

令和 2 年 5 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16482

研究課題名（和文）大脳皮質第一次体性感覚野の生体イメージングによる疼痛発症・維持機構の病態解明

研究課題名（英文）In vivo tracing of single neuron activity of primary somatosensory cortex in mice pain models

研究代表者

岡田 卓也（OKADA, TAKUYA）

神戸大学・医学部附属病院・非常勤医師

研究者番号：70792935

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）：本研究では、アデノ随伴ウイルスベクターを使用し、マウス第一次体性感覚野（S1）の出力層である2/3層の神経細胞にカルシウム感受性タンパク質を（GCaMP6f）発現させ、2光子顕微鏡を用いてそれらの活動を可視化（生体イメージング）し、疼痛モデルマウス作製前後で個々の同一神経細胞活動の経時的変化を観察した。その結果、疼痛モデル作製後の急性期において、疼痛閾値が低下することに相関して神経細胞活動および各神経細胞間の活動の相関性が有意に増加した。さらに、化学遺伝学的手法を用い、S1の神経細胞活動の人為的制御によって有意に疼痛閾値の変化が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、慢性疼痛の病態形成において大脳皮質第一次体性感覚野（S1）の神経活動変化の重要性が示唆されるようになってきた。しかし、生体内で同一神経細胞活動を経時的に観察し、疼痛形成のメカニズムを検討した研究は少なかった。本研究によりS1の個々の神経細胞活動と疼痛閾値には関連があり、疼痛形成および維持においてS1の個々の神経活動変化およびそれらの相関性が重要である可能性が示唆された。本研究の成果から、疼痛急性期の治療において、S1の神経細胞活動を抑制することを焦点とした新規治療法の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this research, to visualize neuronal activity, the adeno associated virus encoding the synapsin promoter driven calcium indicator protein GCaMP6f was expressed in layer 2/3 excitatory neurons of primary somatosensory cortex (S1), we investigated the activity pattern of S1 neurons by using in vivo two-photon calcium imaging. We analyzed time dependent changes of neuronal activity and synchronization of neuronal activity during acute phase of pain in mice models of pain. As a results, the paw withdrawal threshold was significantly decreased in the affected hind paw of both models in acute pain phase. Therefore, the integral value of Ca²⁺ traces and the correlational activity among GCaMP6f-expressing excitatory neurons increased in both models in acute pain phase. Furthermore, by using chemogenetic method, we succeeded to enhance or inhibit neuronal activity of S1 neurons in vivo. We found the threshold of pain significantly changed by artificial control of S1 neuronal activity.

研究分野：麻酔科学

キーワード：生体イメージング 疼痛 大脳皮質体性感覚野 化学遺伝学的手法

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みに関する基礎的研究は近年、増加傾向にあり疼痛時の脊髄の機能的変化など数多く報告されているが、臨床的には今もなお神経障害性痛などのいわゆる難治性疼痛に多数の患者が苦しんでいるのが現状であり、プライマリケアを受診する患者の 20-50%の訴えは慢性痛であると報告されている (Ellen WK Rosenquist et al. 2017)。神経障害性痛は痛みが長期間持続するだけでなく、非ステロイド性抗炎症薬やオピオイド受容体作用薬に抵抗性があることが問題である。また近年、本邦では総手術件数が増加傾向にあるが、術後痛が遷延することによる遷延性術後痛に約 10-50%の患者が長期間苦しんでいるという報告もある (Henrik Kehlet et al. 2006)。

痛覚を伝達する一次求心性 C、Aδ 線維の細胞体は脊髄神経の後根神経節 (DRG) にあり、刺激は脊髄後角に存在する二次ニューロンに伝達され、大脳皮質で痛みと認識される。神経障害性痛を有する患者では、自発痛、侵害性刺激に対する痛覚過敏反応だけでなく、触覚など非侵害性刺激に対して強い痛み (アロディニア) を生じる。脊髄後角における神経細胞の興奮性増大がその発症に関わることに着目した重要な研究が進められてきた (Ru-Rong Ji et al. 2016)。さらに近年大脳皮質感覚野に着目し、そのシナプスの可塑的变化 (Sun Kwang Kim et al. 2012)、グリア細胞の関与などを示した研究が行われている (Sun Kwang Kim et al. 2016)。しかしながら同一の神経細胞の経時的活動変化に着目し、そのメカニズムを詳細に検討した研究はなかった。

2. 研究の目的

本研究では、大脳皮質感覚野に着目し疼痛時の大脳皮質第一次体性感覚野 (S1) における同一の神経細胞を、2光子励起顕微鏡を用いた生体イメージング法により経時的に可視化することで、疼痛発生時の大脳皮質第一次体性感覚野における病態基盤を明らかにしようと考えた。また、最新の化学遺伝学的手法を用いて S1 の神経細胞活動を特異的に操作することで疼痛閾値に与える影響を検討することとした。

