

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08821

研究課題名（和文）前頭前皮質機能に着眼した慢性疼痛発症メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of chronic pain development focusing on prefrontal cortex function and its application to treatment

研究代表者

徐 民恵 (SO, MinHye)

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・講師

研究者番号：60381886

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛の発症には、情動に影響を与える脳回路も関与している。前頭前皮質（mPFC）は、情動を生み出す神経回路の一部である。本研究では、mPFCの機能を調節する化合物として、新規オピオイド受容体作動薬であるKNT-129を用いて検討を行った。神経障害性疼痛発現については、mPFCよりも、情動に対して強い影響を及ぼす脳領域である島皮質（insular cortex）が強い影響を与えていることが明らかになった。また、脳深部in vivoカルシウムイメージング法の確立を行い、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核での細胞活動を長期的に測定することで、側坐核の細胞の活動の変化を捉えることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

情動に強い影響を与えている脳領域の島皮質の神経細胞の活性または抑制が、慢性疼痛の痛み閾値に影響を与えることが示唆され、痛みと情動のメカニズムの一端が明らかになった。また、脳深部の神経活動を生体内でカルシウムイメージングにより観察することに成功した前例は世界的にも少ないが、本研究では極微細蛍光内視鏡により脳深部のカルシウムイメージングに世界で初めて成功した。これは今後の研究で、特定領域内の細胞ネットワークでの慢性疼痛のメカニズムの解明に応用することが出来る。

研究成果の概要（英文）：Brain circuits that influence emotions are involved in the development of chronic pain. The prefrontal cortex (mPFC) is part of the neural circuitry that generates emotion. In this study, we investigated KNT-129, a novel delta-opioid receptor agonist, as a compound that modulates the function of the mPFC.

The insular cortex, a brain region that has a strong influence on emotion, has a stronger effect on the development of neuropathic pain than the mPFC. We also established a deep brain in vivo calcium imaging method to measure long-term cellular activity in the nucleus accumbens of mouse models of neuropathic pain. As a result, we were able to measure changes in the activity of cells in the nucleus accumbens.

研究分野：麻酔科学

キーワード：慢性疼痛 前頭前皮質

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者らのグループでは、敗北感を強く感じている動物が、微弱な刺激を痛みとして認識すること、また、慢性疼痛の動物では、脳の前頭前皮質 (mPFC) 領域が過剰に興奮していることを発見した。これらより、情動を司ると言われている mPFC 領域が、痛みの認識に影響を与えていると考えられるが、その機序は不明である。

mPFC 領域は、特定の対象への注意を調節している脳部位と知られているが、特に mPFC 領域の抑制性神経の活性化が注意を高めることが、最近明らかにされた (Kim et al., Cell 2016)。mPFC 領域は、痛み認知の際にも活性化し (Kucyi et al., J Neurosci 2014) この領域が活性化していると痛みを感じやすく、抑制されていると、痛みへの注意が分散されるため、痛みを感じにくくなる。また、慢性疼痛時には、痛みを受容する脳領域の神経細胞の形態や機能が著しく変化している (Metz et al., Proc Natl Acad Sci USA 2009)。mPFC 領域への持続的な興奮性の刺激が入力した結果、抑制性神経の機能が低下するため、慢性疼痛時には外的刺激へ注意を向けることが難しくなり、抑うつ状態や認知機能障害などの高次脳機能障害が発症すると考えられている。

さらに、痛みについてはプラセボ効果がよく経験されるが、そのメカニズムも不明である。近年、fMRI (functional magnetic resonance imaging) の検討から、mPFC 領域の活性化がプラセボ効果の発現に重要なことが、ヒトで明らかとなった。これらを応用し、痛みの強さを客観的に評価できるのではないかと、また、難治性慢性疼痛も、mPFC 領域の機能を抑制的に調節する介入ができれば治療可能なのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、情動を調節する脳領域である mPFC 領域からの出力を調節して、痛みの認識にどのような影響を与えるのかを解明する。基礎研究では遺伝子工学的な手法で神経回路特異的な調節を行い、臨床研究ではヒトの fMRI における mPFC 領域の活動と慢性疼痛の関連性から、痛みの感受性を客観的に評価可能か検証し、また、介入による治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

