

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460693

研究課題名(和文) 疼痛慢性化に伴う両側帯状回の活性化機構および下降性疼痛抑制系調節機構の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the mechanism of activation in left side and right side of anterior cingulate cortex and the modulation of descending inhibitory pain pathway in chronic pain

研究代表者

右田 啓介 (Migita, Keisuke)

福岡大学・薬学部・准教授

研究者番号：10352262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、坐骨神経部分結紮モデルマウスの左右側帯状回における機能的変化について検討した。二次元電気泳動により、結紮後28日の左右側帯状回では発現パターンの異なるスポットが見られた。そのスポットにはCRMPが含まれることが質量分析で示された。しかしながら、ウエスタンブロット法では、左右側帯状回でのCRMP-2およびpCRMP-2の発現量は変化がなかった。また、ストレスモデルラットの帯状回におけるmIPSCのピーク電流は減少傾向にあったが、左右側帯状回間での違いは見られなかった。疼痛などのストレス存在下では、帯状回における抑制機構が弱まり興奮伝達が起きやすい状態にある可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated functional changes in anterior cingulate cortex (ACC) of sciatic nerve ligation model mice using biochemical and electrophysiological technique. Spot patterns of the left and the right side of ACC in day 28 after nerve ligation were not same from the result of two-dimensional electrophoresis. These spots included CRMP-2 from the result of mass spectrometry analysis. However, the level of expression of CRMP-2 and pCRMP-2 were not changed between left side and right side of ACC in Western blot analysis. In addition, peak current of mIPSC in fear conditioning rats tended to decrease compared to control rats, whereas the current was not difference between left side and right side in layer II ~ III of pyramidal neuron in ACC. It is possible that excitatory transmission in ACC may be easy to occur by inhibitory system declined in chronic pain and stress condition.

研究分野：神経薬理学

キーワード：慢性疼痛 帯状回 左右側

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛では、脊髄後根神経節や脊髄後角における機能異常によりアロディニアが生じている。その過程には、細胞内のエネルギー物質として知られているアデノシン三リン酸(ATP)が結合するプリン受容体(P2X および P2Y 受容体)が関与している。申請者は、脊髄後根神経節における P2X2 および P2X3 受容体の発現量増加がアロディニアの発症に関与していることを報告した。また近年では、脊髄後角の活性化型ミクログリアの増加や、その膜上における P2X4 受容体の過剰発現がアロディニアの一因であることが示された。その過程には、ミクログリアからの BDNF 放出、KCC2 発現量の減少、GABA_A 受容体応答の興奮性への変化が関与している。申請者は、坐骨神経結紮前に抗生物質のミノサイクリンを投与すると、脊髄内ミクログリアの増加およびアロディニアを抑制できることを見出した。しかしながら、ミノサイクリンを結紮前に投与しても脊髄でのミクログリアの増加やアロディニアは抑制できなかった。

最近では、慢性疼痛に対する脳内での研究報告も増えつつある。神経障害性疼痛モデルマウスを用いた fMRI の研究では、体性感覚野、帯状回、島皮質、視床の局所血流増加がみられ、神経活動性が高いことが示唆されている。これらの部位では、可塑的变化が生じていることが報告されている。また、申請者は、左側の坐骨神経を結紮したモデル動物を用いて、左側の脊髄後角、後根神経節あるいは右大脳半球の前帯状回における機能的変化について解析を行ってきた。その結果、慢性疼痛には後根神経節での P2X 受容体発現変化や GABA_A 受容体機能異常が関与していることを示すことが出来た。一方、帯状回の出力系である V 層錐体細胞での抑制性シナプス電流を解析した結果、対照側と結紮側の間に有意な差は見られなかった。痛覚伝導路は、脊髄あるいは延髄で神経が交叉することから、左側の坐骨神経が障害された場合、右側の帯状回に機能異常が生じると考えられる。しかしながら、fMRI 像では、片側の坐骨神経結紮モデルマウスにおいて、左右両側の帯状回や視床で高い神経活動性が生じていた。これらのことから、両側の帯状回が活性化状態になることで疼痛の慢性化が強固なものになり、下降性疼痛抑制系の破綻を来している可能性が考えられる。では、どのようにして片側の坐骨神経損傷により左右両側の帯状回が活性化状態になるのか。また、帯状回からは、視床や下降性疼痛抑制系の神経核である中脳水道周囲灰白質への投射が知られていることから、左右の帯状回から中脳水道周囲灰白質への入力はいを相殺する関係にあるのか、という疑問が新たに浮上した。

