

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 14 日現在

機関番号：63905
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011 ~ 2012
 課題番号：23790653
 研究課題名(和文) 慢性疼痛における一次体性感覚野出力細胞の可塑的变化とその生理学的意義の解明
 研究課題名(英文) The role of plastic change of the primary somatosensory cortical output neurons in chronic pain
 研究代表者
 江藤 圭 (ETO KEI)
 生理学研究所・発達生理学研究室・NIPS リサーチフェロー
 研究者番号：30545257

研究成果の概要(和文): 本研究は、一次体性感覚野(S1)第2/3層興奮性神経細胞の慢性疼痛における役割を明らかにすることを目的とする。慢性疼痛時には、S1の2/3層興奮性細胞活動が可塑的变化により亢進し、別の疼痛領域である前帯状回の活動を亢進させることで疼痛行動が誘発されることを明らかにした。さらに、S1抑制性細胞活動亢進により興奮性細胞活動に対する抑制力が増強するものの、その活動を完全に抑制するには不十分であることも明らかにした。

研究成果の概要(英文):

Chronic pain is induced by exaggerated neuronal activities in the central nervous system. In the present study, we found that the hyperactivities of L2/3 excitatory neurons in the S1 contribute to enhancement of neuronal activities in the anterior cingulate cortex, which in turn induce chronic pain behavior. In addition, we found that inhibitory neuronal activities increased in the S1 and inhibitory effect increased in chronic pain condition. However, the inhibitory effect was insufficient to alleviate exaggerated excitatory activities and chronic pain behavior. This study may shed light on the central mechanisms of chronic pain and provide a new efficient therapeutic strategy against chronic pain by focusing on cortical areas.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：慢性疼痛, 2光子顕微鏡, 体性感覚野, カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は末梢組織の炎症や末梢神経系の損傷がきっかけとなって生じ、その発生・維持過程に脊髄を含む中枢神経系の異常が関与していることが示唆されている。大脳皮質において、侵害刺激に対して複数の領域が応答し、慢性疼痛時にはこれらの脳領域活動が亢進することが機能的MRIを用いた研究で明らかにされ(Moisset and Bouhassira, 2007)。単一の脳領域のみならず、複数の脳領域間の

相互作用も慢性疼痛処理に關与する可能性が示唆されている。大脳皮質の中でも一次体性感覚野は痛みの強度、部位、刺激時間を認知するのに重要な役割を担っており、慢性疼痛時には、触刺激で誘発される大脳皮質活動が亢進することがfMRIを用いた研究で明らかになっている(Endoら, 2008)。S1の中でも第2/3層興奮性神経細胞S1領域は、視床から第4層(L4)を経て伝達された末梢からの痛み情報を、S1第5層細胞や、他の大脳

皮質領域へと伝達する。そのため、S1 第 2/3 層興奮性神経細胞は感覚情報の処理、統合、伝達(出力)において重要な役割を担っており、慢性疼痛時にこの神経細胞活動が変化すると、他の痛み処理に關与する皮質領域の活動や慢性疼痛行動に影響することが考えられる。しかし、S1 の 2/3 層興奮性細胞がどのように慢性疼痛行動を制御しているのかは全く分かっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は S1 の 2/3 層興奮性神経細胞がどのように慢性疼痛行動を制御するのかを明らかにすることを目的として、興奮性細胞がどのように疼痛行動を制御するのかを S1 以外の疼痛領域 (ACC) との相互作用に着目した。

3. 研究の方法

(1)慢性疼痛モデルは完全フロイントアジュバント(CFA)をマウス足裏に投与し作成した。(2)神経細胞活動は 2 光子顕微鏡を用いてウレタン麻酔下マウスの一次体性感覚野から感覚刺激誘発カルシウム応答を測定した。(3)痛み行動は von frey filament に対する後足の逃避閾値を指標に測定した。(4)フィールド応答は麻酔下マウスの ACC より足刺激によって誘発し記録した。(5)シナプス応答は急性脳スライス標本を用いてホールセルパッチクランプ法を用いて測定した。

