

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02897

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛における脊髄・脳連関の生理学的解析およびグリア細胞活性化機構の解明

研究課題名(英文) Physiological analysis of spinal cord-brain coupling in neuropathic pain and elucidation of glial cell activation mechanism.

研究代表者

紙谷 義孝 (Kamiya, Yoshinori)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：90381491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では知覚の中継地点である脊髄後角や終点である大脳皮質1次知覚野における神経興奮の生理学的変化をフラビン蛋白蛍光イメージング法及びin vivoパッチクランプ法を用い、神経障害後の経時的に測定した。疼痛閾値は神経障害後一貫して低下したが、大脳皮質における興奮は経時的に増大する一方、脊髄における興奮はむしろ低下傾向にあることが明らかになった。パッチクランプ法により、脊髄における興奮性及び抑制性シナプス伝達は経時的にダイナミックに変化することが明らかになった。脊髄後角でのシナプス伝達の変化はアストロサイトの抑制により抑制できたが、異なる慢性疼痛モデルではアストロサイトの抑制は効果がなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は難治性慢性疼痛の代表的なものだが、受容する神経回路でどのように成立・維持されているのか解明の余地があった。本研究では生理学的実験手法を用い、大脳皮質1次知覚野と脊髄後角では神経興奮の経時的な変化に違いがあることが初めて明確に示すことができ、脊髄後角における興奮性及び抑制性のシナプス伝達のインバランスが生じ、長期的には抑制性シナプス伝達が強く抑制されることが明らかになった。アストロサイトの活性化と慢性疼痛の関連については、これまでの報告通りに神経障害性疼痛では有効だったが、オピオイドによる痛覚過敏のような異なるモデルでは無効で、成因による疼痛維持機構の違いの一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this study, physiological changes in neuronal excitation in the spinal dorsal horn, the relay point of perception, and in the primary sensory cortex, the endpoint of perception, were measured longitudinally after peripheral nerve injury using flavoprotein fluorescence imaging and in vivo patch-clamp techniques. Although pain thresholds were consistently lowered after peripheral nerve injury, excitation in the cerebral cortex increased over time, while excitation in the spinal cord tended to decrease. The patch-clamp technique revealed that excitatory and inhibitory synaptic transmission in the spinal cord changes dynamically over time. The changes in synaptic transmission in the dorsal horn of the spinal cord could be suppressed by astrocyte inhibition, but astrocyte inhibition was ineffective in different chronic pain models.

研究分野：疼痛科学

キーワード：神経障害性疼痛 脊髄・脳連関 フラビン蛋白蛍光イメージング法 in vivoパッチクランプ法 グリア活性化 セロトニン

1. 研究開始当初の背景

末梢神経障害に伴い、脊髄後角の神経の易興奮性およびシナプス可塑性が増強し、痛覚伝達を増幅させることがモデル動物を用いた研究からわかっているが、同時に前帯状回や扁桃体など中枢でのシナプス伝達も増強することが明らかになってきている。

炎症や組織障害、末梢神経障害に伴う脊髄後角の神経活動は、パッチクランプ法や細胞外記録法などの電気生理学的手法により増強されることがわかっている。しかし我々は、脊髄後角および大脳皮質での神経活動を生きたままの動物から記録できるフラビン蛋白蛍光イメージング法 (flavoprotein autofluorescent imaging: FAI) を用いることで、炎症性物質を足底に投与した時には脊髄後角、大脳皮質での神経活動がともに増強するのに対して、末梢神経障害モデルマウスでは、大脳皮質の神経活動は増強するのに対して、脊髄後角における神経活動はむしろ減弱しているという、予想外の反応が見られた。末梢神経障害に伴い、正常であれば痛みと感じない程度の刺激によっても痛みと感じる知覚異常 (アロディニア) が生じるが、これまで知覚の伝達に関与する神経の異常興奮による結果と考えられていたため、これまでの概念は我々の得たデータとは矛盾する。

