

令和 3 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08811

研究課題名(和文)慢性痛成立過程の脳-脊髄可塑性変化：抑制性神経回路の役割の解明

研究課題名(英文)Brain-Spinal Cord Plasticity Changes during the Establishment of Chronic Pain: Elucidation of the Role of Inhibitory Neural Circuits

研究代表者

倉部 美起 (Miyuki, Kurabe)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：30635579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：慢性痛成立過程で生じるシナプス可塑性変化には、興奮性神経伝達の過剰亢進だけでなく、抑制性神経回路の過剰亢進も関与しているのではないかと考え、神経損傷初期から慢性痛成立までの脊髄可塑性変化において、抑制性神経回路の変性とその果たす役割を、主に下行性抑制系に注目して解明することを目的とした。ウイルスベクターを用い、化学遺伝学的に下行性抑制系の起始核の一つである青斑核ノルアドレナリンニューロンを選択的に賦活化し、痛み応答への影響を解析した。in vivoパッチクランプ法を用いた他、行動解析や免疫組織学的解析を併せて行い、“痛み”に対する青斑核下行性抑制系の果たす役割を解明する統合的研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害後からの経時的な脊髄後角抑制性シナプス電流の解析を初めて行った。その結果、神経障害後の経過とともに変化し、最終的に慢性痛時にはGABAあるいはGlycineの受容体の感受性変化により応答が減弱していることを示した。一方で、化学遺伝学的手法を用いて下行性抑制系の起始核の一つである青斑核NAニューロンを操作したところ急性痛に対してNAニューロンの活性化は鎮痛作用を示した。神経障害後からのシナプス可塑性変化が従来の慢性痛治療が難渋する理由の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that not only hyperexcitability of excitatory neurotransmission but also hyperexcitability of inhibitory neuronal circuits may be involved in the synaptic plasticity changes that develop during the establishment of chronic pain. We aimed to elucidate the role of inhibitory circuits in spinal plasticity from the early stage of peripheral nerve injury to the establishment of chronic pain, focusing especially on the descending inhibitory system.

Using the DREADD system, we selectively activated neurons in locus coeruleus, one of the originating nuclei of the descending inhibitory system, and analyzed their effects on pain responses. In addition to the in vivo patch-clamp method, behavioral and immunohistological analyses were also performed to conduct an integrated study to elucidate the role of the descending inhibitory system in pain.

研究分野：生理学

キーワード：青斑核 in vivoパッチクランプ 化学遺伝学的手法

1. 研究開始当初の背景

急性痛は組織が障害された場合の“警告”としてなくてはならないものである。一方、組織の損傷が治癒したにもかかわらず持続する痛みは、意義を失った痛み、「慢性痛」として存在する。慢性痛成立には中枢神経での可塑性変化が関与しており、特に興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸が主要な役割を果たしているとされている。一方で、慢性痛時には抑制性神経回路の機能不全も関与しているとされる。通常、脊髄後角ニューロンは脳幹から起こる下行性抑制系や脊髄介在ニューロンを含む抑制性神経回路の働きにより制御されているが、慢性痛時には、

- ・脊髄後角での抑制性シナプス伝達物質である GABA 放出減少、受容体脱落 [J. Neurosci. 2002 August 1, 22(15)]

- ・青斑核から起こる下行性抑制系の機能不全 [Anesthesiology. 2015 Oct 123 (4)]

などが起きており、脱抑制が慢性痛の一因とも言われている。しかし、従来の研究は神経損傷から特定の時間における *in vitro* での変化であり、抑制性伝達物質の減少・受容体減少の原因がどこにあるのか、ネットワークの保たれた生体で *in vitro* と同じ現象が起こっているかどうかは不明であった。

