

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17807

研究課題名(和文) 神経障害性痛における脊髄 大脳皮質神経活動連関とグリア細胞活性化制御の影響

研究課題名(英文) Influence of spinal cord-cortical neural activity coupling and glial cell activation regulation in neuropathic pain.

研究代表者

番場 景子 (Bamba, Keiko)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：60790871

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：SNIモデルマウスを作成し、大脳皮質一次体性感覚野及び脊髄後角においてフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて神経活動を測定した結果、SCでは経時的に神経活動が増強したが、脊髄では減弱した。脊髄における抑制性ニューロンと神経細胞の経時的变化を免疫組織学的に検討したところ、Neu-Nは変化せず、Pax2は増加し、興奮性ニューロンの減少を示唆する結果となり、これは興奮性ニューロンの変化がAFIの結果と相関する可能性を示した。一方で、脊髄における電気生理学的検討では神経障害に伴う脊髄内での感覚受容野は曖昧になる一方、刺激に対する反応性の増強が認められ、FAIや免疫組織学的とは一致しない結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

末梢神経損傷モデルマウスにおいてSC及び脊髄後角においてフラビン蛋白蛍光イメージングを用いて神経活動を測定した結果、SCでは経時的に神経活動が増強したが、脊髄では神経活動の減弱を認める結果となった。また、脊髄における抑制性ニューロンと神経細胞の経時的变化を免疫組織学的に検討した結果、脊髄後角の神経活動の減弱は興奮性ニューロンの減少を反映している可能性が考えられた。一方で電気生理学的検討の結果とは乖離する部分があり、今後、より工夫された研究手法を用いた解析が必要である。本研究は脊髄後角細胞やS1領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛を直接反映するものではなく、他の機序が存在することを示唆する。

研究成果の概要(英文)：Mouse models of SNI were generated and neuronal activity was measured using flavoprotein auto-fluorescence imaging in the cortical primary somatosensory cortex and spinal cord dorsal horn, which showed enhanced neuronal activity over time in the SC but attenuated in the spinal cord. Immunohistological examination of changes over time in inhibitory neurons and neurons in the spinal cord showed that Neu-N was unchanged and Pax2 was increased, suggesting a decrease in excitatory neurons, indicating that changes in excitatory neurons may correlate with AFI results. On the other hand, electrophysiological investigations in the spinal cord showed ambiguous sensory receptive fields in the spinal cord following neurological damage, while there was enhanced responsiveness to stimulation, results that were inconsistent with FAI and immunohistology.

研究分野：麻酔科学

キーワード：フラビン蛋白蛍光イメージング法 神経障害性疼痛 in vivoイメージング 大脳皮質一次体性感覚野 脊髄後角 免疫染色法

## 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛の一つである末梢神経損傷に伴う神経障害性疼痛は難治性であり、この発症には脊髄後角および脳の神経可塑性が重要な役割を果たしていることがこれまで多く報告されている。大脳皮質一次体性感覚野(S1)は有害刺激により興奮することが知られ、神経障害性疼痛においてもS1のシナプスの興奮性や可塑性が高まることが現在知られている。また、脊髄後角においても同様に神経興奮性とシナプス可塑性は、神経障害性疼痛状態で増強されると従来考えられており、*in vitro* 脊髄スライスを用いたパッチクランプの研究では、興奮性シナプス電流と細胞興奮性の両方が神経障害性疼痛モデルで増強し、*in vivo* パッチクランプ研究においても末梢神経損傷により、神経損傷側の後肢への無害な刺激による細胞興奮性と興奮性シナプス増強が誘導されることが報告されている。近年、神経障害性疼痛発生機序として末梢及び中枢神経系の神経炎症による中枢性感作が注目されている。

本研究では、生体において高い空間分解能で神経組織の表層領域の代謝活動のモニタリングを可能にする簡単かつ低侵襲のイメージング法である(Onishi T et al .2019; Shibuki K et al.2003 J Physiol; Watanabe T et al.2015 Sci Rep) フラビン蛋白自家蛍光イメージング(FAI)を用い、*in vivo* での大脳皮質一次体性感覚野及び脊髄後角の神経活動を評価し、神経障害性疼痛の発症と大脳皮質一次体性感覚野や脊髄後角の神経可塑性変化のメカニズムを明らかにしていきたい。