末梢神経障害に伴う異常知覚には、神経細胞のみならず、グリア細胞も重要な役割を果たしているとの報告が多い。末梢神経障害に伴うミクログリアの活性化がよく知られているが、神経障害性疼痛が完成する時期においてはグリア細胞の一種であるアストロサイトの活性化が重要なことが明らかになった。さらに近年、末梢神経障害モデルマウスにおいて、大脳皮質のアストロサイトの活性化が興奮性シナプスの増強につながるとの知見が得られた。しかし、末梢神経障害が大脳皮質のグリア細胞になぜ影響を及ぼすのかという根源的な疑問は未解明のままである。

2. 研究の目的

(1) : 神経障害性疼痛時に、末梢刺激に対する脊髄後角と大脳皮質での反応性の違いの生理学的メカニズムを明らかにすること

(2) : 脊髄後角および大脳皮質における末梢刺激に対する反応性にアストロサイトが関与しており、アストロサイトの機能制御により疼痛行動が減弱することを異なったモデルで明らかにすること

この2つを研究目的として設定した。

3. 研究の方法

(1) 末梢神経障害性疼痛モデルマウスを用いた大脳1次知覚野及び脊髄後角での FAI

8週齢以上の C57BL6/J マウスの坐骨神経3分枝のうち腓腹神経以外の2本を切離して spared nerve injury (SNI) モデルマウスを作成し、機械的刺激に対する逃避閾値を確認しモデルの完成を確認した後、術後4, 7, 11, 14, 21日目の大脳1次知覚野及び脊髄後角における足底に対する振動(擦過)刺激に対するFAIを計測した。対照群としては神経剥離のみ行ったSham手術群を用いた。このモデル動物を用いて、足底刺激を受容する領域の大脳皮質1次知覚野及び脊髄後角におけるFAIを行った。足底への刺激はブラシを用いた振動刺激(50hz, 500ms)とし、30回分の反応を加算平均し、専用の記録・解析装置(MetaMorphソフトウェア)を用いて解析した。

(2)末梢神経障害性疼痛モデルラットを用いた in vivo パッチクランプ

5 週齢の Wistar 系ラットを用いて坐骨神経を結紮する末梢神経障害 (chronic constriction injury: CCI) モデルを作成し, in vivo patch clamp 法を用いて単一ニューロンに対する下肢刺激に対する応答性, 知覚受容野の変化, 脊髄後角における興奮性・抑制性シナプス後電流の変化を経時的に検討した. 神経障害性疼痛においては脊髄後角のアストロサイトが疼痛の形成・維持に重要な役割を果たしているという仮説を証明するため, 同モデルに対してアストロサイトの機能阻害薬としてギャップジャンクションチャネル阻害薬である carbenoxolone (CBX) 10mg/kg×7 日間投与し, 脊髄後角における興奮性シナプス伝達の変化及び単一の脊髄後角ニューロンがカバーする受容幅の変化を対照群 (同量の生理食塩水を投与した群) との間で比較した.

(3)オピオイドによる逆説的痛覚過敏 (opioid-induced hyperalgesia: OIH) モデルにおける痛覚過敏の原因物質の同定及びアストロサイトの関与の検討

8 週齢以上の C57BL6/J マウスに対してモルヒネを 20mg/kg×1 日 2 回×4 日間投与することにより OIH モデルマウスを作成し, セロトニンの関与を明らかにするために 5-HT₃ 受容体阻害薬であるオンダンセトロン (OND) の投与もしくはセロトニン合成阻害薬である *para*-chlorophenylalanine (PCPA) の投与による OIH の程度の変化を検討した. また, この OIH モデルマウスにおけるアストロサイト活性化の影響を検討するため, CBX 20mg/kg×1 日 2 回×4 日間モルヒネと同時に投与したモデルと, OIH が完成したモデルに対して CBX を 10 ないし 30 nmol/5µL を脊髄腔内投与することによる痛覚過敏の変化を検討した.

4. 研究成果

(1)フラビン蛋白蛍光イメージング法を用いた神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角及び大脳皮質における末梢刺激に対する神経興奮の経時変化の検討

SNI モデルマウスに対し, 術後 4, 7, 11, 14, 21 日目に von Frey hair を用いて機械的刺激に対する逃避閾値を計測した. 過去の報告と同様, 術後 4 日目以降, 障害側足底への機械的刺激に対する逃避閾値は皮膚切開+神経剥離のみを行った Sham 手術群に対して有意に低下し, 逃避閾値の低下は術後 21 日までほぼ一定であった.

