

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：63905

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21603

研究課題名(和文)慢性疼痛における細胞外マトリックスによる脳神経回路再編機構の解明

研究課題名(英文)The role of extracellular matrix in cortical neuronal circuit remodeling in chronic pain

研究代表者

江藤 圭(Eto, Kei)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・助教

研究者番号：30545257

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経傷害で誘発される慢性疼痛では一次体性感覚野興奮性神経細胞のシナプスの再配置が起きた後、新たな回路が固定化され、これにより慢性疼痛が維持される。本課題では慢性疼痛時のシナプスの再配置および、神経回路の固定化への細胞外マトリックス構造及び、アストロサイトの関与を明らかにすることを目的とする。実験の結果、末梢神経傷害によりアストロサイトが活性化することにより神経可塑性が亢進することが明らかになった。また、アストロサイト活性化に加え神経活動の入力により神経回路が再編し、疼痛行動が誘発されることも明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In the chronic pain, which is induced by peripheral nerve injury, the cortical neuronal circuit reorganizes in the primary somatosensory cortex (S1), which in turn cause chronic pain-like behavior. The aim of this study is to clarify whether extracellular matrix and astrocytes contribute to neuronal circuit remodeling observed in the S1 in chronic pain. In the present study, we elucidated that astrocytes are involved in enhancement of neuronal plasticity in the S1 after nerve injury. Moreover, enhanced neuronal inputs can induce cortical neuronal circuit remodeling with astrocytic activation, leading to chronic pain-like behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：慢性疼痛 一次体性感覚野 アストロサイト

1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は末梢組織の炎症や末梢神経系の損傷がきっかけとなって生じ、その発生・維持過程に脊髄、大脳皮質の異常が関与していることが示唆されている。大脳皮質の中でも一次性感覚野(S1)は痛みの強度、部位、刺激時間を認知するのに重要な役割を担っており、慢性疼痛時には、S1 興奮性神経細胞活動が亢進すると共に、抑制性神経細胞による抑制力が減弱し、興奮・抑制バランスの破綻が起きることによって疼痛行動が惹起されることが2光子顕微鏡を用いた in vivo イメージング研究により明らかにされている(申請者, 2011 J Neurosci; 申請者, 2012 J Neurosci)。また、末梢神経傷害による慢性疼痛モデルにおいては、傷害後1週間以内(慢性疼痛発達期)の疼痛行動が増強する時期に、S1 内でシナプス構造が劇的に変化し、傷害前に存在していたシナプスの消失が亢進し、傷害後に新たなシナプスが多数形成される。一方、傷害後1週間以降(慢性疼痛維持期)の疼痛行動が維持される時期には、シナプス構造の変化は正常レベルまで戻る。シナプス構造の変化と疼痛行動の関係から、慢性疼痛発達期においては、神経回路の組み換えが活発に起きると共に痛みが増強し、維持期には疼痛関連神経回路が固定化され、慢性疼痛行動が維持されることが明らかになった(Kim and Nabekura, 2011)。しかし、このような神経回路の再編成・固定化が起きる仕組みは不明であった。この神経回路の劇的な変化を誘導している物質的基盤の可能性の一つとして、細胞外マトリックス構造の関与が考えられる。細胞外マトリックス構造はプロテオグリカンや基質蛋白質を主成分とし、脳神経細胞が形成するネットワークを覆っており、成熟脳の安定化・維持に重要な役割を担うことがわかっている。細胞外マトリックス成分は神経突起の伸長・再生を抑制するものと考えられており、幼若脳から成熟脳への遷移に伴う細胞外マトリックス成分のダイナミックな変化が起きることで、脳の可塑性が制御される。細胞外マトリックスの主な構成成分であるコンドロイチン硫酸プロテオグリカンは神経細胞の周辺に集積し、ペリニューロナルネット(Perineuronal net:PNN)という特殊な構造を形成する。PNN は幼若期には少なく、発達に伴い増加し、神経回路の安定化に寄与する。一方、成熟マウス脳の PNN を分解することで、シナプス構造の不安定化や可塑性の増大が誘導される(Pizzorussoら,2002)。このことから、PNN は大脳皮質可塑性に対して抑制的に働き、神経回路の可塑性が PNN に規定されることが示されている。生体内において、細胞外マトリックス構造の調節機構としてグリア細胞であるアストロサイトの関与が考えられる。アストロサイトは、神経活動を調節するだけでなく、発達期や障害時に細胞外マトリックス構造を分解するプロテアーゼを放出することで、細胞外

