

令和 3 年 6 月 6 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：18K08822

研究課題名（和文）海馬における神経細胞の新生低下に注目した慢性疼痛の発症機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of the Pathogenesis of Chronic Pain Focusing on Decreased Neuronal Generation in the Hippocampus.

研究代表者

祖父江 和哉（SOBUE, Kazuya）

名古屋市立大学・医薬学総合研究院（医学）・教授

研究者番号：90264738

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）：本研究では、慢性疼痛時の海馬の神経細胞新生の低下を起こす機序（関与する神経回路）と生理学的意義を明らかにし、痛みの遷延化の原因のひとつである可能性を検証することを目的とした。神経障害性疼痛による海馬の神経新生低下に、海馬歯状回の顆粒細胞下帯（SGZ）の神経前駆細胞数の低下や脊髄後角（SDH）から外側腕傍核（LPB）に投射する神経回路の活性化が関わることを明らかにした。SDH-LPB神経は負の情動の回路なので、慢性的な疼痛刺激による海馬神経新生の低下には、疼痛の負の情動を伝える神経回路の活性化が関わり、疼痛の体性感覚性の情報を伝える神経回路は、海馬神経新生の低下に関与しないことが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、神経障害性疼痛による海馬の神経新生低下に、海馬歯状回の顆粒細胞下帯（SGZ）の神経前駆細胞数の低下や脊髄後角（SDH）から外側腕傍核（LPB）に投射する神経回路の活性化が関わることを明らかになった。これが痛みの遷延化の原因のひとつである可能性があり、今後の研究で慢性疼痛の治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to clarify the mechanism (neural circuits involved) and physiological significance of the decrease in hippocampal neurogenesis in chronic pain, and to examine the possibility that this is one of the causes of prolonged pain. We found that neuropathic pain-induced decrease in hippocampal neurogenesis involves a decrease in the number of neural progenitor cells in the subgranular zone (SGZ) of the hippocampal dentate gyrus and activation of the neural circuitry projecting from the spinal dorsal horn (SDH) to the lateral parabrachial nucleus (LPB). Since SDH-LPB nerves are negative affective circuits, the decrease in hippocampal neurogenesis due to stimulation involves activation of neural circuits that transmit the negative emotions of pain. In addition, we found that somatosensory neural circuits of pain are not involved in the decrease of hippocampal neurogenesis.

研究分野：麻酔科学、神経科学

キーワード：慢性疼痛 海馬 神経細胞の新生低下

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「発達期以降の脳では神経細胞の新たな産生はない」というサンティアゴ・ラモン・イ・カハールの説が長年支持されてきた。ところが近年、成体の脳における神経細胞の再生が証明され、その生理学的役割の解明が進んでおり、再生医療への応用が期待されている。成体脳における神経細胞新生は、脳室下帯や海馬のみで認められる。海馬は記憶や学習を司る脳領域であるが、海馬における神経細胞新生は、気分障害や認知機能障害の際に低下しているという報告がある (Santarelli et al., Science, 2003)。一方、慢性疼痛でも海馬の神経細胞新生は低下することが報告されている (Mutso et al., J Neurosci, 2012)。この神経細胞新生の低下は海馬のみで生じており、細胞の刷新ができないことで恐怖(疼痛)記憶を消しにくい状態にあると予測されるが、その生理学的意義は不明である。

また、慢性疼痛における海馬の神経細胞新生の低下の機序も明らかではない。液性因子や特異的な神経回路の活性化などが機序として考えられるが、局所的な現象であることからすれば、痛み刺激により活性化される神経回路の持続的活性化による可能性が高い。

以上のことから本研究課題では、慢性疼痛における海馬特異的な神経細胞新生の低下の機序(関与する神経回路)を解明し、その生理学的意義を明らかにすることで、治療への応用を検討できるようになるのではないかと考え実施した。

