

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659318

研究課題名(和文)慢性疼痛の中枢機構の解明と新規治療法への展開

研究課題名(英文)Understanding of neuronal mechanisms of chronic pain

研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda, Hiromi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00432451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：前帯状回皮質は痛みの認知や情動的要素に関与する脳部位であり、慢性疼痛の発生に深く関わっている。このため、前帯状回皮質における可塑的变化が、慢性疼痛の神経機構として考えられるが、そのメカニズムには不明な点が多い。本研究において、ホールセルパッチクランプ法を用いた実験結果から、末梢性炎症疼痛モデルマウスの前帯状回皮質では、興奮性シナプスの伝達効率増加が生じ、興奮性伝達物質の放出確率および放出可能シナプス小胞数がともに増大していることが明らかとなった。また、光学的膜電位測定法を用いた実験結果から、同部位において、興奮伝播の範囲増強が生じていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The anterior cingulate cortex (ACC) is a forebrain structure that plays important roles in emotion, learning, memory and persistent pain. However, little is known about the neuronal mechanisms about chronic pain. In the present study, the quantal analysis of excitatory synapses in the ACC revealed that both probability of transmitter release and number of available vesicles were increased in a mouse model of peripheral inflammation. The voltage-sensitive dye imaging also revealed that the horizontal excitation spread in L2/3 caused by L4 stimulation in the ACC was enhanced in the mouse model of peripheral inflammation.

研究分野：神経科学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：慢性疼痛 帯状回 シナプス 興奮伝播 EPSC

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は、発症機序が複雑であり、治療が非常に困難である。痛みは体を守る生体の防御システムとして必要不可欠であるが、痛みが慢性化すると、不安、嫌悪、抑鬱、恐怖などの不快情動が引き起こされる。更には、不快情動が遷延することにより、精神疾患や情動障害が起こる可能性が指摘されている。このため、慢性疼痛の基盤となる基礎的知見を集積し、新たな治療法の確立が望まれる。

痛覚の情報伝達経路の中で、脊髄側索から始まり、脳幹部から視床中心核群、そして前帯状回皮質に至る経路が痛みの情動や記憶と関連する経路であり、前帯状回皮質の可塑的变化がより複雑に疼痛反応を修飾し、痛みの慢性化並びに情動障害を惹起している可能性が考えられる。したがって、慢性疼痛刺激による前帯状回皮質ニューロンの興奮性増加が、慢性疼痛の神経機構として想定されるが、その発症機構には不明な点が多く残されている。

2. 研究の目的

(1) これまでの研究により、末梢性炎症疼痛モデルマウスや神経因性疼痛モデルマウスの前帯状回皮質では、興奮性シナプス伝達において、伝達効率の増加が生じることが明らかとなっている。しかしながら、興奮性シナプス伝達の伝達効率の増加が、興奮性伝達物質の放出確率上昇によるものか、或いは、放出可能シナプス小胞数の上昇によるものかは明確ではない。そこで本研究では、末梢性炎症疼痛モデルマウスおよび神経因性疼痛モデルマウスを使用し、前帯状回皮質における興奮性シナプス伝達の素量子解析を行い、シナプス前終末に生じる機能変化を明らかにすることを目的とした。

(2) 末梢性炎症疼痛モデルマウスの前帯状回皮質では、興奮性シナプス伝達の伝達効率増加が生じることが知られている。しかしながら、前帯状回皮質における局所神経回路の動作機構が、慢性疼痛刺激によりどのように変化するかは不明である。そこで光学的膜電位測定法を用い、局所神経回路の動作機構が、慢性炎症性疼痛刺激によりどのように変化するかを明らかにすることを目的とした。

(3) 末梢性炎症疼痛モデルマウスの前帯状回皮質では、興奮性シナプス伝達効率上昇および、それに伴って生じる興奮伝播の範囲増強が生じているものと想定される。そこで、前帯状回皮質における興奮性シナプス伝達効率上昇に寄与する細胞内情報伝達系を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 慢性疼痛モデルの作製