4. 研究成果

本研究課題では申請内容の研究(1)に加えて S1 興奮性細胞活動を制御する抑制性細胞がどのように慢性疼痛行動に關与するかについても明らかにした(2)。

(1)慢性疼痛における S1 2/3 層興奮性細胞の ACC を介した疼痛行動制御機構

CFA 投与によりマウスはアロディニア行動を惹起した。慢性疼痛マウスの S1 2/3 層興奮性神経細胞の活動は正常マウスよりも亢進していた。スライス標本で 4 層刺激誘発興奮性シナプス後電流 EPSC を 2/3 層錐体細胞から記録すると、EPSC 応答の振幅が増大し、シナプス伝達の指標であるペアードパルス比が変化していた。このことから慢性疼痛時には S1 内で可塑的变化が起き、興奮性細胞の過剰活動に貢献することがわかった。次にこの活動が疼痛行動をどのように制御するかを調べるために、S1 神経活動を抑制し疼痛行動を測定した。S1 にグルタミン酸受容体阻害剤(CNQX)を局所投与すると、正常群では影響がない濃度において、疼痛群では顕著に疼痛行動が減弱した。このことから S1 興奮性神経活動が疼痛行動を誘発することがわかった。S1 の 2/3 層神経細胞が疼痛行動を誘発する機序として、S1 と他の疼痛関連皮質領域

ACC との関係に着目した。ACC は痛みの情動に關与し、慢性疼痛の発現に重要である可能性があると考えられている。ACC より足刺激誘発フィールド電位を測定すると正常群より疼痛群で応答が増大していた。疼痛群において、S1 に CNQX を局所投与し興奮性細胞の過剰活動を抑制すると、ACC のフィールド電位が減少した。これらの結果から慢性疼痛時には S1 の 2/3 層興奮性細胞活動が亢進し、ACC 神経活動を増大させることで疼痛行動が惹起されることが明らかになった。この結果は 2011 年の Journal of Neuroscience に報告し (Eto ら, 2011) 同誌 Journal Club において他のグループにより紹介された (Yi and Zhang, 2011)。また Neural plasticity 誌の review でも紹介している (Kim, Eto ら, 2012)。(2)慢性疼痛に対する S1 抑制性神経細胞の役割

大脳皮質に存在する神経細胞は大きく興奮性と抑制性細胞に分けられる。(1)では S1 興奮性細胞の慢性疼痛に対する役割について調べてきたが興奮性細胞活動を制御する抑制性細胞活動が慢性疼痛時にどのように変化し、疼痛行動にどう關与するのか全く分かっていない。そこで、(1)と同様の手法を用いて抑制性細胞についても調べた。

2 光子顕微鏡を用いた in vivo カルシウムイメージングにより、慢性疼痛時には感覚刺激で誘発される抑制性細胞の活動は正常群よりも増大していることがわかった。興奮性細胞への抑制力を調べるために GABA 受容体阻害剤存在下 (SR95531, 0.6 μM) でカルシウム応答を観察した。SR95531 によって生じるカルシウム応答の増加の程度は正常群よりも疼痛群のほうが大きかった。この結果は S1 抑制性細胞による興奮性細胞活動に対する抑制力が正常群よりも疼痛群において亢進していることを示唆していた。また、SR95531 (0.6 μM) の S1 への局所投与は正常群の疼痛閾値に影響しないが、疼痛群の痛み行動を亢進させた。このことから抑制力の増大が示唆された。慢性疼痛時には S1 において興奮性細胞活動に対する抑制力が増大するにもかかわらず、興奮性細胞過剰活動を抑制できていないことが考えられる。その機序として、2/3 層抑制性細胞から 2/3 層興奮性細胞への抑制性シナプス伝達に着目した。しかし、スライス標本を用いて抑制性シナプス応答を測定したが、正常群と疼痛群で変化が見られなかった。このことから 2/3 層興奮性細胞への 2/3 層抑制細胞からのシナプス伝達は変わらないことがわかった。もう一つの機序として細胞内クロライドに着目した。GABA の抑制力は細胞内クロライドにより調節されているおり、クロライドはカリウム-クロライド共輸送隊 (KCC2) により制御される。KCC2 の減弱が GABA 抑制力を減らすことがわ