3. 研究の方法

【平成 30 年度】

疼痛モデルマウスは、術後痛モデルマウス (Brennan TJ et al. 1997) および炎症性痛モデルマウス (Newbould BB et al. 1963) を用いた。これらの疼痛モデルマウスでは、術後急性および慢性的に持続する痛覚過敏状態が観察される。疼痛行動評価は、機械刺激による痛覚過敏を von Frey filament を用いて測定した。マウスの足底を刺激し、その逃避反応から 50% 逃避閾値を測定した (Maximilian Ruppert Franz von Frey et al. 1895)。また、ホットプレート試験により足底に 48~58 の熱刺激を加え、疼痛関連行動が起こるまでの潜時も測定した (Woolfe et al. 1944)。

これらの疼痛モデルを作製する前後での神経細胞活動の経時的変化を検証するために、第一次体性感覚野の出力層である 2/3 層にカルシウム感受性タンパク質 (GCaMP6f) を、アデノ随伴ウイルスを用いて発現させた後、2光子顕微鏡を用いて覚醒下における神経細胞の自発活動を経時的に可視化し追跡した。得られた画像の蛍光強度の変化を数理的に解析し、変化を抽出した。

【平成 31 年度】

大脳皮質第一次体性感覚野 (S1) の神経細胞活動と疼痛閾値の関連を検証するために化学遺伝学的手法 (外因性の clozapine-N-oxide と結合することで神経活動を引き起こす人工受容体と同領域の神経細胞に発現させる) を用いて S1 の神経細胞活動を人為的に制御し、疼痛閾値に与

える影響を検討した。

4. 研究成果

【平成 30 年度】

術後痛モデルマウスはモデル作製後 3 - 5 日間、炎症性痛モデルマウスは、モデル作製後 10 日間疼痛閾値の有意な低下を認めた(図 1)。そして、これらの疼痛モデルを作製する前後で同一神経細胞活動の経時的变化を生体イメージング(図 2)により追跡し、得られた画像の蛍光強度の変化に対し数理的解析を行った結果、疼痛モデル作製後の急性期において、いずれのモデルも個々の神経細胞活動および各神経細胞間の活動の相関性が有意に増加した。また、炎症性痛モデルでは術後痛モデルよりも長く疼痛閾値の低下を認めたのに一致して、個々の神経細胞活動や各神経細胞間の活動の相関性が増加する期間も延長して認められた(図 3)。

