

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 25 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462253

研究課題名(和文) 前帯状皮質活性化が脊髄後角に下行性疼痛賦活系を形成するメカニズムの解析

研究課題名(英文) The mechanism of descending pain excitatory system in the spinal dorsal horn neurons due to the activation of anterior cingulate cortex

研究代表者

谷口 亘 (Taniguchi, Wataru)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：20453194

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)：本研究において、前帯状皮質(ACC)の活性化により脊髄後角ニューロンの自発性興奮性シナプス後電流(sEPSC)の増強が得られることがin vivo パッチクランプ法で確認できた。さらに神経障害性疼痛モデルのSNIモデルラットでは既にsEPSCは増強しているため、ACC刺激によって増強作用は得られなかった。また、SNIモデルラットのACCにAMPA受容体拮抗薬を注入すると増強していたsEPSCの抑制が得られた。さらに、実際の痛み刺激による誘発EPSCもACC刺激により増強する事が判明した。以上の結果はACCから脊髄後角に下行性疼痛賦活系が存在することを示唆していると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we showed the enhancement of spontaneous excitatory postsynaptic currents (sEPSCs) in the spinal dorsal horn neurons of normal rats according to the electrical stimulation of their ACC by using in vivo patch-clamp methods. However, we could not find this enhancement in the nerve injury model rats (spared nerve injury rats) because their sEPSCs already had been enhanced before ACC electrical stimulation. Moreover, we confirmed that the enhancement of sEPSCs in SNI rats was inhibited by the injection of a selective AMPA antagonist into ACC. We showed that the electrical stimulation of ACC produced direct excitatory effects in the spinal dorsal horn neurons of normal rats to both noxious and innocuous stimuli to the skin. These results suggest that the descending pain excitatory system could be from anterior cingulate cortex to the spinal dorsal horn neurons.

研究分野：整形外科 神経生理

キーワード：前帯状皮質 前帯状回 ACC in vivo パッチクランプ法 下行性疼痛賦活 spinal cord dorsal horn EPSC

1. 研究開始当初の背景

国際疼痛学会(IASP)は痛みの定義を「痛みとは、組織の損傷を引き起こす、あるいは損傷を引き起こす可能性のある時に生じる不快な感覚や不快な情動を伴う体験」としている。難治性慢性疼痛の患者の中には、怒りやイライラ、悲しみやあきらめといった、いわゆる負の情動が強い傾向があることは臨床にたずさわる整形外科医は誰も直感的に感じている。このような患者においては、痛みが負の情動を引き起こす場合、負の情動が通常の痛みを増強・慢性化した場合、両方が作用して痛みの悪循環を形成している場合が考えられるが、いずれも情動が痛みに関与しているのは間違いない。典型的な患者では明らかな器質的な問題はないことも多く、往々にして心因性疼痛として判断され、他科(精神科や心療内科)に診療を依頼することになる。実際、向精神薬、抗うつ薬といった薬物療法や認知行動療法などが奏功する場合も多い。しかし、このような負の情動が強い患者は脳内の情報処理の問題のみで慢性疼痛を発症しているのかは疑問が多い。実際の患者の訴えは不定愁訴の場合が多いが、画像所見が軽度な割に症状が激しい脊髄・神経根症状の場合がある。このような場合、脳内の情動中枢の活性化が脊髄に痛み情報を増幅させている可能性が考えられる。従来、行き過ぎた痛み情報を高位中枢の脳から下位中枢の脊髄に対して、痛み情報を減弱させる経路、いわゆる下行性疼痛抑制系という概念が存在し、その機序もおおよそ明らかとなっている。大縫線核からのセロトニン作動神経系、青斑核からのノルアドレナリン作動神経系は教科書レベルにも記載のある機序である。近年、下行性疼痛抑制系とは真逆の上位中枢から脊髄後角への痛み情報を増強させる下行性の経路(確立した概念ではないので正式な命名はないが下行性疼痛促進系あるいは下行性疼痛賦活系とも呼べる経路)が存在する可能性が指摘されているが、詳細は未だ不明である。痛み情報は脊髄視床路外側系とは別の内側系を経由して、情動中枢にも入力される。痛みが不快なのはこのためである。下行性疼痛賦活系には原始的な感情を支配する情動中枢が大きく関与していると考えられている。

前帯状回(Anterior cingulate cortex: ACC)は扁桃体などと共に情動中枢の一つである。近年、慢性疼痛患者ではACCが活性化していることがfMRIなどの解析により、判明してきている。しかし、ACCの活性化が痛み情報の中継基地である脊髄後角レベルに与える影響については未だはっきりしていない。今回、我々は主にin vivoパッチクランプ法を用いて、ACCの活性化が脊髄後角にあたえる影響を解析することで、情動が痛みに与える影響を明らかにしたい。

