

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月12日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22600005

研究課題名（和文） 脊髄における痛覚過敏メカニズムの神経活動イメージングによる解析

研究課題名（英文） The mechanism of hyperalgesia in the spinal dorsal horn revealed by imaging of neuronal activity

研究代表者

池田 弘（IKEDA HIROSHI）

福井大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：80377473

研究成果の概要（和文）：本研究では、炎症性痛覚過敏と損傷性痛覚過敏のモデル動物を作成し、それらの脊髄後角神経興奮の増強へのグリア細胞の関与を、膜電位イメージングとカルシウムイメージングによって調べた。実験の結果、脊髄後角での神経興奮は、コントロールに比べて炎症、損傷のどちらのラットでも増大していたが、その増強には、神経損傷ラットでは、ミクログリアが深く関与しており、炎症ラットではアストロサイトが深く関与していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：There are distinct glia-related mechanisms for the central sensitization in different persistent pain, that is microglia-related and astrocyte-related mechanisms in neuropathic and inflammatory pain, respectively.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：痛覚、イメージング、脊髄後角、グリア細胞、神経可塑性

1. 研究開始当初の背景

関節炎や癌性疼痛時に起こる持続的な痛みの過敏化（痛覚過敏）は、我々を苦しめるものであり、その有効な緩和方法の解明が急務とされている。痛覚過敏は、痛覚刺激を受け取る末梢の病巣が原因ではなく、その信号を脳へと伝える中継点である脊髄の神経結合あるいは、信号伝達の効率が変化することによって起こると考えられており、最近それを示す報告が多くされている。また、痛覚過敏には、グリア細胞の働きが重要な役割を担っていることが最近、報告されているが、その詳細な機序については明らかではない。

痛覚過敏を引き起こす要因には、大きく分けて皮膚などの炎症、神経損傷による神経因性疼痛がある。この2つの痛覚過敏は、グリア細胞が活性化される時間経過が異なることなどから、異なったメカニズムで起きると考えられるが、明らかにはされていない。また、シナプス可塑性には、短期的なもの、中期的なもの、長期的なものがあり、これらは異なったメカニズムによって起き、順に移行していくと考えられている。一方、グリア細胞は、さまざまなメカニズムで痛覚過敏に関与していることが示唆されており、本研究室においても、炎症1時間後、1日後、3日後

では関与するグリア細胞の種類が異なることや、メカニズムが異なることを示唆する結果が得られている。

2. 研究の目的

本研究では、

(1) 炎症ラット、神経損傷ラットの脊髄スライスを処置1時間後、1日後、3日後、1週間後と異なった期間で作成し、免疫染色によって、グリア細胞の形態変化、受容体などの数の変化を解析する。

(2) 同様のラットより、細胞が生きた状態で脊髄スライスを作成し、神経細胞とグリア細胞の活動を同時にイメージング可能なシステムを、共焦点顕微鏡と、高速、高感度、高解像度 CCD カメラを組み合わせることで構築する。このシステムを用いて、炎症ラット、神経損傷ラットより処置1時間後、1日後、3日後、1週間後と異なった期間で作成した脊髄スライスに、電気刺激を与えた時の神経細胞、グリア細胞の反応性の違い、種々の受容体を阻害した時の効果の違いなどを解析し、神経細胞とグリア細胞の働きが時々刻々どのような変化を示し、これら2つの細胞が相互にどのように影響を及ぼし合っているのか、またその変化は炎症ラットと損傷ラットでは異なるのかを明らかにする。

以上の2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成と行動実験

炎症を起こす物質としてよく知られている完全アジュバンドという薬品を、ラットの後肢の足裏に注入し、炎症ラットを作成した。また、坐骨神経を露出し、糸で結紮することによって神経損傷ラットを作成した。これら2つのグループのラットの足裏に圧力刺激を与え、後肢を引っ込めるまで、徐々に圧力を大きくし、引っ込めた時の圧力の大きさを痛みの閾値とし、その閾値が下がっているかを行動実験によって計測した。処置直後（1時間後）、中期（3日後）、長期（1週間後）にこのように痛み閾値を計測し、痛覚過敏が起きているかを調べた。