実験には、5 週齢の C57BL/6J マウスを使用した。また、Ca²⁺イメージングには、アストロサイトおよび一部ニューロンに発現するグルタミン酸トランスポーター (slc1a2) にカルシウムセンサータンパク質 (GCaMP7) を発現する C57BL/6-Tg (Slc1a2-G-CaMP7) Bsi マウス (雄性; RIKEN) を用いた。飼育環境は、温度 23±2°C、湿度 50±10% に維持し、12 時間の明暗サイクル (点灯 7:00、消灯 19:00) に設定した。

(2) 神経障害性モデルの作製

ペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg, i.p.) により麻酔したマウスの坐骨神経を露出し、マウスの坐骨神経のうち腓腹神経のみを残して、残りの神経を切断する Spared Nerve Injury (SNI) モデルを使用した。

(3) 行動解析

機械的刺激に対する反応閾値は、von Frey filament を用いて測定した。マウスの足蹠へ太さの異なるフィラメントを押し当て、逃避行動が認められる重さ (g) から評価を行った。

(4) GRIN Lens の埋植

ペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg) の腹腔内投与によりマウスを麻酔し、イヤーパー (NARISIGE、EB-6) と脳定位固定装置 (SR-6M-HT) を用いて頭部定位固定を行った。頭部皮膚を切開し頭蓋骨を露出した。Brain Atlas (The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates second edition) に従い、プレグマから前方に 1.5 mm、左側に 0.9 mm に穴を開け、長さ 8mm の GRIN lens (ゴーフォトン社) を深さ 4.6mm の位置に挿入した。レンズ保護のため、0.2ml チューブを適当な長さに切り、レンズにかぶせ、デンタルセメントで固定した。撮影の際は、チューブを取り外して観察した。

(5) 蛍光顕微鏡を用いた麻酔下における Ca²⁺イメージング

GRIN lens を埋植した C57BL/6-Tg (Slc1a2-G-CaMP7) Bsi 雄性マウスをペントバルビタールナトリウム (60 mg/kg, i.p.) 投与、もしくはイソフルラン吸入 (1.5%) により麻酔後、小型脳固定装置 (MAG-1) に固定し、顕微鏡の対物レンズ下に GRIN lens の端面が来るように位置を調節し、30 分間の画像を撮影した。

神経障害性疼痛モデル (SNI モデル) を用いた実験では、SNI 手術の前日と、SNI 手術後 3 日目、5 日目、7 日目に撮影を行った。

(6) 極微細蛍光内視鏡イメージングシステム (U-FEIS) を用いた Ca^{2+} イメージング

U-FEIS イメージングシステムに、レーザー光源と CCD カメラ、蛍光内視鏡ファイバーを取付け、顕微鏡用ソフトウェア (Micro-Manager1.4) を用いて測定を行った。GRIN lens を埋植した C57BL/6-Tg (Slc1a2-G-CaMP7) Bsi 雄性マウスをペントバルビタールナトリウム (60mg/kg) で麻酔後、イヤーパー (EB-6) と脳定位固定装置 (SR-6M-HT) を用いて固定した。

蛍光内視鏡ファイバーをマニピレータに取り付け、カメラで撮影しながらファイバーの先端を lens の端面に近づけていき、映像内に血管が見える位置を焦点面としてピントを調節し、1800 枚 (1 分間) の画像を撮影した。

(7) Ca^{2+} イメージング画像解析

画像処理には ImageJ を用いた。蛍光顕微鏡を用いた麻酔下での測定で得られたデータについては、3 分間の全フレームの蛍光強度の平均をベース値 (F_0) として蛍光強度変化率 (F/F_0) の動画ファイルを作製した後、10 個の動画ファイルを連結させて 30 分間の動画ファイルとした。 F/F_0 処理後に得られたそれぞれの動画ファイルを、自動細胞抽出プログラム (high-performance optimizer for spike timing and cell location via linear impulse: HOTARU) system (Takekawa et al., 2018) により解析した。

4. 研究成果

(1) 前頭前皮質オピオイド δ 受容体を介した神経障害性疼痛改善作用

慢性疼痛の発症には、情動に影響を与える脳回路も関与しており、前頭前皮質 (mPFC) は、情動を生み出す神経回路の一部であり、うつなどの気分障害の発症に一部関与していることが示唆されている。 δ オピオイド受容体は体性感覚と情動の調節の両者に対して影響を及ぼしており、その疼痛緩和作用機序に情動面の調節が関与している可能性もある。そこで、mPFC の機能を調節する化合物として、新規 δ オピオイド受容体作動薬である KNT-129 を用いて検討を行った。神経障害性疼痛モデルマウスである Spared Nerve Injury (SNI) マウスに KNT-129 を脳室内に処置すると、用量依存的な神経障害性疼痛緩和作用が認められた。

