

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590739

研究課題名(和文) 大脳皮質におけるGABA機能の慢性疼痛による変化とその意義の解明

研究課題名(英文) Changes of GABAergic function in primary somatosensory cortex under chronic pain conditions

研究代表者

石橋 仁 (Ishibashi, Hitoshi)

北里大学・医療衛生学部・教授

研究者番号：50311874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疼痛は数カ月を超えて持続する痛みであり、通常の鎮痛剤があまり効果的でないため、治療法開発にあたりその発症メカニズムの解明が強く望まれている。これまでの研究によって、慢性疼痛の発症には中枢神経の変化が関与すると考えられており、大脳皮質一次体性感覚野(S1)のニューロンの活動が過剰になることがその原因の一つとなっている可能性が示唆されている。本研究では、慢性疼痛時のS1の機能変化、特に抑制性伝達物質GABAの機能について検討を行い、細胞内クロライドイオン濃度が上昇することにより、GABA機能が低下して慢性疼痛が発生する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Previous studies indicate that plastic changes in the brain likely contribute to chronic pain syndrome. However, its mechanism remained to be clarified. In the present study, we investigated the excitatory and inhibitory synaptic transmission in the primary somatosensory cortex (S1) under chronic pain conditions. We also studied the functional properties of inhibitory neurotransmitter GABA. Excitatory synaptic transmission in the S1 were enhanced in the chronic pain model. Thus activities of not only excitatory but also inhibitory neurons were increased in the S1. On the other hand, a reduction in the function of the potassium-chloride cotransporter, KCC2, occurred during chronic pain, which reduces the efficacy of the inhibitory outputs onto the L2/3 excitatory neurons. Thus, the present results suggest that, the GABA-mediated inhibition is insufficient to completely counterbalance the increased excitation and alleviate the symptoms of chronic pain.

研究分野：生理学

キーワード：生理学 神経科学 慢性疼痛 GABA 神経回路 大脳皮質 パッチクランプ法

1. 研究開始当初の背景

神経回路の機能は、神経回路の活動自体により調節され、活動が活発であればその回路は強化される。末梢で生じた感覚情報は、脊髄や視床を経由して大脳皮質に伝達されるが、大脳皮質においても、視覚野や聴覚野などで、末梢からの感覚入力を遮断することによってシナプス機能が変化することが報告されている。また、四肢に生じた慢性痛で、末梢神経の活動を上昇させると、前帯状皮質 (ACC) や扁桃体における興奮性シナプス伝達に変化が起こることも報告されている (Zhao et al, J Neurosci 26; 8923-30, 2006; Ikeda et al, Pain 127: 161-72, 2007)。一方、大脳皮質一次体性感覚野 (S1) の“痛み”への関与については賛否両論あったが、最近の fMRI などのイメージング技術の発達によって、S1 の活動が“痛み”によって活発になっていることがわかってきた (Endo ら、Pain 138, 292-300, 2008 など)。しかし、そのメカニズムと意義は十分には解明されていない。

研究代表者は従来から、培養神経細胞、脳スライスを用いたパッチクランプおよび神経終末部が附着した状態で急性単離した神経細胞を用いて、神経細胞の興奮性制御機構ならびに単一神経終末部からの神経伝達物質放出機構に関する研究を行ってきた。最近になって、2光子顕微鏡を用いたインビボイメージングやインビボ電気生理、行動薬理学などと組み合わせることにより、complete Freund's adjuvant (CFA) を投与した慢性疼痛モデルマウスでは、大脳皮質 S1 の興奮性が変化していることがわかってきた。この一つのメカニズムとして、後足に CFA を投与した慢性疼痛モデルマウスでは、第 4 層 第 2 層錐体細胞の興奮性シナプス後電流 (EPSC) が増強されており、paired pulse ratio の解析からグルタミン酸放出が増強されていることが明らかとなっている。また、正常ではほとんど影響を与えないグルタミン酸受容体拮抗薬を S1 に投与すると、アロディニアの症状が改善されることから、S1 がアロディニアの発現に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、慢性疼痛時に GABA 機能に変化があるかは全く不明である。