シナプス可塑性は、当初脳での記憶と学習の分子機構として同定され、グルタミン酸の役割が注目を集めている。一方で、GABA による抑制の過剰な亢進がシナプス可塑性(記憶障害)と関与していることが報告されている [PLoS One. 2008 Aug 21;3(8)] シナプス可塑性変化が入力線維の高頻度刺激により誘起されるものであること、申請者らのラット *in vivo* 標本を用いた予備実験から従来観察されていたよりもはるかに強力な脊髄後角への抑制性入力が見られたことから、神経損傷初期の抑制性入力の過剰亢進が慢性痛の一因となっている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

慢性痛成立過程で生じるシナプス可塑性変化には、興奮性神経伝達の過剰亢進だけでなく、抑制性神経回路の過剰亢進も関与しているのではないかと考え、神経損傷初期から慢性痛成立までの脊髄可塑性変化において、抑制性神経回路の変性とその果たす役割を、主に下行性抑制系に注目して解明することを目的とした。

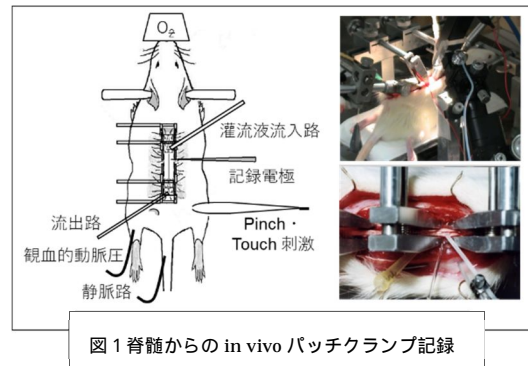
そのために、神経損傷から慢性痛成立までの過程における脊髄後角ニューロンへの抑制性入力の経時的変化を、*in vivo* patch clamp 法を用いて明らかにすることとした。また、下行性抑制系の起始核である青斑核 NA(ノルアドレナリン)ニューロンの活動を DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs)を用いて制御(賦活化・抑制)した場合、急性痛・慢性痛に対する痛み行動はどのように変化するか、脊髄後角でのシナプス応答はどのように変化するか、を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

(1) 脊髄後角 層ニューロンからの *in vivo* patch clamp 記録

実験動物として、5週齢以上の成熟 Wistar 系ラットを用いた。*in vivo* パッチクランプ法を用いて神経障害性痛モデル動物とコントロール動物間から、神経損傷時から早期(7~14日)およ

び後期(21~28日)の抑制性シナプス伝達を記録して解析・比較した。モデル動物として坐骨神経結紮(CCI)モデルを用いた。in vivo パッチクランプ法については、申請者がこれまで行ってきた方法(Kurabe M, et al. Sci Rep. 2016、図1参照)と同様に行った。



(2) 青斑核 NA ニューロンのみを特異的に制御可能なラットの作成

人為的に青斑核 NA 神経のみを制御するために、アデノ随伴ウイルス(AAV-PRsX8/hM3Dq)を作製し、ラット青斑核に投与し、免疫組織学的染色により NA ニューロン特異的な発現を確認した。また、電気生理学的に、合成化合物 clozapine-N-oxide (CNO) の腹腔内投与によって NA ニューロンの活動が亢進することを確認した。

(3) AAV を導入したラットを用いた行動実験

AAV 導入ラットを用い、まず急性痛時における青斑核 NA ニューロンの関与を行動実験を行うことで解析した。CFA (complete Freund's adjuvant) 後肢に投与後 1 時間後に CNO を腹腔内投与し、青斑核 NA ニューロンを活性化させた場合の疼痛閾値の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 神経障害～慢性痛移行までの脊髄後角抑制性シナプス伝達の解析(図2)

CCI-E(早期)には IPSC(抑制性シナプス後電流)の頻度は一時的にコントロール時より増加し、CCI-L(後期)には IPSC の振幅が減少することが示された。つまり、慢性痛に移行する過程では、一時的に抑制性伝達物質の放出が亢進すること、慢性痛発症時には受容体の感受性変化が生じることが示された。