2. 研究の目的

今回の研究の主たる目的は、情動中枢ACCの活性化が脊髄後角レベルで痛み情報の増強をおこすことを証明し、そのメカニズムを明らかにすることである。その手法として本研究では脊髄in vivoパッチクランプ法を用いた。脊髄スライス標本では脊髄間の情報伝達は中断されるが、in vivoパッチクランプ法は個体を生かしたまま脊髄後角の単一細胞から記録でき、脳と末梢神経といずれも保存された状態で記録できる。そのため、詳細かつエビデンスの高い解析が可能である。In vivoパッチクランプ法で脊髄後角ニューロンから記録をとりながら、ACCに電気刺激を与えることで人為的に活性化させ、その応答による脊髄後角への影響をリアルタイムで解析できる。まず、電気刺激の部位・強度・頻度・刺激時間などの条件を変更し、脊髄後角細胞への影響を解析する。次に慢性疼痛として、神経障害性疼痛のモデル動物を用いて実験を行う。神経障害性疼痛におけるACCの活性化の役割を検証するため、末梢神経障害性モデルラットと正常ラットを比較して、ACC電気刺激に対する脊髄後角ニューロン応答の違いを検討する。さらに実際に末梢組織に痛み刺激・触刺激を加えることで、それに対するACC電気刺激前後での影響を検討すれば、実際の痛みに対する影響も検討できると思われる。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデル作成

雄性Sprague-Dawleyラットに5週齢の時点で末梢神経障害性疼痛(Spared nerve injury: SNI)モデルを作成した。SNIモデルは坐骨神経から分岐する3枝のうち、腓骨神経を残し、総腓骨神経・脛骨神経を結紮・切断することによって作成する。疼痛はvon Frey testで評価し、術後7~10日の時点で下肢にallodynia様の反応が出現するのを確認して電気生理学的実験に使用した。

(2) in vivoパッチクランプ法

In vivoパッチクランプ法に関してはTaniguchi(Pain. 2011)による。6週齢の成熟Sprague-Dawley系雄性ラットをウレタン(腹腔内投与: 1.2~1.5g/kg)で麻酔後、呼吸管理はマスクによる酸素投与により行なった。胸腰椎部に縦切開を行い、Th12からL2まで椎弓切除術を行う。次にラットを脊髄固定器で固定し、皮切部の辺縁を引き上げることでプールを作成し、脊髄表面を約36の酸素負荷した人工脳脊髄液で灌流する。実体顕微鏡下に硬膜を切除し、腰膨大部レベルで後根を内外側に分け、電極刺入スペースを作る。呼吸による脊髄の振動が抑制できていることを確認した上で、クモ膜と軟膜に微細ハサミ、鑷子を用いて電極刺入用の開窓を行い、記録の準備を終える。マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、5mVステップに対する応答電流の変化を指標にギガシールを形

成するいわゆるブラインドパッチクランプ法によって記録を行う。記録細胞は第層の膠様質を狙うが、記録電極を刺入する深さからある程度の同定は可能である。(脊髄表面から約 150 μm 以内)。

(3) 神経細胞からのパッチクランプ記録法

先端電極抵抗 8~12 M の微小電極に電極内液を充填し、マイクロマニピュレーターで電極を脊髄内に刺入し、ブラインド・ホールセル・パッチクランプ法によって記録を行なった。興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current; EPSC) を記録するときの電極内液の組成 (mM) は potassium gluconate, 135; KCl, 5; CaCl_2 , 0.5; MgCl_2 , 2; EGTA, 5; ATP-Mg, 5; HEPES, 5 とし、抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current; IPSC) を記録するときには Cs-sulfate, 110; tetraethylammonium (TEA), 0.5; CaCl_2 , 0.5; MgCl_2 , 2; EGTA, 5; ATP-Mg, 5; HEPES, 5 とした。EPSC は -70 mV、IPSC は 0 mV の保持膜電位で記録した。得られた応答はパッチクランプ用増幅器 (Molecular Devices 社 Axopatch200B) により増幅され、A/D 変換 (Molecular Devices 社 Digidata 1440A) 後、データ記録及び解析用ソフトウェア (Molecular Devices 社 Mini Analysis 6.0) を用いてコンピュータにより記録・解析した。実験結果は平均 \pm 標準誤差で表し、検定は Student's t-test で行ない、危険率 5% ($p < 0.05$) をもって有意と判定した。括弧内の n の値は記録した細胞数を示す。