かっている。そこで、疼痛群の S1 興奮性細胞において、細胞内クロライド濃度が変化しているかどうかを見るためにグラミシジンパッチクランプ法を用いて GABA の平行電位 (E_{GABA}) を測定した。その結果、疼痛群において E_{GABA} が正常群よりも正の向きにシフトしていた。このことは、疼痛群において細胞内クロライド濃度が高くなっていることを示しており、KCC2 の機能が落ちていることを示唆す。またウエスタブロット法で KCC2 の蛋白量が減弱していることも確認した。以上、これらの結果から、慢性疼痛時の S1 において、抑制性細胞の活動が亢進し、その抑制力が増大するが、KCC2 発現が減るため GABA 抑制効果が弱められ、結果として興奮性細胞の過剰活動を完全には抑制できず、疼痛行動を抑制できないことが明らかになった。この成果は現在 Journal of Neuroscience 誌に掲載予定である (Eto ら, in press)。

以上(1)、(2)の結果は炎症惹起物質によって誘発される慢性疼痛において、S1 の興奮性細胞がどのように疼痛行動を誘導するかを詳細に示している。これらの研究は皮質間相互作用、皮質内興奮 抑制バランスと行動調節機構の観点から基礎医学に重要な知見であるとともに、慢性疼痛の治療においても体性感覚野に着目した新たな治療法の確立の一助となりうると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Moorehouse A, Ikenka K, Nabekura J. Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex coupled with reduced potassium-chloride cotransporter function is insufficient to alleviate chronic pain behavior. J Neurosci. 2012;32(47):16552-16559 査読有

(2) Kim SK, Eto K, Nabekura J. Synaptic Structure and Function in the Mouse Somatosensory Cortex during Chronic Pain: In Vivo Two-Photon Imaging. Neural Plast. 2012;2012:640259. 査読有

(3) Eto K, Kim SK, Nabekura J, Ishibashi H. Tltirelin, a thyrotropin-releasing hormone analog, alleviates mechanical allodynia through activation of descending monoaminergic neurons in persistent inflammatory pain. Brain Res. 2011; 1414:50-57. 査読有

(4) Eto K, Wake H, Watanabe M, Ishibashi H, Noda M, Yanagawa Y, Nabekura J. Inter-regional Contribution of Enhanced Activity of the Primary Somatosensory Cortex to the Anterior Cingulate Cortex Accelerates Chronic Pain Behavior. J Neurosci. 2011;31(21):7631-7636. 査読有

〔学会発表〕(計 5 件)

(1) 鍋倉 淳一、江藤 圭、金 善光. 慢性疼痛に伴う大脳皮質体性感覚野神経回路再編. 第 89 回日本生理学会大会 松本 2012 Mar. 30 (シンポジウム)

(2) 江藤 圭, 鍋倉 淳一. 一次体性感覚野における慢性疼痛メカニズムの解明. 第 21 回神経行動薬理若手研究者の集い. 京都. 2012 Mar. 13 (シンポジウム)

(3) Sun Kwang Kim, Kei Eto, Tatsuya Ishikawa, Junichi Nabekura. Phase-specific remodeling of synapses in the S1 cortex of neuropathic pain mice and its association with astrocytic Ca²⁺ signaling. The 34th Annual Meeting the Japan Neuroscience Society (Neuro2011). Yokohama. 2011 Sept. 16

(4) Kei Eto, Hiroaki Wake, Miho Watanabe, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Inter-regional remodeling between the primary somatosensory cortex and anterior cingulate cortex accelerates chronic pain behavior. The 34th Annual Meeting the Japan Neuroscience Society (Neuro2011). Yokohama. 2011 Sept. 16

(5) Kei Eto. Enhanced activity of mouse layer 2/3 inhibitory neurons in the primary somatosensory cortex in chronic inflammatory pain. 6th international conference of Neurons and Brain Disease in Toyama, Annual meeting of association for Neurons and brain disease. Toyama. 2011 Aug. 3

〔図書〕(計 1 件)

(1) 加藤 剛, 江藤 圭, 金 善光, 鍋倉 淳一. 中枢神経系の多光子励起 in vivo イメージング. 実験医学, 2011 vol20 No.16, 2595 ~ 2601

6. 研究組織

(1) 研究代表者

江藤 圭 (ETO KEI)
生理学研究所・発達生理学研究系・NIPS リサ
ーチフェロー
研究者番号：30545257

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
鍋倉 淳一 (NABEKURA JUNICHI)
生理学研究所・発達生理学研究系・教授
研究者番号：50237583