環境を調節する役割を担う(Muirら,2002)。申請者は2光子顕微鏡を用いたアストロサイト活動の in vivo イメージングの予備実験から、S1 アストロサイト活動が慢性疼痛モデルで亢進することを確認していた。これらのことから、慢性疼痛発達期に、細胞外マトリックスである PNN が活性化アストロサイトにより分解されることで神経回路の可塑性が亢進し、疼痛関連回路が形成され、疼痛行動が悪化するのではないかと仮説を立てた。そこで、2光子顕微鏡を用いた in vivo イメージング法により、シナプス構造の変化および、神経活動変化を観察するとともに、電気生理学的手法、免疫組織化学的手法、行動薬理学的手法を組み合わせてこの仮説を検証した。また、本課題ではアストロサイトが有する神経回路の可塑性亢進機能についても検討した。

2. 研究の目的

慢性疼痛は中枢神経系における神経細胞の異常活動によって生じる。近年、脊髄のみならず、大脳皮質も慢性疼痛処理に関与することが分かってきた。慢性疼痛時には S1 興奮性神経細胞のシナプスの再配置が起きた後、新たな回路が固定化され、これにより慢性疼痛が維持される。しかし、新たに疼痛回路が形成・固定化される機構は不明である。脳神経回路の可塑性を制御する分子及び、細胞として細胞外マトリックス構造とアストロサイトの関与が考えられる。そこで、本課題では慢性疼痛時のシナプスの再配置および、神経回路の固定化への細胞外マトリックス構造の関与及び、アストロサイトによる可塑性制御機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

2光子顕微鏡を用いた生きたマウス脳のシナプス、活動イメージングを行う。大脳皮質神経細胞特異的にEGFPを発現するThy1-EGFPマウスを用いてシナプス構造の繰り返し観察を行う。同一固体の同一シナプスの長期観察は、1ヶ月以上可能である。神経、アストロサイト活動は Oregon Green 488 BAPTA-1 AM(OGB)による染色、またはアデノ随伴ウイルス(AAV)を用いてカルシウム感受性蛍光タンパク質 GCaMP6f を発現させることで観察した。

アストロサイト活動抑制には、アストロサイトの細胞内カルシウム濃度を調整する IP3 受容体タイプ 2(IP3R2)ノックアウトマウス、アストロサイト代謝抑制剤フルオロアセテートを使用した。

細胞外マトリックス構造の主成分である PNN はレクチン抗体を用いて染色し、コンフォーカル顕微鏡を用いて観察した。

痛み行動は、von Frey filament による機械刺激に対する逃避閾値を計測することで、評価した。

また、アストロサイトの人為的活性化は DREADD システムを使用した。具体的には、グリア細胞特異的に変異型ムスカリン受容体 hM3D を発現させた遺伝子改変マウスを用いる。hM3D は特定のリガンド CNO のみに応答するため、マウスに CNO 投与することで標的細胞を活性化することができる。

4. 研究成果

慢性疼痛時には、末梢からの過剰入力により S1 興奮性神経細胞活動が亢進すると共に、シナプス再編成が起き、疼痛関連神経回路が構築されることで疼痛行動が惹起される。また、この現象に活性化アストロサイトが寄与することが示唆されている。そこで、本課題では、末梢神経傷害後 S1 で、可塑性を制御するペリニューロナルネット (PNN) が活性化アストロサイトにより分解されることで神経回路の可塑性が亢進し、疼痛関連神経回路が形成され、疼痛行動が悪化するのではないかと仮説を立て、この現象を検証することを目的とする。また、アストロサイト活動制御が可塑性を亢進させ入力依存性に神経回路再編を起こす観点から、アストロサイト活性化と神経活動操作を組み合わせることで新たな神経回路を構築することで疼痛行動を変えうるか検討した。