慢性炎症性疼痛モデルマウス

マウスの左後肢に Complete Freund's Adjuvant を注入することにより作製した。

神経因性疼痛モデルマウス

マウスの大腿中央部の坐骨神経を縫合糸で緩く絞捉することにより作製した。

(2) 興奮性シナプス後電流の解析

生後 5~6 週のマウスから、前帯状回皮質を含む厚さ 300 μm のスライス標本を作製し、第 3 層に存在する錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。テトロドトキシン存在下にて、微小興奮性シナプス後電流 (mEPSC) を記録した。また、タングステン電極を第 5 層に刺入し、低頻度 (0.1Hz) 刺激を与えることにより、電気刺激誘発性興奮性シナプス後電流 (eEPSC) を記録した。素量子解析により、放出確率および放出可能シナプス小胞数を計算した。

(3) 光学的膜電位測定法を用いた前帯状回皮質内興奮伝播様式の解析

前帯状回皮質を含むスライス標本を作製し、膜電位感受性色素 (RH-414) の負荷を行った。そして、前帯状回皮質第 3 層下部に刺激用の金属電極を刺入し、電極の先端が光学的信号撮影用 CCD カメラ (NeuroCCD-SM 、 RedShirtImaging 社製) の視野の中心に来る様にステージ位置を調整した。刺激用金属電極への通電に対して生じる興奮の伝播を、CCD カメラ (サンプリングレート 1 kHz、空間分解能 80 x 80 pixel = 1.6 x 1.6 mm) を用いて光学的に観察した。皮質の垂直方向および水平方向への伝播を定量的に解析するため、記録後オフラインで、光学的シグナルの経時的なプロフィール (スライス標本上のある線分に隣接したピクセルの信号強度をグラフ化したもの) を算出した。

(4) 前帯状回皮質において、興奮性シナプス伝達の伝達効率上昇に寄与する細胞内情報伝達系を明らかにするため、アデニル酸シクラーゼ I 型ノックアウト (AC1 KO) マウスを用いて、興奮性シナプス後電流の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 素量子解析により、末梢性炎症疼痛モデルマウスでは、興奮性伝達物質の放出確率および放出可能シナプス小胞数が共に増大していた。一方、神経因性疼痛モデルマウスでは、興奮性伝達物質の放出確率のみが増大しており、放出可能シナプス小胞数は変化していなかった。これらの結果から、疼痛モデル

の種類に応じて、シナプス前終末に生じる影響が異なることが明らかとなった。

(2) 光学的膜電位測定法を用い、慢性炎症性疼痛刺激により、局所神経回路の動作機構がどのように変化するかを検討した。その結果、野生型マウスおよび慢性疼痛モデルマウスの前帯状回皮質スライス標本ではともに、第3層下部刺激によって生じる興奮が第2/3層に垂直伝播し、そこから第2/3層内で、水平方向に伝播していた。しかしながら、慢性疼痛モデルマウスの前帯状回皮質では、野生型マウスに比べて、皮質第2/3層での水平方向への興奮伝播の範囲が大きく、その時間経過も延長していた。これらの結果から、慢性炎症性疼痛刺激により、前帯状回皮質においては、興奮伝播の増強が引き起こされる可能性が示唆された。

(3) アデニル酸シクラーゼ I 型ノックアウト (AC1 KO) マウスを用いて、興奮性シナプス伝達効率を検討した。その結果、末梢性炎症疼痛モデルマウスの前帯状回皮質においては、興奮性シナプス伝達の伝達効率増加が認められなかった。また、AC1 KO マウスに対して慢性炎症性疼痛モデルマウスを作製し、疼痛感受性の変化を検討した結果、疼痛閾値の低下が認められなかった。これらの結果から、末梢性炎症疼痛モデルマウスの前帯状回皮質において、AC1 が興奮性シナプス伝達の伝達効率上昇に寄与している可能性が示唆された。

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5件)

Saito, M., Tanaka, T., Sato, H., Toyoda, H., Aoyagi, T. and Kang, Y. A mathematical model of negative covariability of inter-columnar excitatory synaptic actions caused by presynaptic inhibition. *Eur. J. Neurosci.* 38: 2999-3007, 2013. DOI: 10.1111/ejn.12299. (査読有)

Sato, H., Toyoda, H., Saito, M., Kobayashi, M., Althof, D., Kulik, A. and Kang, Y. GABA_B receptor-mediated presynaptic inhibition reverses inter-columnar covariability of synaptic actions by intracortical axons in the rat barrel cortex. *Eur. J. Neurosci.* 37: 190-202, 2013. DOI:10.1111/ejn.12041. (査読有)