2. 研究の目的

上記の背景から、左側の坐骨神経損傷により生じる左右両側の帯状回の活性化機構および下降性疼痛抑制系への調節機構を明らかにする必要がある。左側の末梢神経刺激は、痛覚伝導路を介して右側の視床や帯状回に情報が伝達される。しかしながら、神経障害性疼痛下では、右側の帯状回のみならず左側の帯状回も活性化していることから、この現象が疼痛慢性化および下降性疼痛抑制系に深く関与していると考えられる。そこで本研究では、左側の坐骨神経を結紮により生じる左右両側の帯状回の活性化機構および下降性疼痛抑制系への影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

<疼痛モデル動物および疼痛評価>

疼痛モデル動物には、左側の坐骨神経の 1/2~1/3 を 8-0 ナイロン糸で結紮した坐骨神経部分結紮(PSNL)マウスを用いた。処置後 1~3 日齢を急性期、2~8 週齢のマウスを慢性期として各実験に用いた。疼痛発症の確認は、von Frey 法により行った。評価の詳細は、von Frey フィラメントをマウスの後肢足底部の中央部分に垂直に 5 秒間押し当て、その際の逃避行動を 0: 無反応、1: 3 秒~5 秒で後肢を挙上、2: 3 秒以内に後肢を挙上、3: 瞬時に後肢を挙上またはなめる、の 4 段階でスコア化した。この操作を両肢 5 回繰り返して、合計スコアを疼痛の指標とした。

<左側坐骨神経結紮マウスの左右側帯状回における疼痛関連タンパク質の探索>

左側坐骨神経結紮マウスおよび対照となる未処置のマウスから左右側の帯状回を取り出し、RIPA バッファーによりタンパク質を抽出した。抽出されたタンパク質は二次元電気泳動により発現変化するタンパク質を検討した。また、発現変化が示唆された神経細胞の構成因子であるコラプシン反応媒介タンパク質 2(CRMP-2) およびリン酸化 CRMP-2(pCRMP-2)の発現量の変化について、それぞれの抗体を用いてウエスタンブロット法により検討した。

<スライスパッチクランプ法を用いた左右側帯状回錐体細胞における神経活動の検討>

ストレスモデルの一つである恐怖記憶モデルラットの帯状回を含む急性脳スライスを作製し、蛍光顕微鏡下で、ホールセルパッチクランプ法により左右の帯状回の II~III 層錐体細胞からシナプス電流を記録した。細胞外灌流液には人工脳脊髄液(117mM NaCl, 3.6mM KCl, 1.2mM Na₂HPO₄, 1.2mM MgCl₂, 2.5mM CaCl₂, 25mM NaHCO₃ and 11mM glucose)、電極内液にはセシウム溶液(150mM CsCH₃SO₃, 5mM KCl, 3mM MgCl₂, 0.1mM EGTA, 10mM HEPES, 3mM Mg(ATP)₂, 0.4mM NaGTP)を用いた。

4. 研究成果

左側の坐骨神経を部分結紮した疼痛モデルマウスを作製し、von Frey フィラメントを用いて疼痛評価を行った。Fig 1に0.16 gのフィラメントを用いた結果を示した。結紮側では、結紮後3日から痛覚異常が生じ始め、7日以降28日まで持続的な疼痛異常が見られた。

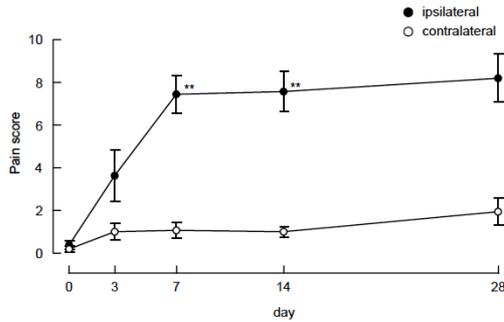


Fig 1. 坐骨神経部分結紮マウスにおける経時的疼痛評価

次に、結紮後28日の疼痛モデルマウスの左右側の帯状回を取り出し、タンパク質抽出後に二次元電気泳動を行った (fig 2)。その結果、Fig 2の赤枠で示す部位のように泳動パターンが異なるスポットが数箇所見られた。赤枠のスポットを取り出し質量分析を行った結果、CRMPが含まれることがわかった。CRMPの中でもCRMP-2は神経の軸索伸長などに関与しており、CRMP-2がリン酸化されると軸索身長が抑えられることが報告されている。このことから、坐骨神経が障害を受けた場合に脳内の帯状回神経細胞の軸索身長や