次に、 δ オピオイド受容体による情動面の調節に関与していると報告されている infralimbic cortex (IL cortex) を対象に、KNT-127 を微量注入し、神経障害性疼痛に対する影響を検討した。SNI 処置により低下した痛み閾値が、KNT-127 の微量注入では有意な影響は認められなかった。そこで、情動に対してより強い影響を与えている脳領域の島皮質 (insular cortex) へ変更し、KNT-127 を微量注入したところ、SNI マウスの痛み閾値が KNT-127 によって濃度依存的に改善した。また、興奮性神経伝達物質 (glutamate) と抑制性神経伝達物質 (muscimol) を微量注入したところ、健常動物の痛み閾値が glutamate の微量注入により低下し、神経障害性疼痛モデルマウスの痛み閾値が muscimol の微量注入により改善することが明らかになった。

これらの結果から、Insular cortex における神経細胞の活性または抑制が、慢性疼痛の痛み閾値に影響を与えることが示唆された。

(2) 脳深部神経活動

情動に対して強い影響を及ぼしている脳領域である島皮質 (insular cortex) が、神経障害性疼痛発現に対し mPFC よりも強い影響を与えていることが明らかになった。そこで、疼痛の慢性化に、島皮質も含めた脳領域の神経活動が影響するか検討した。

微細蛍光顕微鏡を用いて in vivo でカルシウムイメージングを行い、神経活動を測定した。まず、カルシウム蛍光タンパク質である GCaMP7 をアストロサイトと一部のニューロンに発現する GCaMP7 マウスを作製し、その側坐核へ GRIN レンズを埋植した。蛍光顕微鏡を用いて観察を行ったところ、自発的なカルシウムシグナルの変化を捉えた。

また、GRIN レンズを側坐核へ埋植した GCaMP7 マウスの神経活動を極微細蛍光内視鏡 (U-FEIS) を用いて測定したところ、蛍光顕微鏡と同様に神経活動を可視化することができた。U-FEIS は、非常に軽量の蛍光内視鏡であり、自由行動をしているマウスの動きを制限することなく、蛍光を観察できることから、脳深部の神経活動をカルシウムイメージングで可視化することが可能になった。

脳深部の神経活動を in vivo の実験条件でカルシウムイメージングにより観察することに成功した前例は世界的にも少ないが、本研究では極微細蛍光内視鏡により脳深部のカルシウムイメージングに世界で初めて成功することができた。

(3) 神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核における神経系細胞の活動変化

次に、脳深部 in vivo Ca^{2+} イメージング法を神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核において行い、神経系細胞の活動を解析した。GCaMP7 マウスの側坐核へ GRIN レンズを埋植し、蛍光顕微鏡を用いて観察を行ったところ、自発的なカルシウムシグナルの変化を捉えることができた。さ

らに、得られたデータを自動細胞抽出プログラム (HOTARU) system により解析したところ、多数の細胞の場所を同定し、経時的な細胞の活動を捉えることができた。

また、慢性疼痛モデルにおける側坐核の細胞活動を測定するため、SNI による神経障害性疼痛モデルを用いて長期的に細胞活動を測定した。その結果、SNI 群では、細胞の蛍光輝度変化の強度が手術前と比べて術後 3、5 日目において有意に減少し、30 分間での活動回数は、術後 7 日目において有意に減少していた。

以上より、脳深部 in vivo Ca^{2+} イメージング法の確立を行い、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核での細胞活動を長期的に測定することで、側坐核の細胞の活動の変化を捉えることができ、特定領域内での細胞ネットワークでの慢性疼痛のメカニズムの解明に応用することが出来ることを示した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山崎久朗、糸和彦、大澤匡弘
2. 発表標題 神経障害性疼痛における視床背内側核-前帯状回皮質経路の関与
3. 学会等名 第30回神経行動薬理若手研究者の集い
4. 発表年 2021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	杉浦 健之 (SUGIURA Takeshi) (20295611)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究分担者	大澤 匡弘 (OHSAWA Masahiro) (80369173)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(薬学)・准教授 (23903)	
研究分担者	祖父江 和哉 (SOBUE Kazuya) (90264738)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	

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