平成 27 年度はまず慢性疼痛による PNN の発現変化について検討した。固定脳より脳スライスを作成し、PNN を WFA レクチン抗体を用いて染色した。その結果、一次性感覚野だけでなく、皮質全体に広く分布していることが明らかになった。正常群と慢性疼痛群とで PNN の発現が変化するかについては現在解析中である。また、アストロサイトが可塑性を変化させうるかを検証するために、アストロサイトの人為的活性化による行動制御についても検討した。AAV を用いてヒト変異型ムスカリン受容体 hM3D をアストロサイト特異的に発現させ、リガンドである CNO 投与により人工的に活性化させる系 (DREADD 法) を構築した。GCaMP6f を AAV でアストロサイトに発現させ、CNO でアストロサイトが活性化するか検討した。その結果、CNO 投与から 3-4 分後にアストロサイトの細胞内カルシウム濃度が増加することを確認した。この系を用いて、S1 でアストロサイトを活性化し、神経回路の可塑性を亢進させつつ神経活動を操作することで疼痛行動が変化するか検討した。その結果、CNO 投与中に神経活動を操作することにより行動が変化しうる予備データを取得した。

平成 28 年度は、27 年度の研究を継続しつつ、研究の過程で発見したアストロサイトの活動亢進による神経回路可塑性亢進と疼痛発症について研究を行った。具体的には、坐骨神経傷害後、傷害と同側 S1 においてアストロサイトの活動が活性化することを、2 光子顕微鏡を用いたカルシウムイメージングにより見出した。一方、神経細胞活動につい

て同様にカルシウムイメージングで検討したところ、末梢神経損傷と同側 S1 では抑制性神経細胞活動が亢進し、興奮性神経細胞活動は亢進していなかった。このことから、抑制性神経細胞活動が増加することで、興奮性神経活動が抑制されることが示唆された。次に、この抑制性神経細胞活動の亢進の機能的意義についてより詳細に検討した。坐骨神経傷害後、同側 S1 に GABAA 受容体阻害剤 Gabazine を徐放性ポリマー Elvax を用いて長期投与し、神経活動への影響を検討した。その結果、神経活動は Gabazine 投与後も亢進し、可塑的变化を起こした。また、シナプス構造を 2 光子顕微鏡を用いて繰り返しイメージングすると、脱抑制により、シナプス構造が劇的に変化することを明らかにした。一方、Sham 群に対して Gabazine 投与しても、シナプスの再編成は誘導されなかった。このことから、脱抑制誘発性シナプス再編成には、神経活動の亢進だけでなく他の要因も重要であることが示唆された。さらに、この脱抑制による神経活動亢進、シナプス再編の疼痛行動への影響を検討した。その結果、長期脱抑制により慢性疼痛様の症状 (アロディニア) が惹起され、Gabazine の効果が切れた後もアロディニア様行動が持続した。一方、Sham 群では Gabazine 投与後のアロディニアの持続は観察されなかった。最後に、シナプス構造の変化及び、疼痛行動はアストロサイトの活動抑制により抑制されることを明らかにした。これらの結果から、アストロサイトが活性化することで、皮質神経回路の可塑性が亢進し、興奮性入力に依存して新たに疼痛関連神経回路が形成され、痛みが生じることが示唆された。この機構に細胞外マトリックスが寄与するか今後検討予定である。

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)

Nakahata Y, Eto K, Murakoshi H, Watanabe M, Kuriu T, Hirata H, Moorhouse AJ, Ishibashi H, Nabekura J. Activation-Dependent Rapid Postsynaptic Clustering of Glycine Receptors in Mature Spinal Cord Neurons. *eNeuro*. 査読有, 2017 ;4(1). pii: ENEURO.0194-16.2017.

Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun*. 査読有, 2016 ;7:12540.

Kato G, Inada H, Wake H, Akiyoshi R, Miyamoto A, Eto K, Ishikawa T, Moorhouse AJ, Strassman AM, Nabekura J. Microglial Contact Prevents Excess Depolarization and Rescues Neurons from Excitotoxicity. *eNeuro*. 査読有, 2016 ;3(3). pii: ENEURO.0004-16.2016.