Tsukiboshi, T., Sato, H., Tanaka, Y., Saito, M., Toyoda, H., Morimoto, T., Turker, K.S., Maeda, Y. and Kang, Y. Illusion caused by

vibration of muscle spindles reveals an involvement of muscle spindle inputs in regulating isometric contraction of masseter muscles. *J. Neurophysiol.* 108, 2524-2533, 2012. DOI: 10.1152/jn.00997.2011. (査読有)

Saito, M., Toyoda, H., Kawakami, S., Sato, H., Bae, Y.C. and Kang, Y. Capsaicin induces theta-band synchronization between gustatory and autonomic insular cortices. *J. Neurosci.* 32, 13470-13487, 2012. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.5906-11.2012 (査読有)

Suzuki, A., Fukushima, H., Mukawa, T., Toyoda, H., Wu, L.J., Zhao, M.G., Xu, H., Shang, Y., Endoh, K., Iwamoto, T., Mamiya, N., Okano, E., Hasegawa, S., Mercaldo, V., Zhang, Y., Ohta, M., Josselyn, S.A., Zhuo, M. and Kida, S. Upregulation of CREB-mediated transcription enhances both short- and long-term memory. *J. Neurosci.* 31, 8786-8802, 2011. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3257-10.2011. (査読有)

〔学会発表〕(計10件)

Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Kanematsu, T., Hirata, M. and Kang, Y. Phospholipase C-related inactive protein regulates the phasic and tonic inhibition in the barrel cortex. The 11th Japan-Korea Joint Symposium of Brain Sciences, and Cardiac and Smooth Muscles, 2013, Sep. 6th, Hamamatsu.

Toyoda, H. and Kang, Y. Oscillatory neural synchronization between the gustatory and visceral insular cortices induced by activation of TRPV1 in the gustatory area. The 6th international conference of neurons and brain diseases, 2011, Aug. 3rd, Toyama.

Toyoda, H., Saito, M., Sato, H., Kanematsu, T., Hirata, M. and Kang, Y. Phospholipase C-related inactive proteins are involved in the regulation of phasic and tonic inhibition in the barrel cortex. The 43rd Society for Neuroscience, 2013, Nov. 11th, San Diego, USA.

豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元, 兼松隆, 平田雅人, 姜英男. PRIP1/2 蛋白の発現抑制はバレル皮質錐体細胞において一過性 GABA 抑制を強化する. 第55回 歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月21日, 岡山.

豊田博紀, 齋藤充, 佐藤元, 兼松隆, 平田

雅人, 姜英男 . バレル皮質錐体細胞において PRIP 遺伝子欠損により細胞外シナプス GABA_A 受容体の発現が増加する . 第 36 回日本神経科学大会, 2013 年 6 月 21 日, 京都.

豊田博紀, 小川丈夫, 佐藤元, 齋藤充, 兼松隆, 平田雅人, 姜英男 . バレル皮質錐体細胞において PRIP 遺伝子欠損により GABA_A 電流の鋭感作および再感作が増強する . 第 90 回日本生理学会大会, 2013 年 3 月 27 日, 東京.

Toyoda, H., Ogawa, T., Saito, M., Sato, H., Kanematsu, T., Hirata, M. and Kang, Y. Phospholipase C-related inactive protein resensitization of GABA_A receptor currents in the barrel cortex. The 42nd Society for Neuroscience, 2012, Oct. 14th, New Orleans, USA.

豊田博紀, 小川丈夫, 齋藤充, 佐藤元, 兼松隆, 平田雅人, 姜英男 . PRIP 遺伝子欠損によりバレル皮質錐体細胞における GABA_A 電流の脱感作および再感作が増強する . 第 35 回日本神経科学大会, 2012 年 9 月 18 日, 名古屋.

豊田博紀, 小川丈夫, 齋藤充, 佐藤元, 兼松隆, 平田雅人, 姜英男 . バレル皮質における GABA_A 受容体電流および興奮伝播に対する PRIP の役割 . 第 53 回歯科基礎医学会学術大会, 岐阜, 2011 年 10 月 2 日, 岐阜.

Toyoda, H., Hirao, K., Saito M., Sato, H and Kang, Y. cGMP differentially modulates leak K⁺ currents in masseter motoneurons. The 41th Society for Neuroscience, Washington, USA, 2011, Nov. 13th, Washington, USA.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

豊田 博紀 (Toyoda Hiroki)

大阪大学大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 00432451