(4) ACC 領域の電気刺激・薬液注入

頭蓋骨を露出し、記録側と同側に穴を開けて、頭部を固定した。座標軸を設定したのち、ACC (stereotaxic coordinates: 2.0 mm anterior to bregma and 0.5 mm lateral, 2.0 mm ventral to the dura) に微小電極を刺入し、歯科用セメントで固定した。電気刺激は duration 100 $\square\square$ s, 100 Hz とし、単発刺激は 200 $\square\square$ の強度で \square 秒間、反復刺激は 100 \square A の強度で、1 秒間の刺激を 5 秒ごとに繰り返し、150 秒間にわたって行なった。さらに ACC に設置した電極と同部位に薬液を注入する実験においては、前もってカニューラを設置しておき、脊髄での記録が取れたあとにマイクロインジェクションを用いて使用する薬液を注入した。

(5) 末梢刺激試験

記録ニューロンの皮膚受容野を同定した上で同部位に疼痛刺激と触刺激を加え、誘発性の EPSC (evoked EPSC) の頻度・振幅について観察を行う。ACC 刺激前後における evoked EPSC を比較することで ACC 刺激の影響を解析した。疼痛刺激には有鉤鉗子、触刺激には定圧の空気を噴霧することにより、末梢刺激を定量的に行った。

4. 研究成果

-70 mV の膜電位固定下では、記録した全ての細胞において自発性興奮性シナプス後電流 (spontaneous excitatory postsynaptic current; sEPSC) が観察された。ACC に単発の電気刺激を行なったところ、刺激後の sEPSC の発生頻度ならびに振幅はそれぞれ、刺激前の $99.7 \pm 2.5\%$ と $101.0 \pm 2.9\%$ であり、有意な変化は認められなかった ($n=21$)。一方、ACC に反復刺激を行なったところ、10 細胞中 6 細胞で刺激後の発生頻度ならびに振幅が刺激前と比較して著明に増加しており、その平均値はそれぞれ $136.7 \pm 5.9\%$ と $137.2 \pm 9.8\%$ と、刺激前と比較して有意に増加していた ($n=6$)。その他の細胞では刺激後の sEPSC の発生頻度ならびに振幅はそれぞれ、刺激前の $96.9 \pm 1.3\%$ と $98.8 \pm 3.7\%$ であり、有意な変化は認められなかった ($n=4$)。刺激後に sEPSC の増加が観察された細胞において、sEPSC の inter-event interval と振幅の累積分布は、刺激前に比べて inter-event interval は小さい方へ、振幅は大きい方へシフトした。また、0 mV の膜電位固定下では、記録した全ての細胞において自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current; sIPSC) が観察された。ACC の反復刺激を行なっても、刺激後の sIPSC の発生頻度ならびに振幅はそれぞれ、刺激前の $96.9 \pm 1.8\%$ と $96.0 \pm 1.7\%$ であり、有意な変化は認められなかった ($n=7$)。これらの結果から、情動中枢である ACC の活性化は下位中枢である脊髄後角ニューロンの興奮性シナプス伝達を増強させるが抑制性シナプス伝達には影響しない事が判明した。すなわち、ACC の活性化は下行性疼痛賦活系を形成している可能性がある。

次に、SNI モデルラットと正常ラットにおいて ACC 刺激に対する影響を比較した。まず、SNI モデルラットにおける sEPSC を記録した。正常ラットでは sEPSC の発生頻度ならびに振幅の平均値が 9.1 ± 1.3 Hz, 12.3 ± 0.8 pA であったのに対し ($n=20$)、SNI モデルでは、それぞれ 15.9 ± 1.6 Hz, 21.9 ± 3.1 pA と有意に増加していた ($n=20$)。一方、sIPSC は、ナীবでは発生頻度ならびに振幅の平均値が 13.2 ± 1.8 Hz, 26.0 ± 3.5 pA ($n=20$)、SNI モデルでは、それぞれ 18.2 ± 2.5 Hz, 27.7 ± 5.4 Hz であり ($n=12$)、有意な差は認められなかった。以上の結果から SNI モデルにおいては正常時と比べて、すでに脊髄後角における興奮性シナプス伝達が増強していると示唆された。また、このように sEPSC が増強している状態の SNI モデルラットにおいては ACC の反復刺激を行なっても、sEPSC の発生頻度ならびに振幅はそれぞれ、刺激前の $103.7 \pm 5.2\%$ と $106.6 \pm 9.5\%$ であり、有意な変化は認められなかった ($n=6$)。さらに sEPSC が増強している SNI モデルラット