障害対側の大脳皮質 1 次知覚野における FAI は, 応答強度, 応答領域面積ともに神経障害から経時的に増大する傾向があり, sham 手術群と比較すると術後 21 日目では有意に増大した (図 2).

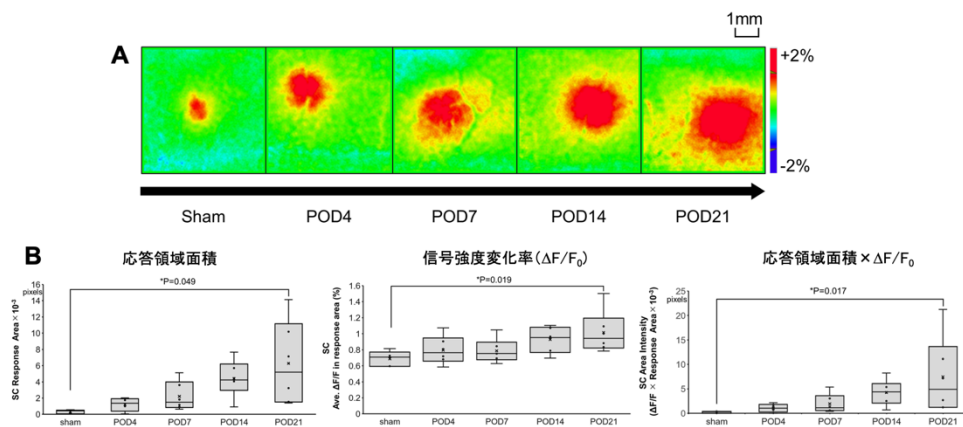


図 2. 神経障害後の足底刺激に対する対側の大脳皮質 1 次知覚野における FAI の

変化

一方、脊髄後角においては、FAI は神経障害によっても信号強度変化率については経時的に増大せず、応答反応面積についてはむしろ減少する傾向が見られた (図 3)。

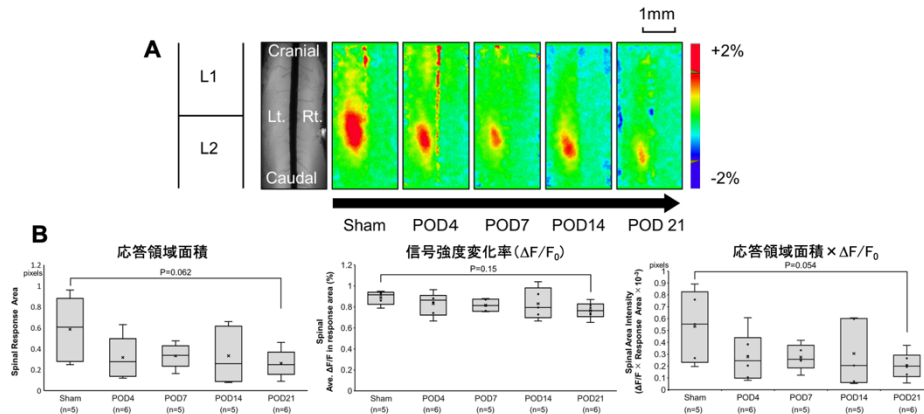


図 3. 神経障害後の足底刺激に対する同側の脊髄後角における FAI の変化

神経障害後の FAI の経時的変化が機能的なものか、神経細胞の増加・減少を伴う可塑的なものかを検討するため、FAI と同じタイミングで大脳皮質及び脊髄後角における神経細胞数を神経特異的マーカーの NeuN を指標にして計測した。FAI と異なり、naïve と比較して神経障害後の大脳皮質浅層 (表層から 300 μ m の深さまで) ・脊髄後角では NeuN 陽性の細胞核が神経障害後増加傾向にあった。このことから、神経障害後の大脳皮質 1 次知覚野におけるフラビン応答の増強は神経細胞数の増加で説明可能だが、脊髄後角では神経細胞数は増加するもののフラビン応答はむしろ低下していたため、神経障害により脊髄後角に入力する 1 次知覚線維が減少した結果、末梢刺激に対する脊髄後角でのフラビン応答が减弱したと推測された (研究目的 1: 投稿準備中)