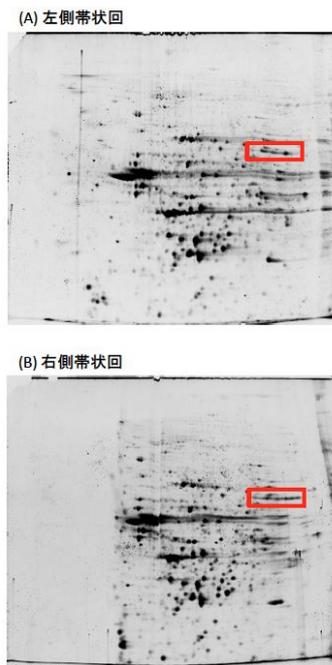


Fig 2. 結紮後28日の疼痛モデルマウスの左右側帯状回における二次元電気泳動 (A)左側帯状回、(B)右側帯状回

軸索輸送が変化している可能性が考えられる。そこで、疼痛モデルマウスにおけるCRMP-2およびpCRMP-2の発現量についてウェスタンブロット法を用いて検討を行った (fig 3)。その結果、左側と右側帯状回間の

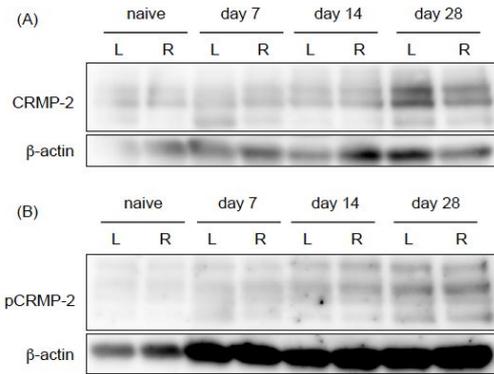


Fig 3. 結紮後7、14、28日の疼痛モデルマウスの左右側帯状回におけるCRMP-2およびpCRMP-2の発現 (A) CRMP-2、(B) pCRMP-2

CRMP-2およびpCRMP-2の発現量に有意な変化は見られなかった。また、CRMP-2がキネシンと結合し軸索輸送に関与していることが知られていることから、Kif1Bの発現についても検討したが (fig 4)、左右側の帯状回にお

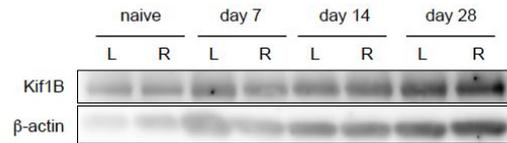


Fig 4. 結紮後7、14、28日の疼痛モデルマウスの左右側帯状回におけるKif1Bの発現

ける発現量に変化は見られなかった。二次元電気泳動の結果からはCRMP-2のリン酸化が変化していることが推測されたが、ウェスタンブロットによる解析ではリン酸化の変化が見られなかったことから、他のタイプのCRMPについて検討する必要が出てきた。このことについては今後検討していく予定である。

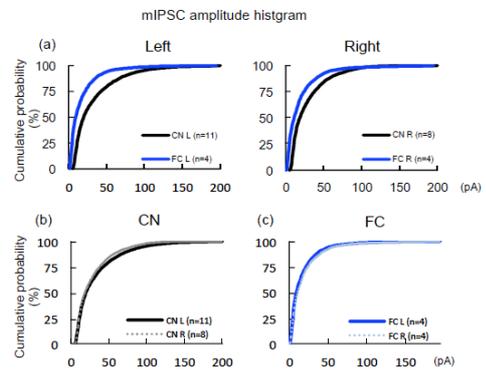


Fig 5. ストレスモデルラットの左右側前帯状回II/III層錐体細胞におけるmIPSC (a) 左右側前帯状回錐体細胞でのmIPSCのピーク電流におけるコントロールラット (CN)と恐怖記憶ラット (FC)間の比較、(B)コントロールラットにおける左右側mIPSCピーク電流の比較、(C)恐怖記憶ラットにおける左右側mIPSCピーク電流の比較

最後に、帯状回神経細胞の機能的変化についてスライスパッチクランプ法を用いて

検討した。申請者は、坐骨神経部分結紮による疼痛モデルマウスの帯状回における自発性抑制性シナプス後電流(sIPSC)および微小抑制性シナプス後電流(mIPSC)を記録したが、未処置マウスとの間に有意な差は得られなかった。そこで今回、ストレスモデルラットの左右側帯状回における mIPSC を検討した (fig 5)。その結果、左右両側の帯状回錐体細胞における mIPSC ピーク電流が、コントロールラットと比較してストレスモデルラットで減少している傾向が見られた。このことから、ストレスを受けることで、帯状回の GABA_A 受容体を介する抑制機能が減少し、それに伴い興奮性が増強することが考えられる。このような帯状回における神経興奮が慢性疼痛の一因かもしれない。