(2) 免疫染色

ノーマルラット、炎症ラット、神経損傷ラットから処置1時間後、3日後、1週間後の脊髄スライスを作成し、脊髄内に存在するグリア細胞であるアストロサイトとマイクログリアをそれぞれの特異的なマーカーで免疫染色し、それぞれのグリア細胞の形態変化や数の変化、及びグリア細胞に存在する ATP の受容体の数の変化やキナーゼのリン酸化を時系列で解析した。

(3) 神経興奮の比較

炎症ラット、神経損傷ラットより脊髄スライスを作成し、入力線維の束である後根へ単発の電気刺激を与えた時の神経興奮の大き

さを比較した。また、これらの神経興奮が、アストロサイト、マイクログリアの抑制剤や、グリア細胞が特異的に持っている ATP 受容体の阻害薬、グリア細胞でリン酸化されると考えられているキナーゼの抑制剤などを還流することによって、どのような影響を受けるのかを調べた。

4. 研究成果

(1) 痛覚閾値の計測

炎症性疼痛ラットでは、処置1日後から1週間持続する痛覚過敏が両側性に見られた。神経因性疼痛ラットでは、処置1日後から1週間持続する痛覚過敏が同側で見られた（図1）。

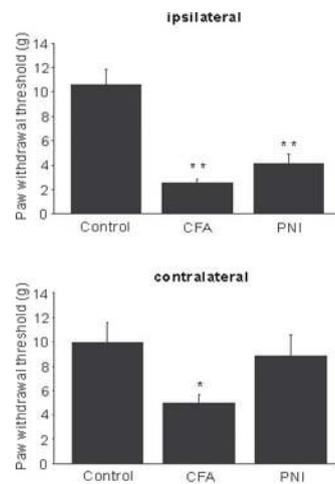


図1 行動実験

(2) 免疫染色

炎症性疼痛ラット、神経因性疼痛ラットの脊髄後角をアストロサイトのマーカーである GFAP、マイクログリアのマーカーである OX42 で免疫染色を行った結果、炎症性疼痛ラットでは、GFAP の蛍光強度に有意な増加が見られ、神経因性疼痛ラットでは、OX42 に有意な増強が見られた（図2）。

(3) 神経興奮の比較

ノーマル、炎症性疼痛、神経因性疼痛ラットの後根を電気刺激した際の脊髄後角表層の神経興奮を比較した。実験の結果、ノーマルラットに比べて、炎症性疼痛、神経因性疼痛ラットの神経興奮が増大していることがわかった（図3）。

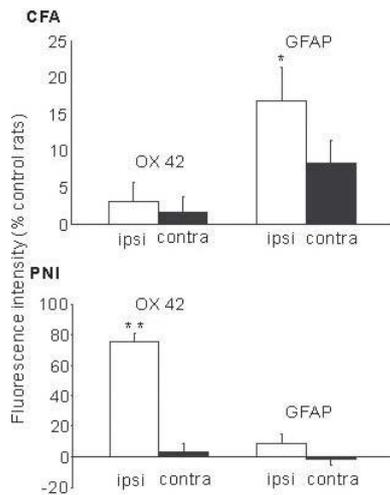


図2 免疫染色

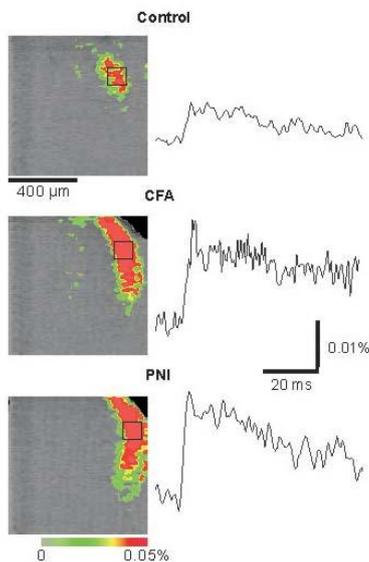


図3 神経興奮の比較

(4) 受容体拮抗薬、キナーゼ阻害薬の神経興奮への影響

また、ミクログリアの代謝阻害薬であるミノサイクリンによって、ノーマル、炎症性疼痛、神経因性疼痛のすべてのラットの神経興奮を抑制したが、特に、神経因性疼痛ラットで顕著であった(図4)。