2. 研究の目的

本研究では、慢性疼痛の際にみられる海馬の神経細胞新生の低下を起こす機序(関与する神経回路)と生理学的意義を明らかにし、痛みの遷延化の原因のひとつである可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

5週齢の C57BL/6J マウスを使用した。飼育環境は、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $50\pm 10\%$ に維持しており、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 (60 mg/kg, i.p.) によりマウスを麻酔した。坐骨神経を露出して、腓腹神経のみを残して、残りの神経を切断する Spared Nerve Injury (SNI) モデルを作製した。

(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。マウスの足跡へ、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) から閾値の評価を行った。

(4) 脳および脊髄への局所的微量注入法

脊髄後角への微量注入は、脊髄定位固定装置 (STS-A, NARISHIGE) を用い、特定の脳領域への微量注入は、脳定位固定装置を用いて行った。

マウスをイソフルランにより麻酔し、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を、脊髄後角微量注入では $100\sim 200\text{ nL/min}$ 、脳局所微量注入では $50\sim 100\text{ nL/min}$ の速度で計 500 nL 投与した。局所微量注入が終了したあと、注入に用いたガラスキャピラリーを 15 分程度留置し、AAV 溶液の拡散を十分に行った。

(5) 使用したアデノ随伴ウイルスベクター

本研究で用いたアデノ随伴ウイルスベクターは、以下の通りである。

AAV5-hSyn-EGFP
AAV5-hSyn-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine
AAV5-hSyn-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine
AAV2-retro-EF1a-mCherry-IRES-Cre
AAV8-hSyn-DIO-mCherry
AAV8-hSyn-DIO-HA-hM3D(Gq)-IRES-mCitrine
AAV8-hSyn-DIO-HA-hM4D(Gi)-IRES-mCitrine

(6) 免疫組織化学的解析

機械的刺激に対する反応閾値を測定した後の動物を用い、経心的に灌流固定し、全脳の薄切切片 ($50\mu\text{m}$) をピブラトームにより作成した。この切片を各種タンパク質に対する特異抗体と反応させた。蛍光標識した二次抗体と反応させ、各タンパク質の発現パターンや発現細胞の形態を

蛍光顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

(7) Designers Receptors Exclusively Activated by Designer Drug (DREADD) 法

アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) を微量注入後、8 週間経過したマウスへ、Clozapine-N-oxide (CNO) を処置し、機械刺激に対する閾値を測定した。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスの海馬神経新生の変化

本研究の目的である、「神経障害性疼痛時の海馬ニューロン新生低下のメカニズム」を明らかにするため、まず、神経障害性疼痛時の海馬ニューロン新生低下が、ニューロン成熟過程のどの時期の細胞の減少によるものかについて、免疫組織化学法により検討した。

成体期におけるニューロン新生の場である、海馬歯状回の顆粒細胞下帯 (SGZ) において、神経幹細胞マーカーである Nestin と GFAP の共陽性細胞数について検討したところ、神経障害性疼痛モデルの一つである、Spared Nerve Injury (SNI) モデルマウスと、擬似手術群の間で、細胞数に有意な差は見られなかった。

次に、増殖細胞を標識するために、5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU) をマウスに投与し、1 時間後に灌流固定した。このマウスの SGZ において、神経前駆細胞のマーカーである Tbr2 と BrdU の共陽性細胞数の検討を行ったところ、SNI 群で細胞数の有意な減少が見られた。

また、新生ニューロンを標識するために、BrdU 投与後 1 週間で灌流固定を行った。このマウスの SGZ において、新生ニューロンのマーカーである DCX と BrdU の共陽性細胞数の検討を行ったところ、SNI 群で細胞数の有意な減少が見られた。