GABA(A) 受容体には、速い抑制性シナプス伝達を担うシナプス性 GABA(A) 受容体と持続性抑制を担うシナプス外 GABA(A) 受容体があり、シナプス外 GABA(A) 受容体は、GABA 感受性が高く持続性電流を形成する (石橋ら J Neurochem 2010、Br J Pharmacol 2011、など)。また、GABA による抑制 (過分極) は、細胞内 Cl^- 濃度に依存し、細胞内 Cl^- 濃度が高くなると GABA による過分極が抑制される。中枢神経細胞の場合、細胞内 Cl^- 濃度は、 Cl^- を汲み入れる Na-K-Cl Co-transporter 1 (NKCC1) と細胞外へ Cl^- を排出する K-Cl-Cotransporter 2

(KCC2)、 Cl^-/HCO_3^- 交換輸送体などによって調節されており、神経線維の切断や虚血などの障害によって、これらの輸送機能が修飾されて細胞内 Cl^- 濃度が変化することが報告されている (Wake ら J Neurosci 27:1642-50, 2007 など)。GABA の神経細胞抑制作用には、KCC2/NKCC1 による細胞内 Cl^- 濃度調節は重要で、ホールセルパッチ法を用いた予備実験で樹状突起の Cl^- 濃度が高くなっていることを示唆する知見が得られているが、そのメカニズムや意義は全く不明である。

2. 研究の目的

本研究では、慢性疼痛時の大脳皮質一次体性感覚野で生じる GABA(A) 受容体の機能変化とそのメカニズムを解明するとともに、その意義を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

慢性疼痛モデル動物として、Complete Freund's adjuvant (CFA) を右後肢足底に投与した慢性モデルマウスと、右坐骨神経を部分的に結紮したモデルマウスの 2 種類のモデルマウスを用いて研究を遂行した。なお全てのマウスは von Frey hair を用いた機械刺激の閾値を測定して実験に用いた。

CFA の投与および坐骨神経の結紮はイソフルラン吸入麻酔下に行った。脳神経細胞のシナプス電流の解析は脳薄切片 (スライス) を用いたパッチクランプ法で行った。

インビボにおけるニューロンの活動は、2光子励起レーザー顕微鏡を用いたインビボイメージングで行った。脳への薬物の長期投与は、ELVAX を利用した徐放性シートを脳表へ貼り付けることで行った。

4. 研究成果

まず、慢性疼痛モデルとして CFA を用いた慢性疼痛モデルマウスを用いて実験を行った。図 1 にホールセルパッチ法で記録した大脳皮質一次体性感覚野第 2/3 層錐体細胞の興奮性シナプス後電流 (EPSC) を示す。なお、実験は、右後足の慢性痛モデルに対して、左脳の大脳皮質で検討を行った。EPSC の記録は保持電位 $-70mV$ で行った。また、EPSC は記録中の細胞から約 $50\mu m \sim 200\mu m$ 離れた位置に設置した双極刺激電極からの刺激により誘発した。その結果、CFA モデル動物において、EPSC が大きく、また、paired pulse ratio が小さかった。この結果から、慢性疼痛によって興奮性シナプスの機能が強化され、神経回路活動が高まっていることが示唆された。

近年の生体機能分子の可視化技術と組み合わせた研究から、慢性疼痛モデル動物の脳機能イメージングも行われており、特に、2光子励起顕微鏡を用いることによって、実験動物が活着している状態で、脳表面から約 $1mm$ の深部まで神経細胞やグリア細胞の構造や

活動を観察することが出来る様になった。なお、マウスの場合、1 mm で大脳皮質の表層から5層までを十分にカバーすることが出来る。この2光子励起顕微鏡を用い、細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を指標として *in vivo* で正常およびCFAモデル動物の大脳皮質一次体性感覚野の活動を観察したところ、CFAモデル動物の活動が高かった。この結果は、図1の結果と矛盾しないことから、CFA慢性疼痛モデルマウスにおいても大脳皮質一次体性感覚野の活動が活発になっていることがわかった。