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 6件)

1. Koga K, Matsuzaki Y, Honda K, Eto F, Furukawa T, Migita K, Irie K, Mishima K, Ueno S. Activations of muscarinic M₁ receptors in the anterior cingulate cortex contribute to the antinociceptive effect via GABAergic transmission. *Mol Pain*. 2017. Jan
 2. Migita K, Ozaki T, Shimoyama S, Yamada J, Nikaido Y, Furukawa T, Shiba Y, Egan TM, Ueno S. HSP90 Regulation of P2X7 Receptor Function Requires an Intact Cytoplasmic C-Terminus. *Mol Pharmacol*. 2016 90:116-126.
 3. Matsumoto T, Jimi S, Migita K, Takamatsu Y, Hara S. Inhibition of glucose transporter 1 induces apoptosis and sensitizes multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents. *Leuk Res*. 2016 41:103-110.
 4. Nikaido Y, Yamada J, Migita K, Shiba Y, Furukawa T, Nakashima T, Ueno S. Cis-3-hexenol and trans-2-hexenal mixture prevents development of PTSD-like phenotype in rats. *Behav Brain Res*. 2016 297:251-258.
 5. Shiba Y, Mori F, Yamada J, Migita K, Nikaido Y, Wakabayashi K, Kaneko S, Okada M, Hirose S, Ueno S. Spontaneous epileptic seizures in transgenic rats harboring a human ADNFLE missense mutation in the 2-subunit of the nicotinic acetylcholine receptor. *Neurosci Res*. 2015 100:46-54
6. Ueno T, Yamada J, Nishijima H, Arai A, Migita K, Baba M, Ueno S, Tomiyama M. Morphological and electrophysiological changes in intratelencephalic-type pyramidal neurons in the motor cortex of a rat model of levodopa-induced dyskinesia. *Neurobiol Dis*. 2014 64:142-9.
- [学会発表](計 6件)
1. 抗がん作用をもつ HSP90 拮抗薬は P2X7 受容体応答を調節する
右田啓介、松本太一、木村公彦、原周司
日本薬学会第 137 年会、仙台、2017 年 3 月 25 日-27 日
 2. Asymmetrical activity in rat anterior cingulate cortex in fear expression and extinction
Tomonori Furukawa, Yoshikazu Nikaido, Keisuke Migita, Shuji Shimoyama, Taku Ozaki, Kohei Koga, and Shinya Ueno
第 93 回日本生理学会大会、札幌、2016 年 3 月 22 日-24 日
 3. TNF- α は、糖尿病マウスにおいて機械刺激性痛覚過敏に関与する。
衛藤史博、本多健治、東 翔子、浅田 歩、入江圭一、右田啓介、三島健一
第 89 回薬理学会年会、パシフィコ横浜、2016 年 3 月 9 日-11 日
 4. The cytoplasmic C-terminus of P2X7 receptor is an important determinant of channel function
Keisuke Migita
Khon Kean University 2015 年 11 月 3 日
 5. Differential effects of propofol and etomidate on hypnotic electroencephalogram stage and sleep-wake cycle in mice
Yoshikazu Nikaido, Sachie Takada, Tomonori Furukawa, Keisuke Migita, Yuko Shiba, Junko Yamada, Tetsuya Kushikata, Kazuyoshi Hirota, Shuji Shimoyama, Taku Ozaki, Kazuhiko Nakamura, Takashi Kanematsu, Masato Hirata, Shinya Ueno
第 92 回日本生理学会大会、神戸、2015 年 3 月 21-23 日
 6. Behavioral Responses to Chronic Restraint Stress in Mice Lacking Phospholipase C-related Inactive Protein Type-1
Nikaido Y., Shimoyama S., Ozaki T., Migita K., Shiba Y., Furukawa T., Yamada J., Kanematsu T., Hirata M., Nakamura K.

and Ueno S.
第 37 回日本神経科学会大会、横浜、2014
年 9 月 11 - 13 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

右田 啓介 (MIGITA, KEISUKE)
福岡大学・薬学部・准教授
研究者番号：1 0 3 5 2 2 6 2

(2) 研究分担者

上野 伸哉 (UENO, SHINYA)
弘前大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：0 0 3 1 2 1 5 8
(平成 27 年 3 月 13 日変更承認)

(3) 連携研究者

本多 健治 (HONDA, KENJI)
福岡大学・薬学部・助教
研究者番号：6 0 1 4 0 7 6 1

(4) 研究協力者

()