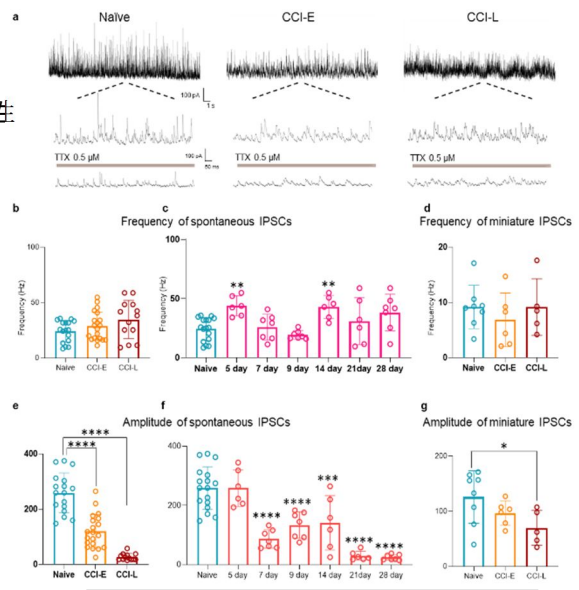


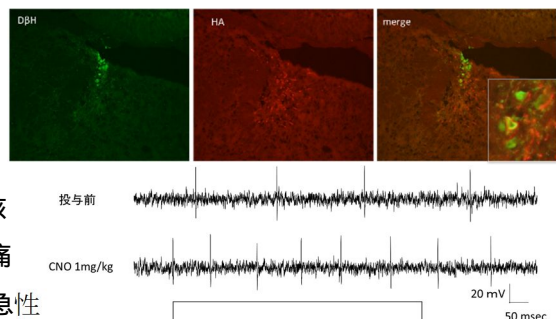
図2 神経障害後からの抑制性シナプス電流の解析

(2) DREADD による青斑核 NA 神経の操作(図3)

AAV の発現を免疫組織学的に、NA ニューロンのマーカーである D_H との共発現を確認することで示した。また、麻酔下(ウレタン副区内投与)ラット青斑核から細胞外記録を行い、CNO 投与によって発火が亢進することを確認した。

(3) AAV 導入ラットを用いた行動学的解析

CFA を後肢に投与し、1 時間後に CNO を腹腔内投与し、さらに 30 分経過後に dynamic plantar aesthesiometer (37450; Ugo Basile, Comerio) を用いた von Frey method によって疼痛閾値の変化を評価した。その結果、CNO 投与による青斑核 NA ニューロンの活性化は CFA 投与による急性痛時の疼痛閾値を上昇させた。つまり、少なくとも急性痛に対しては青斑核 NA ニューロンの活性化は疼痛を抑制する方向に作用することが示された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sasaki Mika, Kamiya Yoshinori, Bamba Keiko, Onishi Takeshi, Matsuda Keiichiro, Kohno Tatsuro, Kurabe Miyuki, Furutani Kenta, Yanagimura Harue	4. 巻 22
2. 論文標題 Serotonin Plays a Key Role in the Development of Opioid-Induced Hyperalgesia in Mice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 715 ~ 729
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2020.12.008	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 Yamamoto Tomohiro, Kurabe Miyuki, Matsumoto Kensuke, Sugai Shunya, Baba Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Congenital Tracheal Aplasia Without Prenatal Diagnosis Masked by Maternal Obesity and Gestational Diabetes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 A & A Practice	6. 最初と最後の頁 e01200 ~ e01200
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/XAA.0000000000001200	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 倉部美起
2. 発表標題 慢性痛への移行にはアストロサイト-ニューロン相互作用による脊髄後角のneuronal lossが関与する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Miyuki Kurabe, Mika Sasaki, Hiroshi Baba
2. 発表標題 "Changes in spinal dorsal horn neuron characteristics from the early stage of peripheral nerve injury to chronic pain transition
3. 学会等名 Neuroscience 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Miyuki Kurabe
2. 発表標題 Alterations in Receptive Fields and Response Properties of Spinal Dorsal Horn Neurons in Rats after Peripheral Nerve Injury: An in vivo patch-clamp recording
3. 学会等名 the anesthesiology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2018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)	

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
---------	---------