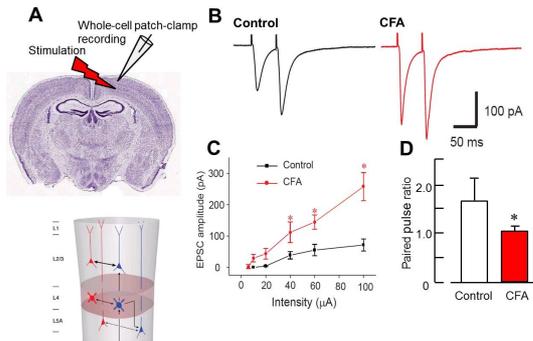


図1. 大脳皮質一次体性感覚野第2/3層における興奮性シナプス後電流 (EPSC) の性質。

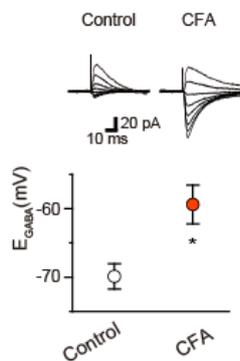


図2. 抑制性シナプス後電流 (IPSC) とその逆転電位。CFAモデルで逆転電位が脱分極側にシフトした。

慢性疼痛モデルマウスの一次体性感覚野に、グルタミン酸受容体拮抗薬 (CNQX) を投与して神経活動を抑制すると、慢性痛の症状が著明に回復した。一方、正常なマウスの一次体性感覚野に GABA 受容体拮抗薬 (gabazine) を投与して神経活動を活発化させると、機械的刺激に対する逃避行動閾値が低下し、慢性痛の症状が現れた。これらの結果から、傷害や炎症などにより末梢神経系の活動が活発となると、それが大脳皮質の可塑的变化を誘発して痛みが慢性化するという可能性が示唆された。

慢性疼痛モデルマウスでは、一次体性感覚野の神経細胞の活動はなぜ高まるのであろうか。図2は、右後足に慢性疼痛が生じたマウスから一次体性感覚野を含む脳薄切片 (ス

ライス) を作り、グラミシジン穿孔パッチ法を適用して記録した抑制性シナプス後電流 (IPSC) の記録である。グラミシジン穿孔パッチ法を用いることによって、細胞内 Cl^- 濃度を細胞固有の状態に保ったままパッチクランプ記録を行うことが出来る。

図2に示す様に、CFA慢性疼痛モデルでは、IPSCの逆転電位が脱分極側にシフトしており、細胞内 Cl^- 濃度が上昇していることがわかった。この原因を調べてみると、細胞内から Cl^- を排出する $K^+ - Cl^-$ 共輸送体 (KCC2) の発現が減少していた。すなわち、細胞内 Cl^- 濃度の増加によって、抑制性神経伝達物質 GABA の神経細胞に対する抑制作用が弱まり、神経回路活動が活発になっていることがわかった。

神経回路活動が活発になった場合、細胞内 Cl^- 濃度は上昇するのであろうか? この疑問に答えるために、インビトロでモデル実験を行った。図3にその結果を示す。高頻度の EPSC 入力を行うとムシモール誘発電流の逆転電位が長時間にわたって脱分極側にシフトした。すなわち、神経回路の活動が活発になることによって細胞内 Cl^- 濃度が上昇することがわかった。

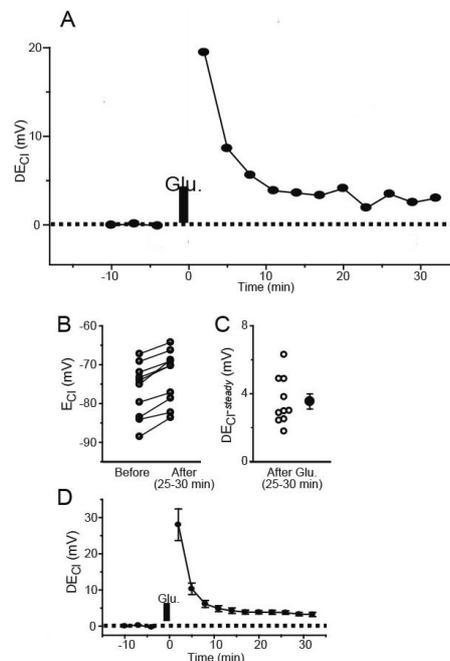


図3. ムシモール (GABA 受容体アゴニスト) で誘発される電流の逆転電位のグルタミン酸入力による変化。

この細胞内 Cl^- 濃度上昇は、GABA の抑制力を弱めることになる。そこで、次にこの GABA の抑制力が弱まることによって慢性疼痛が影響を受けるか否か検討を行った。