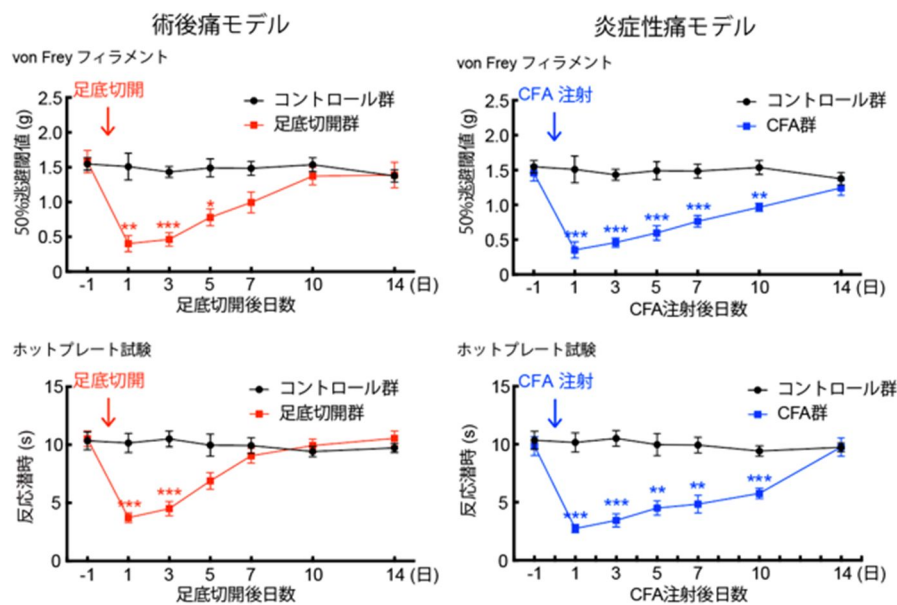


図 1

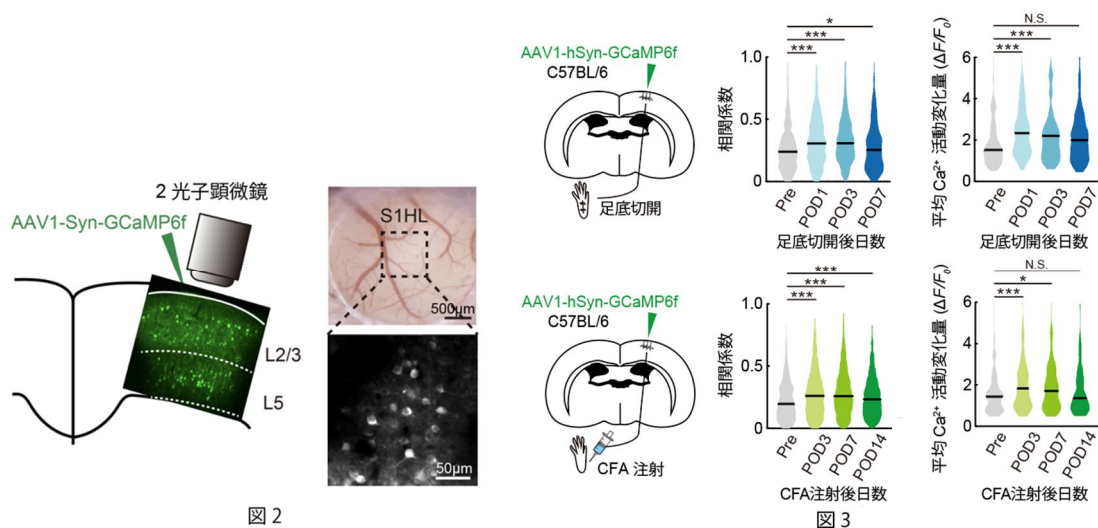


図 2

図 3

【平成 31 年度】

野生型マウスの S1 神経細胞にカルシウム感受性緑色蛍光蛋白および外因性の clozapine-N-

oxide (CNO) と結合することで神経活動を引き起こす人工受容体を二重に発現させ、CNO を腹腔内投与することで、神経細胞活動の活性化および抑制を観察することが可能であった。さらにこの人為的操作で、S1 の神経細胞活動を活性化させることで疼痛閾値が有意に低下し、また炎症性痛モデル作製後に神経細胞活動を連日抑制させることで、疼痛閾値の改善までの期間が短縮することを確認した(図 4)。これらの結果から、S1 の神経活動と疼痛閾値には関連があり、疼痛形成および維持において S1 の個々の神経活動変化およびそれらの相関性が重要である可能性が示唆された。

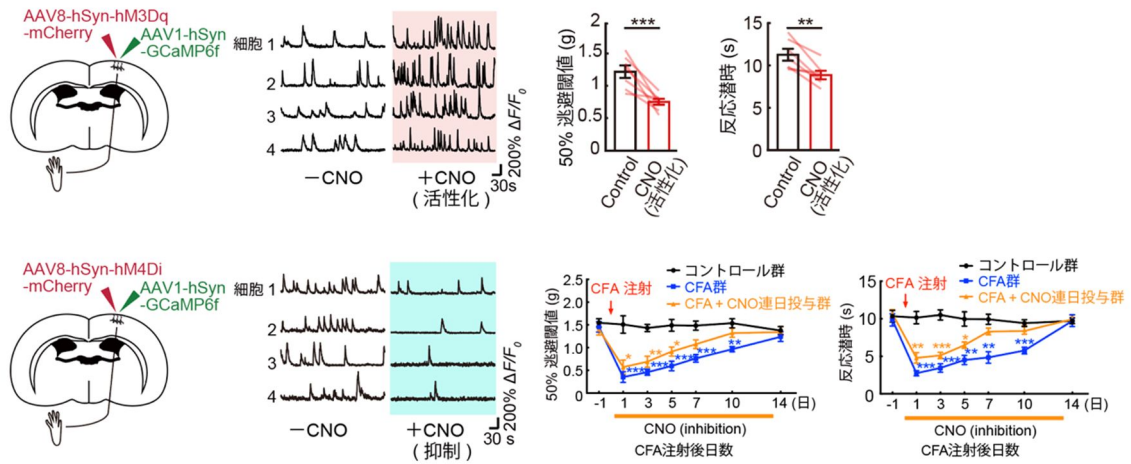


図 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 岡田 卓也、橘 吉寿、野村 有紀、小幡 典彦、溝淵 知司、和氣 弘明
2. 発表標題 大脳皮質感覚野の生体イメージングによる疼痛発症機構解明へのアプローチ
3. 学会等名 第111回近畿生理学談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Okada, Yoshihisa Tachibana, Yuki Nomura, Norihiko Obata, Satoshi Mizobuchi, Hiroaki Wake
2. 発表標題 In vivo tracing of single neuron activity with Ca ²⁺ imaging of primary somatosensory cortex in mouse models of postoperative pain and inflammatory pain
3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岡田 卓也、橘 吉寿、野村 有紀、小幡 典彦、溝淵 知司、和氣 弘明
2. 発表標題 In vivo Ca ²⁺ imaging of primary somatosensory cortex in a mouse model of postoperative pain
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takuya Okada, Yoshihisa Tachibana, Yuki Nomura, Norihiko Obata, Satoshi Mizobuchi, Hiroaki Wake
2. 発表標題 In vivo Ca ²⁺ imaging of somatosensory cortex in postoperative and inflammatory pain models of mice
3. 学会等名 The 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies Congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岡田 卓也、野村 有紀、小幡 典彦、橘 吉寿、和氣 弘明、溝淵 知司
2. 発表標題 生体カルシウムイメージングによる大脳皮質第一次体性感覚野における同一 神経細胞活動の変化が疼痛閾値に与える影響の検討
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takuya Okada, Yuki Nomura, Yoshihisa Tachibana, Norihiko Obata, Hiroaki Wake, Satoshi Mizobuchi
2. 発表標題 In vivo tracing of single neuron activity of primary somatosensory cortex in mice pain models
3. 学会等名 American Society of Anesthesiologist Annual Meeting 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019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