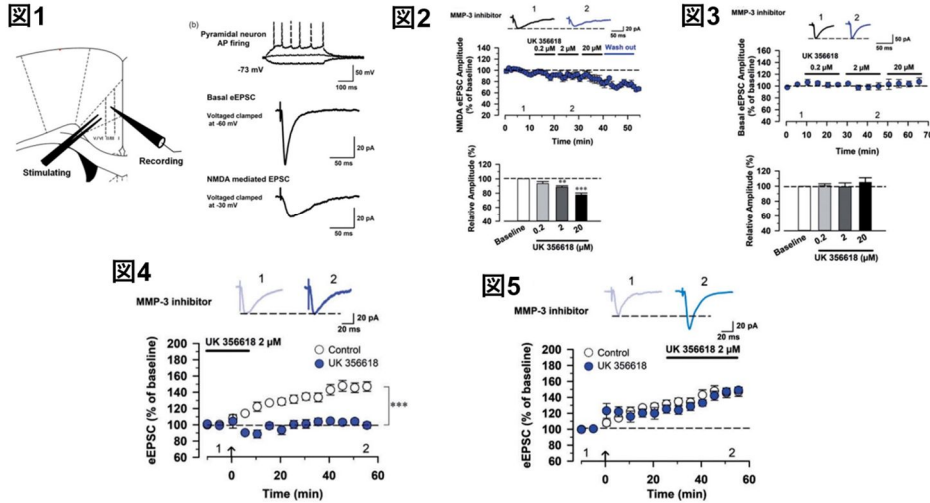
(1)C57BL/6 マウスから、脳スライスでのホールセル・パッチクランプ法にて前帯状回皮質構造 / 領域のニューロンから記録した(図 1、右上)。次に刺激電極を前帯状回皮質構造の / 領域に置き、前帯状回領域の錐体細胞から誘発興奮性シナプス電流の記録を行った。錐体細胞から NMDA 興奮性シナプス応答・電流(excitatory postsynaptic current; EPSC)を記録し、MMP-3 inhibitor (UK 356618)をチャンバー内に還流させると、濃度依存的に eEPSC が優位に減少することが明らかとなった(図 2)。次に誘発性興奮性シナプス応答・電流(excitatory postsynaptic current; EPSC)を記録したが、MMP-3 inhibitor (UK 356618)は、eEPSC には変化がみられなかった(図 3)。

長期増強 (Long-term potentiation; LTP) を誘発させる Paring-protocol と呼ばれる特殊な刺激を行った上で MMP-3 inhibitor (UK 356618) を灌流させ、LTP への影響を確認した。結果、MMP-3 inhibitor (UK 356618) が LTP 導入には変化を与えなが、LTP の維持には変化がないことを明らかとなった (図 4, 5)

図1 前帯状回領域において錐体ニューロンからスライスパッチ法にて記録した模式図、

図2 eEPSCにおけるMMP-3 inhibitorの影響、 図3 NMDA受容体を介したEPSCにおけるMMP-3 inhibitorの影響、

図4 LTP導入期に対するMMP-3 inhibitorの影響、 図5 LTP維持期に対するMMP-3 inhibitorの影響



(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、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、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、monosynaptic な反応であるかを確認した(図 6)。Paring-protocol により、OXT-mRFP1 ニューロンの LTP が誘発されることを確認後、自発性興奮性・抑制性シナプス電流の経時変化を確認した (図 7)。結果、刺激後は一時的に EPSC の頻度は増えるが、刺激 10 分後から徐々に振幅の有意な増加が認められた。OXT-mRFP1 ニューロンにおける post-LTP は NMDA 受容体阻害薬である D-AP5、PKA 阻害薬である KT 5720、細胞内 Ca キレート剤阻害薬である BAPTA は、LTP の誘発・導入に関与すること (図 8) また NO 合成酵素阻害薬である L-NAME は、post-LTP の維持に関与していることを明らかにした(図 9)。NO 合成酵素阻害薬の反応については、NMDA 受容体に非依存性であることを確認した(図 10)