通常、CFA を投与した慢性疼痛モデルマウスや坐骨神経を傷害した慢性疼痛モデルマウスでは、傷害を与えた足のみにアロディニア (異痛症) が発症する。一方、後足の坐骨神経を傷害した後、同側の大脳皮質 S1 に低

濃度の GABA 拮抗薬 (gabazine) を 1 週間だけ持続投与することにより、傷害を与えていない足にも慢性的なアロディニアが発症することがわかった。従って、大脳皮質の変化により慢性痛が発生する可能性のあることが示唆された。

この動物には、傷害を与えていない足から大脳皮質までの感覚経路に人工的な傷害を全く与えていないので、このアロディニアは純粋に大脳皮質一次体性感覚野の変化により生じたアロディニアと考えられる。しかし、1) gabazine を投与することによる大脳皮質 S1 の変化とその機序、2) 大脳皮質 S1 の変化によって慢性的なアロディニアが生じる原因、については全く明らかになっていない。今後、これらの問題点を解決することにより、疼痛の原因と制御に関して新たな概念を提唱できると考えている。なお、これまで慢性疼痛に関しては様々な研究が行われてきたが、未だ明快な治療法は存在しないことから、本研究の成果をいかして、これらの課題を早急に解決し、慢性痛治療への新たな戦略への突破口を開きたいと考えている。

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 7 件)

Hirayama M, Ogata M, Kawamata T, Ishibashi H. Muscarinic receptor-mediated excitation of rat intracardiac ganglion neurons. *Neuropharmacology*. 95:395-404, 2015. 査読有 .

doi:
10.1016/j.neuropharm.2015.04.014.

Ogata M, Noda K, Akita H, Ishibashi H. Characterization of nociceptive response to chemical, mechanical, and thermal stimuli in adolescent rats with neonatal dopamine depletion. *Neuroscience* 289, 43-55, 2015. 査読有 .

doi:
10.1016/j.neuroscience.2015.01.002.

Oyama TM, Oyama K, Fukunaga E, Ishibashi H, Oyama Y. Clioquinol, a lipophilic Zn²⁺ chelator, augments and attenuates the cytotoxicity of H₂O₂: a bell-shaped response curve of the effects of the drug. *Toxicology Research* 3, 110-117, 2014. 査読有 .
DOI: DOI: 10.1039/C3TX50097G (Paper)

石橋 仁, 江藤 圭, 鍋倉 淳一, 慢性疼痛による大脳皮質神経回路の機能的変化. *神経眼科* 31, 36-38, 2014. 査読無 .
<http://doi.org/10.11476/shinkeiganka.31.36>

Ishibashi H, Witt MR, Nabekura J, Nielsen M. Modulation of diazepam-insensitive GABA(A) receptors by micromolar concentrations of thyroxine and related compounds in vitro. *Brain Research* 1490, 1-8, 2013. 査読有 .
doi: 10.1016/j.brainres.2012.10.038.

Ishibashi H, Yamaguchi J, Nakahata Y, Nabekura J. Dynamic regulation of glycine-GABA co-transmission at spinal inhibitory synapses by neuronal glutamate transporter. *Journal of Physiology* 591, 3821-3832, 2013. 査読有 .
doi: 10.1113/jphysiol.2012.250647.

Eto K, Ishibashi H, Yoshimura T, Watanabe M, Miyamoto A, Ikenaka K, Moorhouse AJ, Nabekura J. Enhanced GABAergic activity in the mouse primary somatosensory cortex is insufficient to alleviate chronic pain behavior with reduced expression of neuronal potassium-chloride cotransporter. *Journal of Neuroscience* 32, 16552-16559, 2012. 査読有 .
doi: 10.1523/JNEUROSCI.2104-12.2012

[学会発表](計 15 件)

石橋 仁, 平山 三智子, 緒形 雅則. 心臓神経節細胞におけるムスカリンの興奮作用. 第 120 回日本解剖学会総会 第 92 回日本生理学会大会 合同大会. 2015 年 3 月 21-23 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

野田 和子, 緒形 雅則, 秋田 久直, 石橋 仁. 関節の不動化は痛覚閾値および痒み感覚を変容させる. 第 92 回日本生理学会大会 合同大会. 2015 年 3 月 21-23 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