## 2. 当初の研究の目的

本研究では FAI を用いて神経障害性疼痛モデルマウスの大脳皮質一次体性感覚野及び脊髄後角の *in vivo* の神経活動を測定し、神経可塑性変化と神経炎症の関連性を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### <SNI モデルマウスの作成>

4-6 週齢の C57BL/6N 雄マウスを 1-3%イソフルラン吸入により麻酔し、左坐骨神経を露出・剥離し、坐骨神経の分枝である総腓骨神経、脛骨神経を 6-0 絹糸で結紮、遠位部を切断する。腓腹神経は温存し閉創する。Sham 手術は同様に左大腿部筋層まで剥離したマウスを作成する。

### <von Frey test による機械的痛覚過敏の測定>

SNI 施行前及び施行後 4-21 日に von Frey test を用いて疼痛閾値の変化を測定する。

### <大脳皮質一次体性感覚野のフラビン蛋白自家蛍光イメージング>

SNI、Sham 各群の 6 - 9 週齢の C57BL/6N マウスにウレタン 1.5g/kg を腹腔内投与して麻酔を行う。マウスの気管切開後、頭部皮膚を切除し、動かないように頭蓋骨を固定する。頭蓋骨表面の乾燥を防いで透明性を維持するために流動パラフィンを薄く塗布する。マウスを暗視下に置き、経頭蓋的に青色励起光(450-490nm)を脳表に照射し、脳表より放射される緑色自家蛍光(500-550nm)を冷却 CCD カメラにより撮影する(図 1)。反応は大脳皮質一次体性

感覚野より1秒当たり10フレームの頻度で撮影する。50秒毎に繰り返して得られた画像データを30回施行分加算平均した後、5×5マトリックスフィルターで平滑化して画質を向上させる。刺激直前の5フレームの平均を基準値( $F_0$ )とし、蛍光強度変化( $F/F_0$ )を算出し、疑似カラーを表示する。足底を刺激し、対側の体性感覚野のフラビン蛋白応答を観察・測定し、そのピーク値、経時変化、反応領域面積を解析する。

### < 脊髄後角のフラビン蛋白蛍光イメージング >

上記と同様の方法で、マウスをウレタンの腹腔内投与によって麻酔を行う。L1、L2の椎弓を切除し脊髄背面を露出し、脊髄固定具(STS-A; Narishige)を用いて椎体を固定し測定を行う(図2,3)。SNI、Sham各群の足底に振動刺激を与え、同側の脊髄のフラビン蛋白応答を観察・測定する。



図1: マウスの頭部と各感覚野の位置

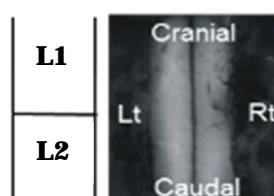


図2: 脊髄のイメージング画像

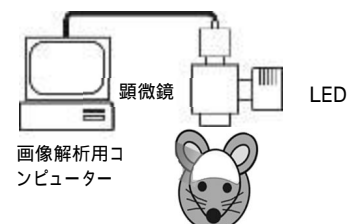


図3: 蛍光イメージングの実験セット

### < 神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角における足底刺激に対する脊髄後角ニューロンの反応性の電気生理学的検討 >

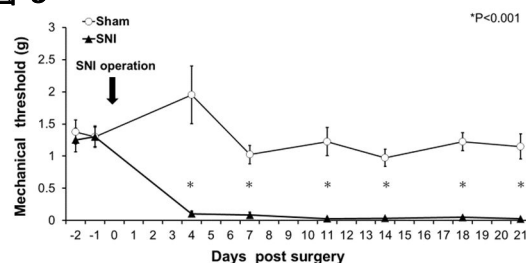
受傷後14日-21日のモデルマウス及び naïve マウスの障害側(とそれに対応する側の)後肢の第1、5趾をピンセットでつまむ(ピンチ刺激)、毛筆でタッチする(タッチ刺激)といった刺激を加えた際の脊髄後角ニューロンの発火様式を細胞外記録法により測定した。この際測定部位に対応する反応部位をFAIであらかじめ測定・マーキングし、マウスを麻酔下に電気生理学実験設備に移した後にタングステン電極をマーキングした部位からおよそ80-150 $\mu$ mの深さに刺入し、刺激に対する反応が得られる深さに微調整し、刺激に対する脊髄後角ニューロンの発火様式を記録した。