図6 視床下部・室傍核OXT-mRFP1ニューロンから誘発性EPSCを記録した模式図、

図7 OXT-mRFP1 ニューロンにおけるLTP誘導確認と誘導時の自発性EPSCならびにIPSCの経時変化、

図8 OXT-mRFP1 ニューロンにおけるLTP誘導に関する細胞内シグナリングの検討について

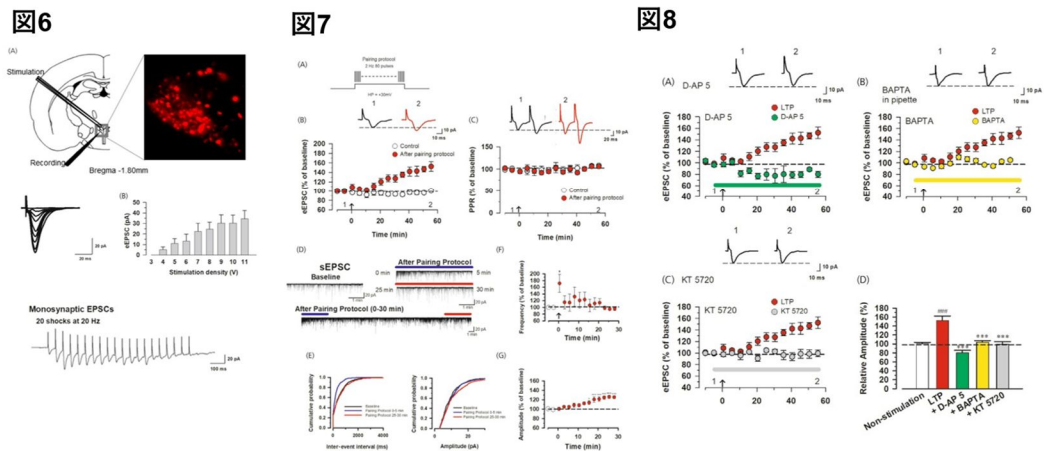
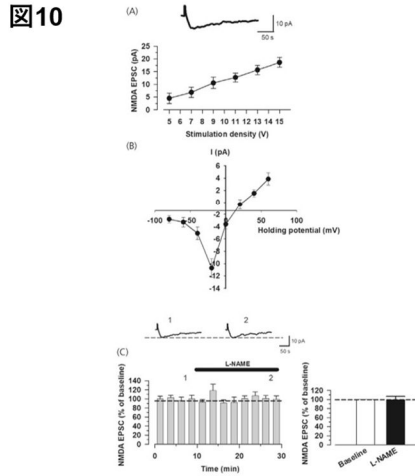
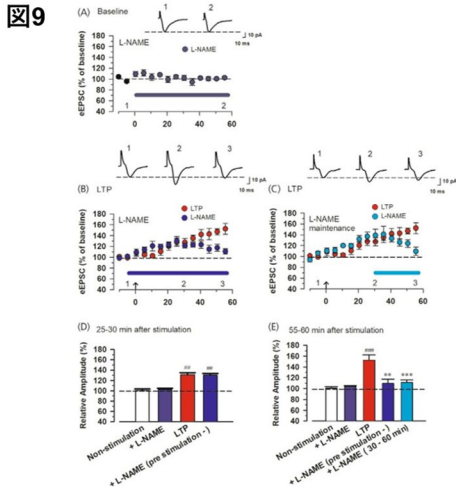


図9 視床下部・室傍核OXT-mRFP1におけるLTP誘導・維持に関するNOS合成酵素阻害薬の検討

図10 NO合成酵素阻害薬に対するOXT-mRFP1ニューロンにおけるNMDA受容体を介したEPSCの変化



(3) 慢性炎症性疼痛モデルであるアジュバント関節炎ラット群では、OXT-mRFP1ニューロンにおいてLTPは誘発されなかった(図11)。よってOXT-mRFP1ニューロンでparing-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(図12)。またアジュバント関節炎ラット群では、OXTの合成が亢進しているモデルであることから、視床下部OXTニューロンでのLTPが、OXT合成亢進を表現している可能性が示唆された。視床下部・視索上核(SON)OXT-mRFP1ニューロンにおいても、同様の刺激でLTPが誘発するかを検討したところ、LTPが誘発されることを確認した(図13)。最後に、OXT-mRFP1ニューロンでのLong-term depression(LTD)についても検討した。つまりオキシトシンニューロンの合成抑制時のメカニズムを検討である。いくつかの刺激プロトコルを検討した結果、1Hz、300回、(細胞内に)-40mVの刺激を与えることで、OXT-mRFP1ニューロンにおいてLTDを引き起こすことを明らかにした(図14)。