緒形 雅則, 野田 和子, 秋田 久直, 阿久津 早紀, 石橋 仁. 幼若期ドーパミン神経系傷害が成熟後の痒み並びに痛み関連反応におよぼす影響. 第 92 回日本生理学会大会 合同大会. 2015 年 3 月 21-23 日. 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

石橋 仁, 山口純弥, 中畑義久, 鍋倉淳一. 抑制性シナプスにおけるグルタミン酸トランスポーターの役割. 第 91 回日本生理学会大会. 第 91 回日本生理学会大会. 2014 年 3 月 16-18 日. 鹿児島大学・郡元キャンパス (鹿児島県鹿児島市).

石川達也、石橋 仁、鍋倉淳一．大脳皮質一次体性感覚野のミラーイメージングペイン発症における役割．第 91 回日本生理学会大会．第 91 回日本生理学会大会．2014 年 3 月 16-18 日．鹿児島大学・郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）．

野田和子、緒形雅則、秋田久直、石橋 仁．関節の不動化により誘発される痛覚閾値低下は痛みの情動反応に影響を与える．第 91 回日本生理学会大会．第 91 回日本生理学会大会．2014 年 3 月 16-18 日．鹿児島大学・郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）．

緒形雅則、野田和子、秋田久直、戸田 諭、石橋 仁．幼若期ドーパミン神経傷害は成熟後の不安関連行動の減少をもたらす．第 91 回日本生理学会大会．2014 年 3 月 16-18 日．鹿児島大学・郡元キャンパス（鹿児島県鹿児島市）．

Ishibashi H, Eto K, Ishikawa T, Nabekura J. Changes of GABA_A receptor function in the primary somatosensory cortex by persistent pain. Neuro2013. Jun20-23, 2013. 京都国際会議場（京都府京都市）．

石川達也、石橋 仁、鍋倉淳一．大脳皮質一次体性感覚野の慢性疼痛における役割．第 90 回日本生理学会大会．2013 年 3 月 27-29 日．タワーホール船堀（東京都）．

Ishibashi H, Yamaguchi J, Nakahata Y, Nabekura J. Dynamic regulation of glycine/GABA cotransmission at inhibitory synapse. 第 90 回日本生理学会大会．2013 年 3 月 27-29 日．タワーホール船堀（東京都）．

Ishibashi H. Dynamic regulation of glycine/GABA cotransmission at spinal inhibitory synapses via neuronal glutamate transporter. Nagoya University Global COE Program, The 4th International Symposium. 2012 年 11 月 15-16 日．Westin Nagoya Castle（愛知県名古屋市）．

石橋 仁、山口純弥、中畑義久、鍋倉淳一．抑制性シナプスにおける GABA/グリシンスイッチングに関する電気生理学的解析．第 59 回中部日本生理学会．2012 年 11 月 15-16 日．岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）．

石橋 仁、山口純弥、中畑義久、鍋倉淳一．抑制性シナプスにおける伝達物質スイッチングに関する電気生理学的研究．第三回名古屋大学医学系研究科生理学研究所

合同シンポジウム．2012 年 9 月 29 日．岡崎コンファレンスセンター（愛知県岡崎市）．

石川達也、石橋 仁、金 善光、加藤 剛、鍋倉淳一．大脳皮質が慢性疼痛の形成および維持に果たす役割とその機序の解明．第 14 回応用薬理シンポジウム．2012 年 9 月 3 - 4 日．ベルクラシック甲府（山梨県甲府市）．

石橋 仁、江藤 圭、鍋倉淳一．神経回路活動依存的な抑制性シナプス機能の変化とその慢性痛への関与．第 14 回応用薬理シンポジウム．2012 年 9 月 3 - 4 日．ベルクラシック甲府（山梨県甲府市）．

6．研究組織

(1)研究代表者

石橋 仁（ISHIBASHI, Hitoshi）
北里大学・医療衛生学部・教授
研究者番号： 5 0 3 1 1 8 7 4

(2)研究協力者

山口 純弥（YAMAGUCHI, Junya）

中畑 義久（NAKAHATA, Yoshihisa）

江藤 圭（ETO, Kei）

石川 達也（ISHIKAWA, Tatsuya）