## 4. 研究成果

### (1) SNI手術後の後肢逃避反応の機械的閾値の低下

後肢逃避反応の機械的閾値を測定するために、von Frey filamentを用いて後肢足底外側(腓腹神経領域)を刺激した。SNI術後4日目に低下し、機械的刺激に対する痛覚過敏は、その後の3週間を通して安定して持続した。シャム群の逃避閾値は、実験期間を通して変化しなかった(図5)。(先行研究で確認済(科研費 若手研究 18K16474))

図5



## ( 2 ) SNI モデルマウスの S1 領域において神経活動は亢進した

本研究では、SNI 手術後の第 5 趾の非侵害機械的刺激によって誘発される同側 S1 反応の経時的变化を調べた。SNI 側左第 5 趾刺激後、右 S1 領域の応答領域、応答領域の信号強度変化率の平均値、面積強度は術後 4 日目から増加傾向を示したが( 図 6A ) 統計学的には有意な変化ではなく、術後 21 日目に初めて有意な増強となった( 図 6B )。 ( 先行研究で確認済 ( 科研費 若手研究 18K16474 ) )

図 6

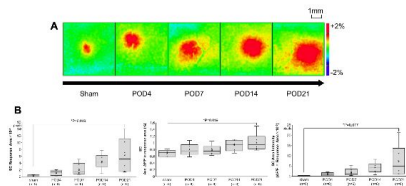
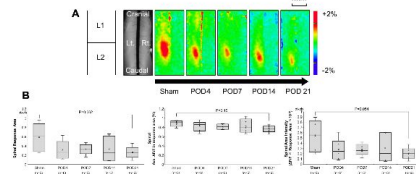


図 7



## ( 3 ) SNI 術後の背側脊髄において神経活動は増強しない

S1 領域での測定と同様に、SNI 手術後 4 日目、7 日目、14 日目、21 日目のマウスの脊髄の蛍光強度値を測定し、シャムマウスと比較した。我々の予想に反して、S1 での測定結果とは異なり、神経損傷後の後肢刺激に反応する脊髄後角の神経活動の面積および強度は、いずれも経時的な増強変化は認めず、統計学的な有意差はないものの、減弱傾向を示した( 図 7A,B )。 ( 先行研究で確認済 ( 科研費 若手研究 18K16474 ) )

## ( 4 ) 神経障害性疼痛モデル動物では、脊髄における反応の区別があいまい

**FAI** を用いて naïve マウス及び **SNI** マウスの第 1 趾及び第 5 趾を刺激して得られた受容野に対してピンチ刺激及びタッチ刺激を行い、細胞外記録を行ったところ、Naïve でも **SNI** でも 1 趾と 5 趾は区別可能だったが、naïve ラットでは 1 趾と 5 趾ははっきりと区別可能だったのに対して、**SNI** モデルでは 1 趾領域に電極を刺しても応答がはっきりしない、あるいは 5 趾に刺激をしても応答する。つまり、境界があいまいなことが明らかになった。また、刺激を加える前の自発発火については、**SNI** モデルで電位が大きい傾向が見られた( 図 8,9 )。今後詳細なデータの解析により、刺激に対する発火頻度や電位の定量的解析を行う予定である。