に前もって、ACC 刺激部位と同じ位置に設置したカニューラから AMPA 受容体拮抗薬の 1 つである NAPSM を注入したところ、既に増強していた sEPSC は徐々に頻度が減少していくことが判明した。以上の結果から、SNI において既に増強している sEPSC の 1 つの要因として ACC からの下行性疼痛賦活系が活性化していた可能性が考えられ、電気刺激してもそれ以上の活性化は起こらない可能性が示唆された。

最後に SNI モデルおよび Sham モデルラットに対して、下肢に痛覚刺激及び触刺激を与えた際に観察できる EPSC の増強反応 (evoked EPSC) を ACC の電気刺激前後における変化を観察することで、実際の侵害刺激および非侵害刺激に対する ACC の活性化の影響を解析した。Sham モデルにおいては痛覚刺激および触刺激によって得られる evoked EPSC は ACC 電気刺激により増強されることが判明した (n = 9)。一方、SNI モデルにおいては痛覚刺激および触刺激によって得られる evoked EPSC は ACC 電気刺激をおこなっても有意な変化がないことが判明した (n = 7)。以上の結果から、実際の末梢刺激に対しても ACC 活性化は脊髄後角レベルでシグナル伝達を増強させる可能性がある。また、SNI モデルにおいては自発性 EPSC が既に増強しており、ACC 活性化がその増強に参与している可能性があるため、末梢刺激に対する増強作用も既に増強している可能性があるものと考えられる。

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 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. 谷口亘, 杉村弥恵, 曾根勝真弓, 西尾尚子, 筒井俊二, 西秀人, 吉田宗人, 中塚映政: 神経障害性疼痛における前帯状皮質活性化が脊髄後角ニューロンに与える影響. 第 38 回日本疼痛学会, 札幌, 2016.6.13
2. Taniguchi W, Yamanaka M, Sonekatsu M, Nishio N, Tsutsui S, Nishi H, Hashizume H, Yamada H, Nakatsuka T, Yoshida M. In Vivo Patch-clamp Analysis Of Descending Facilitation Of Excitatory Transmission In The Spinal Dorsal Horn By The Anterior Cingulate Cortex Activation. Orthopedic Research Society 2016 Annual meeting. Orlando. 2016.3.1-3.5
3. 谷口亘, 山中学, 西尾尚子, 曾根勝真弓, 阿部唯一, 峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人. 情動中枢前帯状皮質の活性化は脊髄後角で直接痛みを増強する. 第 43 回日本脊椎脊髄病学会学術集会, 京都, 2014.4.17-19
4. 谷口亘, 山中学, 曾根勝真弓, 阿部唯一,

峰巨, 筒井俊二, 橋爪洋, 山田宏, 中塚映政, 吉田宗人. 前帯状皮質から脊髄後角に至る経路は下行性疼痛賦活系を形成する. 第 29 回日本整形外科学会基礎学術集会, 鹿児島, 2014.10.9

[図書](計 4 件)

1. 谷口亘, 中塚映政: 痛みの Clinical Neuroscience 8 脊髄機能変化と痛み: アロディニアなどのメカニズムを巡って. 最新医学 71(2): 112-115, 2016 最新医学社
2. 谷口亘, 中塚映政: 特集“痛みとかゆみ”【痛み・かゆみの科学】3. 痛みの神経伝達機序 JOHNS 32(5): 551-554, 2016 東京医学社
3. Wataru Taniguchi, Terumasa Nakatsuka. Chaptor31. Spinal synaptic plasticity in chronic pain. Neuroprotection and Regeneration of the Spinal Cord. 2014; 387-398, Springer Japan, Tokyo
4. 谷口亘, 中塚映政. 基礎編 A. 基礎知識 12. 痛みの研究手法-パッチクランプ法/C. 脊髄 1. 脊髄後角/D. 脳 2. 神経可塑性/D. 脳 3. 中枢性感作. 痛みの Science & Practice シリーズ 6 「痛み診療キーポイント」2014; P.14, 41, 60, 61 文光堂, 東京

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 亘 (Taniguchi Wataru)
和歌山県立医科大学・医学部・助教
研究者番号: 20453194

(2) 研究分担者

中塚 映政 (Nakatsuka Terumasa)
関西医療大学・保健医療学部・客員教授
研究者番号: 30380752

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

西尾 尚子 (Nishio Naoko)
和歌山県立医科大学・医学部・特別研究員
研究者番号: 40648359

山中学 (Yamanaka Manabu)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：30597084

曾根勝 真弓 (Sonekatsu Mayumi)
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員
研究者番号：40725579