図11 アジュバント関節炎ラット群における視床下部OXT-mRFP1ニューロンのLTPの誘導の有無について

図12 視床下部OXT作動性ニューロンにおけるLTPとラット慢性炎症モデルの関係性について(モデル)

図13 視床下部・視索上核OXT-mRFP1ニューロンにおけるLTPの誘導の有無について

図14 視床下部・室傍核OXT-mRFP1ニューロンにおけるLTD誘導について

図11

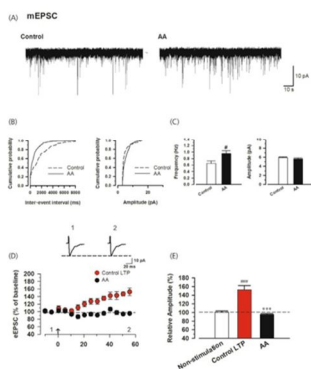


図12

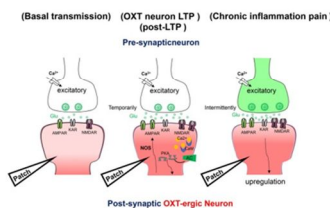


図13

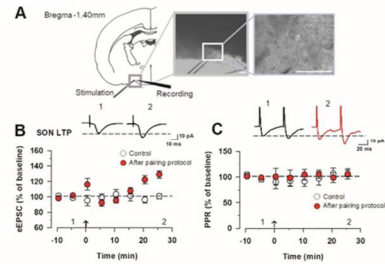
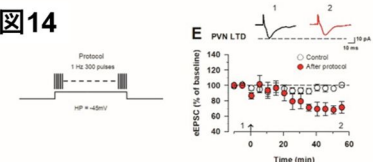


図14



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 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Xu-Hui Li, Takanori Matsuura, Man Xue, Qi-Yu Chen, Ren-Hao Liu, Jing-Shan Lu, Wantong Shi, Kexin Fan, Zhaoxiang Zhou, Zhuang Miao, Jiale Yang, Sara Wei, Feng Wei, Tao Chen, Min Zhuo	4. 巻 36(3)
2. 論文標題 Oxytocin in the anterior cingulate cortex attenuates neuropathic pain and emotional anxiety by inhibiting presynaptic long-term potentiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 109411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109411	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 Teruaki Fujitani, Takanori Matsuura, Makoto Kawasaki, Hitoshi Suzuki, Haruki Nishimura, Kazuhiko Baba, Yoshiaki Yamanaka, Hideo Ohnishi, Yoichi Ueta, Akinori Sakai	4. 巻 Jul 19
2. 論文標題 Presynaptic glutamatergic transmission and feedback system of oxytocinergic neurons in the hypothalamus of a rat model of adjuvant arthritis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806920943334	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 Takanori Matsuura, Makoto Kawasaki, Hitoshi Suzuki, Teruaki Fujitani, Kazuhiko Baba, Haruki Nishimura, Naofumi Ikeda, Yoshiaki Yamanaka, Manabu Tsukamoto, Yosuke Yoshimi, Hideo Ohnishi, Yoichi Ueta, Akinori Sakai	4. 巻 Sep 30.
2. 論文標題 Nitric oxide synthase contributes to the maintenance of LTP in the oxytocin-mRFP1 neuron of the rat hypothalamus	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Neuroendocrinol .	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jne.13340	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takanori Matsuura, Youhei Yoshimi, Shiho Takahashi, Nami Tanaka, Hanae Morinaga, Asuka Hayata, Minami Onishi, Yousuke Nagano, Hideo Ohnishi
2. 発表標題 Limitations of self-report tools in pain evaluation with acute osteoporotic vertebral fractures
3. 学会等名 IASP World Congress on Pain（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦 孝紀
2. 発表標題 Nitric oxide contributes to the maintenance of LTP in the oxytocin-mRFP1 neuron of the rat hypothalamus
3. 学会等名 第43回 日本疼痛学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦 孝紀、藤谷 晃亮、川崎 展、鈴木 仁士、西村 春来、馬場 一彦、山中 芳亮、大西 英生、上田 陽一、酒井 昭典
2. 発表標題 アジュバント関節炎モデルラットにおける視床下部オキシトシン作動性ニューロンでのシナプス前グルタミン酸作動性伝達ならびにフィードバックシステム
3. 学会等名 第42回日本疼痛学会
4. 発表年 2021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
---------	---------