Takahara Y, Inatani M, Eto K, Inoue T, Kreymerman A, Miyake S, Ueno S, Nagaya M, Nakanishi A, Iwao K, Takamura Y, Sakamoto H, Satoh K, Kondo M, Sakamoto T, Goldberg JL, Nabekura J, Tanihara H. In vivo imaging of axonal transport of mitochondria in the diseased and aged mammalian CNS. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 査読有, 2015 ;112(33):10515-10520.

Hirao K, Eto K, Nakahata Y, Ishibashi H, Nagai T, Nabekura J. Noradrenergic refinement of glutamatergic neuronal circuits in the lateral superior olivary nucleus before hearing onset. *J Neurophysiol*. 査読有, 2015 ;114(3):1974-1986.

Ieda N, Hishikawa K, Eto K, Kitamura K, Kawaguchi M, Suzuki T, Fukuhara K, Miyata N, Furuta T, Nabekura J, Nakagawa H. A double bond-conjugated dimethylnitrobenzene-type photolabile nitric oxide donor with improved two-photon cross section. *Bioorg Med Chem Lett*. 査読有, 2015;25(16):3172-3175.

江藤 圭, 鍋倉 淳一. “2光子顕微鏡による大脳皮質のシナプス再編の生体内解析” *Clinical Neuroscience*, 査読無, 2015; vol.33(6). 634-638

[学会発表](計12件)

Kei Eto, Tatsuya Ishikawa, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Contribution of inter-regional regulation of primary somatosensory cortical functional change in chronic pain 日本生理学会 2017/3/29 アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)シンポジウム

江藤 圭, 鍋倉 淳一. 一次体性感覚野における温度センシング機構 AMED-CEST 合同会議 2017/2/8 甲州ぶどうの丘(山梨県・甲府市)口頭

江藤 圭, 石川 達也, 鍋倉 淳一. 慢

性疼痛における一次体性感覚野興奮・抑制バランスの役割. 痛み研究会 2016 2017/1/31 岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)口頭

江藤 圭, 金 善光, 鍋倉 淳一. 慢性疼痛モデルマウスにおける大脳皮質体性感覚野神経回路再編とグリア機能. 第31回日本整形外科学会基礎学術集会 2016/10/13 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)シンポジウム

Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Disruption of balance between excitation and inhibition in the primary somatosensory cortex contributes to chronic pain. The 13th Japan-Korea Joint Symposium on Brain Science, and Cardiac and Smooth Muscles. 2016/8/25 佐賀大学(佐賀県・佐賀市)ポスター

Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Attenuation of GABA inhibition due to down regulation of K-Cl cotransporter 2 in the primary somatosensory cortex accelerates chronic pain. The 39th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society. 2016/7/21 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)ポスター

Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. The role of inhibitory neurons in the primary somatosensory cortex in chronic pain. The 93rd Annual Meeting of the Physiological Society of Japan. 2016/3/23 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)ポスター

江藤 圭. 慢性疼痛における一次体性感覚野神経回路の変容機構. 第5回新潟脳研 - 生理研合同シンポジウム 2016/3/1 岡崎コンファレンスセンター(愛知県・岡崎市)口頭

江藤 圭. 慢性疼痛における皮質興奮-抑制バランス破綻の役割と新たな疼痛抑制機構の創出. AMED-Crest 合同ミーティング 2016/1/28 甲州ぶどうの丘(山梨県・甲府市)口頭

Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Disruption of balance between excitation and inhibition in the primary somatosensory cortex contributes to chronic pain, FAOPS 2015, 2015/11/24 Bangkok, Thailand,

ポスター

Kei Eto, Hitoshi Ishibashi, Junichi Nabekura. Imbalance between excitation and inhibition in the primary somatosensory cortex accelerates chronic pain. 5th NIPS-CIN Joing Symposium, 2015/11/5 岡崎コンファレンスセンター（愛知県・岡崎市）ポスター

江藤 圭、石川 達也、石橋 仁、鍋倉 淳一. 大脳皮質半球間抑制の慢性疼痛における役割. 第5回 名古屋大学・生理学研究所合同シンポジウム 2015/9/19 岡崎コンファレンスセンター（愛知県・岡崎市）ポスター

〔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

江藤 圭 (ETO, Kei)

生理学研究所・基盤神経科学研究領域・
助教

研究者番号： 30545257