(2) in vivo 標本を用いた末梢神経障害時の脊髄後角におけるシナプス可塑性の変化の検討とアストロサイト活性化の影響の検討

CCI モデルラットでは末梢刺激に対して、CCI 後では naïve に比較して反応しなくなるニューロンの割合が増えることが明らかになった。これは FAI で見られた脊髄後角におけるフラビン応答の低下傾向と同様のメカニズムで生じているものと思われた。一方刺激に対する反応性の大きさを比較してみると、神経障害後では受傷早期から 4 週目まで有意に反応は大きくなっており、入力する知覚線維は少なくなっているものの、線維連絡を受ける脊髄後角ニューロンへの入力はむしろ大きくなっていることが明らかになった。興奮性シナプス後電流 (excitatory postsynaptic current: EPSC) は受傷早期 (7 日まで) には頻度が増加するものの、9 日目以降には naïve と同様のレベルにまで低下したのに対し、電流の大きさは受傷 14 日~21 日目の間に一旦増加し、受傷 28 日目には naïve と同様のレベルにまで低下した。

一方抑制性シナプス後電流 (inhibitory postsynaptic current: IPSC) の頻度は障害からの時間が経過しても naïve と比較して大きく変化しないが、電流の大きさは経時的に減少し、長期的には特に抑制性シナプス伝達が強く抑制されることが明らかになった。行動学的には神経障害後 4 週程度までは機械的刺激に対する逃避閾値の減少はほぼ一定しているが、その経過において脊髄後角におけるシナプス伝達はダイナミックに変化し、興奮性と抑制性のシナプス伝達のバランスが痛覚過敏状態を規定している可能性が示唆された。

アストロサイトの機能阻害薬としてギャップジャンクションチャンネル阻害薬である carbenoxolone (CBX) が知られている。神経障害直後から 7 日間 CBX を投与された神経障害性疼痛モデルラットでは、増大した EPSC の振幅が naïve と同等のレベルまで低下すること、増大した受容野が縮小傾向となることが明らかとなった。このことから、アストロサイトの活性化を抑制することで神経障害性疼痛が抑制されるメカニズムとして、末梢神経障害後に起こる脊髄後角での興奮性シナプス伝達の活性化を抑制することが考えられた (研究目的 1, 2: 英文雑誌投稿中)。

(3)オピオイドによる逆説的痛覚過敏 (opioid-induced hyperalgesia: OIH) モデルにおける痛覚過敏の原因物質の同定及びアストロサイトの関与の検討