これらの結果より、神経障害性疼痛による海馬歯状回のニューロン新生の低下は、SGZ の神経前駆細胞数が減少することで生じることが示唆された。

(2) 神経障害性疼痛による海馬神経新生低下を引き起こす神経回路の同定

神経障害性疼痛により、SGZ の神経前駆細胞数が減少するメカニズムについて検討を行った。神経障害時活性化する、外側視床 (VPL) を起始核とする体性感覚経路、及び外側腕傍核 (LPB) を起始核とする情動経路と、SGZ の神経前駆細胞数低下との関連を調べるために、痛覚伝達経路の脊髄における投射元である脊髄後角へ、ニューロンのマーカーであるシナプシンプロモーター下位、Gi タンパク質共役型の Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drug である hM4Di をコードしたアデノ随伴ウイルス (AAV) を微量注入した。これにより作製した hM4Di マウスを用いて、神経回路の調節を試みた。

SNI 手術と同時に、hM4Di マウスの VPL に、DREADD リガンドである Clozapine-N-Oxide (CNO) を持続投与したところ、SGZ の神経前駆細胞数の低下が部分的に抑制された。一方で、同様にして LPB に CNO を持続投与したところ、SNI による SGZ の神経前駆細胞数の低下が完全に抑制された。

以上の結果から、神経障害性疼痛時の海馬ニューロン新生低下は、体性感覚経路、情動経路いずれの活性化によっても引き起こされるが、特に情動経路の寄与が大きいことが示唆された。

(3) 神経障害性疼痛の発現における神経回路の同定

実験 (2) と同様の方法を用いて、SNI モデルマウスの体性感覚経路、情動経路を抑制した際に、痛覚過敏が抑制されるかに関して検討を行った。その結果、体性感覚経路の抑制では、SNI によって生じる機械痛覚過敏の改善は見られなかったが、情動経路を抑制することで、部分的に抑制された。

これらの結果から、神経障害性疼痛時の痛覚過敏発現に対しては、体性感覚経路ではなく、情動経路の活性化が主に関与することが示唆された。

本研究の結果より、神経障害性疼痛により海馬における神経新生が低下し、特に神経前駆細胞量の低下が原因であることが明らかになった。また、海馬神経新生の低下を引き起こす神経回路の同定を、DREADD 法を用いた特定の神経回路のみを抑制する手法により試み、脊髄後角 (SDH) から外側腕傍核 (LPB) に投射する神経回路の活性化が関わることを明らかにした。

この SDH-LPB 神経は疼痛の情動的側面 (負の情動) を伝える回路であることから、慢性的な疼痛刺激による海馬神経新生の低下には、疼痛の負の情動を伝える神経回路の活性化が関わることを明らかになった。

一方、疼痛の体性感覚性の情報を伝える脊髄後角から外側視床 (VPL) へ投射する神経回路を調節しても、神経新生に影響は見られなかった。このことから、疼痛の体性感覚性の情報を伝える神経回路は、海馬神経新生の低下には関与していないことが明らかになった。

興味深いことに、海馬神経新生の低下を引き起こす神経回路 (SDH-LPB) を神経障害性疼痛モデル動物において抑制すると、痛覚閾値の低下が改善したものの、SDH-VPL 回路を抑制しても痛覚閾値の低下が見られなかった。これは、疼痛の慢性化には SDH-VPL ではなく、SDH-LPB 回路が関与していることを示している。最近、LPB の GABA 神経系の機能低下が疼痛の慢性化

を引き起こすことが報告されており、本研究の結果を踏まえると痛みが慢性化し難治化する機構には、疼痛により活性化する負の情動を伝える神経系の持続的な活性化が必要である可能性が示された。

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 宮本啓補、澤田雅人、山崎久朗、梅澤直樹、樋口恒彦、糸和彦、澤本和延、大澤匡弘
2. 発表標題 成体海馬ニューロン新生に着目した痛みの慢性化を引き起こす中枢神経回路の解明
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
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	太田 晴子 (OTA Haruko) (90534751)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (23903)	
研究分担者	草間 宣好 (KUSAMA Nobuyoshi) (60336691)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・講師 (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)	

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