図 8

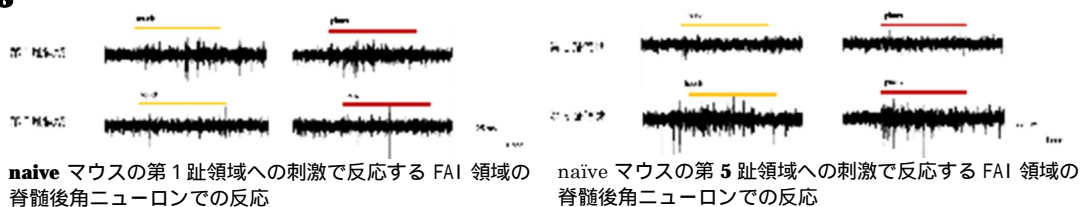
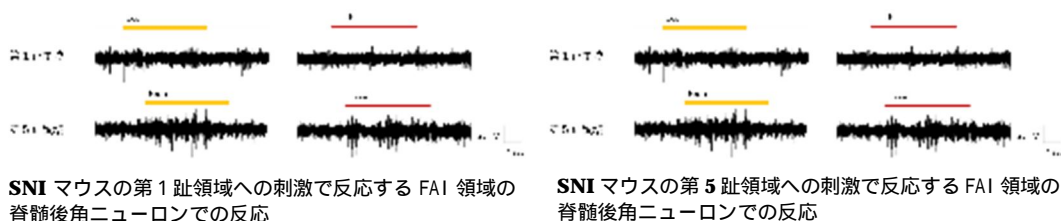


図 9

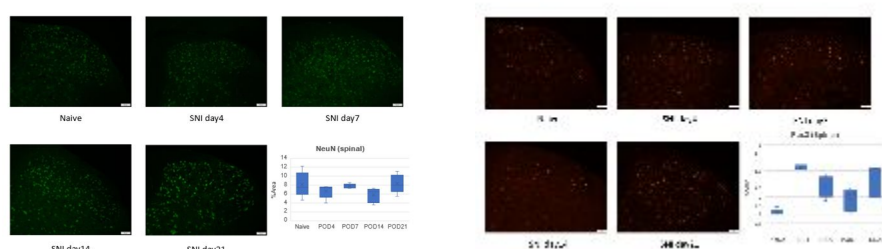


### (5) 末梢神経損傷後の SC や脊髄後角で見られた FAI での神経活動の変化はニューロンの可塑性変化との関連性を免疫組織学的に検討した

脊髄後角における抑制性ニューロンの喪失により興奮性ニューロンが優位となり下行性抑制系の抑制(脱抑制)が生じることで、相対的に上行性伝達経路の活動が亢進し、痛み刺激として SC の興奮性ニューロンの神経活動を亢進させて神経障害性疼痛を発症するのではないかと仮説を立て、naive マウスと SNI モデルマウスの SC 及び脊髄後角浅層のニューロンの経時的变化を免疫組織学的に検討した。

(5-1) 脊髄後角の神経細胞全体の数は SNI モデルにおいて経時的な変化はしなかった。一方、抑制性ニューロンは naive マウスに比較して増加傾向を認めた。(図 10)

図 10



(5-2) 大脳皮質一次体性感覚野において、神経細胞の数そのものは変化しなかった。大脳皮質における抑制性ニューロンについては脊髄と異なり Pax2 陽性となる報告は今のところないため、parvalbumin あるいは GAD65/67 など既知の抑制性ニューロンのマーカーを用いて解析を行う予定である。

本研究では、末梢神経損傷モデルマウスにおいて、脊髄後角の興奮性は変化していないか、あるいは低下傾向であるにも関わらず、S1 領域の興奮性が徐々に増加していることを示した。さらに、S1 領域の興奮性の増加と動物の痛み行動が一致しないことから S1 領域の興奮性の増加が動物の痛み行動の原因ではない可能性が考えられる。また、脊髄における電気生理学的検討から、神経障害に伴う脊髄内での感覚受容野は曖昧になる一方、刺激に対する反応性の増強が認められた。さらに、脊髄後角における免疫組織学的検討により、抑制性ニューロンの数自体はむしろ増加することが明らかとなったため、神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角における反応性の低下は抑制性ニューロンの増加を反映している可能性が示唆されるものの、電気生理学的結果と一致しないため、より工夫された研究手法を用いた解析が必要だと考えられた。本研究はこれまで信じられていた脊髄後角細胞や S1 領域の興奮性増強が必ずしも神経障害性疼痛を直接反映するものではなく、他の機序が存在することを示唆するものである。

末梢神経損傷に伴う脊髄のミクログリア活性の関与及び炎症性サイトカインの関与に関しては、新型コロナウイルス感染症による影響で研究を進められなかった時期があり、解明には至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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