アストロサイトには興奮性グルタミン酸のトランスポーターが局在し、シナプス間隙に放出されるグルタミン酸を回収することにより、神経興奮を制御している。神経障害性疼痛モデル以外の慢性疼痛モデルにおけるアストロサイトの活性化制御が疼痛行動に及ぼす影響を検討するため、モルヒネによる OIH モデルを用いた研究を行った。OIH モデルに対して 5-HT₃ 受容体阻害薬である OND を 0.5-2.0mg/kg で投与すると、いずれの用量においても足底への機械刺激に対する逃避閾値は上昇した。PCPA 150mg/kg×8 日間の投与により脊髄後角におけるセロトニンの発現は完全に抑制でき、OIH の形成も完全に抑制された。よってマウスにおける OIH に関してはセロトニンが重要な役割を果たすことが明らかとなった。免疫染色法により OIH モデルマウスの脊髄後角では、アストロサイトのマーカー蛋白である glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現量が増加し、アストロサイトの形態的にも活性化していることが確認された一方、OND 及び PCPA を投与され疼痛閾値が上昇した OIH モデルマウスではアストロサイトの活性化が抑制されていることを確認した。この OIH モデルマウスに対して CBX の慢性投与及び急性髄腔内投与を行ったところ、予想に反して疼痛行動は全く抑制できなかった。このことから神経障害性疼痛モデルにおいてはアストロサイトの活性化制御が疼痛閾値の改善に有効である一方、OIH モデルのような異なった慢性疼痛モデルにおいてはアストロサイトの活性化は疼痛の成立・維持には主要な役割を果たしていないことが示唆された (研究目的 3: J. Pain. 2021 Jan 16;S1526-5900(21)00004-3. doi: 10.1016/j.jpain.2020.12.008. 参照)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Deguchi H, Furutani K, Mitsuma Y, Kamiya Y, Baba H.	4. 巻 35
2. 論文標題 Low-dose droperidol suppresses transcranial electrical motor-evoked potential amplitude: a retrospective study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Clin Monit Comput.	6. 最初と最後の頁 175-181
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10877-020-00464-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Furutani K, Deguchi H, Matsuhashi M, Mitsuma Y, Kamiya Y, Baba H.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 A Bolus Dose of Ketamine Reduces the Amplitude of the Transcranial Electrical Motor-evoked Potential: A Randomized, Double-blinded, Placebo-controlled Study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Neurosurg Anesthesiol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/ANA.0000000000000653.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Onishi T, Watanabe T, Sasaki M, Kamiya Y, Horie M, Tsukano H, Hishida R, Kohno T, Takebayashi H, Baba H, Shibuki K.	4. 巻 597
2. 論文標題 Acute spatial spread of NO-mediated potentiation during hindpaw ischaemia in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Physiol.	6. 最初と最後の頁 3441-3455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1113/JP277615.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Goh, Kamiya Yoshinori, Sasaki Mika, Ikoma Miho, Baba Hiroshi, Kohno Tatsuro	4. 巻 123
2. 論文標題 Neurosteroid dehydroepiandrosterone sulphate enhances pain transmission in rat spinal dorsal horn	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Anaesthesia	6. 最初と最後の頁 e215-e225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bja.2019.03.026	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Moegi, Kamiya Yoshinori, Shimizu Hiroki, Watanabe Tatsunori, Naito Natsuko, Baba Hiroshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Neural block therapy for radiation enteritis: a case report	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JA Clinical Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40981-019-0239-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakimoto Y, Mizuno J, Kida H, Kamiya Y, Ono Y, Mitsushima D.	4. 巻 29
2. 論文標題 Learning Promotes Subfield-Specific Synaptic Diversity in Hippocampal CA1 Neurons	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cerebral Cortex	6. 最初と最後の頁 2183-2195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhz022.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kenta Furutani, Yatsunori Watanabe, Keiichiro Matsuda, Yoshinori Kamiya, Hiroshi Baba	4. 巻 99
2. 論文標題 SUZYTM forceps facilitate nasogastric tube insertion under McGRATHM MAC videolaryngoscopic guidance: A randomized, controlled trial.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medicine (Baltimore)	6. 最初と最後の頁 e22545
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.00000000000022545.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 番場景子, 渡部達範, 大西毅, 紙谷義孝, 馬場洋
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルマウス的大脑皮質一次体性感覚野及び脊髄後角における神経活動の経時的変化の解析
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 紙谷義孝, 佐々木美佳, 田中萌生, 番場景子
2. 発表標題 モルヒネ慢性投与による痛覚過敏は脊髄後角のセロトニンによって生じ、一部5HT-3受容体を介する
3. 学会等名 第66回日本麻酔科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mika Sasaki, Yoshinori Kamiya, Keiko Bamba, Moegi Tanaka, Takeshi Ohnishi
2. 発表標題 Opioid-induced hyperalgesia induced by chronic administration of morphine is caused by serotonin in spinal dorsal horn and, in part, through the 5-HT3 receptor.
3. 学会等名 Neuroscience 2019
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
研究分担者	佐々木 美佳 (Sasaki Mika) (20774061)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	倉部 美起 (Kurabe Miyuki) (30635579)	新潟大学・医歯学系・助教 (13101)	
研究分担者	大西 毅 (Onishi Takeshi) (60804573)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	渡部 達範 (Tatsunori Watanabe) (30748330)	新潟大学・医歯学総合病院・助教 (13101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関