非選択的ATP受容体阻害薬であるsuraminは、炎症性疼痛、神経因性疼痛ラットのどちらの神経興奮も抑制したが、特異的P2X_{1,2,3,5}受容体拮抗薬PPADSは、炎症性疼痛ラットの神経興奮を著明に抑制した。また、PPADS投与後の特異的P2X_{1,2,3,4}受容体拮抗薬TNP-ATPの投与では、神経因性疼痛ラットの神経興奮のみが著明に抑制された(図4)。したがって、炎症性疼痛の神経興奮の増大にはP2X₄受容体以外のATP受容体が関与しており、神経因性疼痛の神経興奮の増大にはP2X₄受容

体が関与していると考えられる。また、神経因性疼痛ラットの神経興奮は、p38MAPKの阻害薬であるSB203580によっても有意に抑制された(図4)。このことより、神経因性疼痛ラットの神経興奮の増強には、P2X₄受容体を介したp38MAPKのリン酸化が関与していると考えられる。

また、アストロサイトの阻害薬であるL- α -aminoadipate(L- α -AA)によって、炎症性疼痛ラットでの神経興奮は抑制されたが、ノーマルラット、神経因性疼痛ラットの神経興奮では、変化が見られなかった。また、ギャップ結合のブロッカーであるcarbenoxolone、およびJNKの阻害薬であるSP600125によっても同様の結果が得られた(図4)。これらの結果より、炎症性疼痛ラットで見られた神経興奮の増強には、アストロサイト、ギャップ結合、およびJNKが関与していると考えられる。

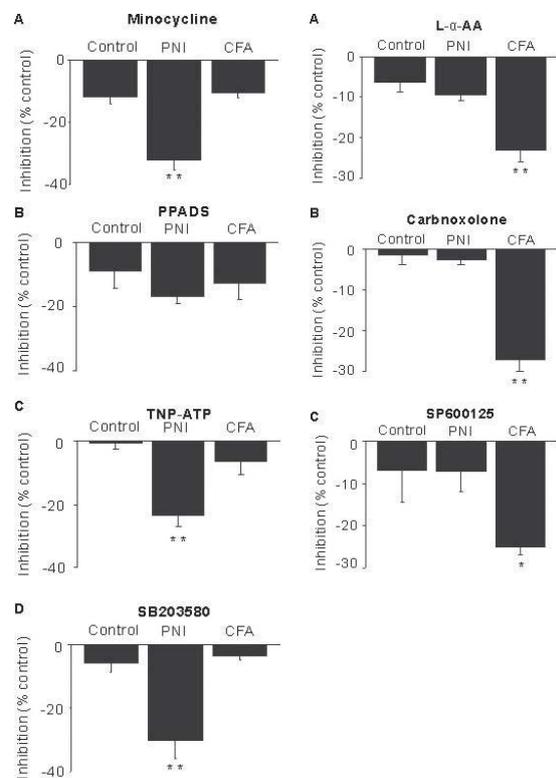


図4 神経興奮の抑制

また、ノーマルラットに比べて、P2X₄受容体を介したカルシウムシグナルがより多くのグリア細胞で見られ、より活性化されていることがわかった。これらの結果は、痛覚過敏が、脊髄後角内のグリア細胞にP2X₄を介した可塑的变化が起き、その変化が神経興奮を促進させるために起こることを示唆する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K, Contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization, inflammatory and neuropathic pain in the juvenile rat. *Molecular Pain*, 査読有, 8, 2012, DOI:10.1186/1744-8069-8-43.
- ② Omata N, Murata T, Maruoka N, Ikeda H, Mitsuya H, Mizuno T, Mita K, Asano M, Kiyono Y, Okazawa H, Wada Y. Effect of dietary zinc deficiency on ischemic vulnerability of the brain. *Neuroscience Letters*, 査読有, 531, 2012, 10-13.
- ③ Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K. Long-term potentiation of neuronal excitation in the central nucleus of the rat amygdala revealed by imaging with a voltage-sensitive dye. *Brain Research*, 査読有, 1349, 2010, 32-40
- ④ Ueda K, Hirose M, Murata E, Takatori M, Ueda M, Ikeda H, Shigemi K. Local administration of a synthetic cell-penetrating peptide antagonizing TrkA function suppresses inflammatory pain in rats. *Journal of Pharmacological Science*, 査読有, 112, 2010, 438-443.

[学会発表] (計 11 件)

- ① 高須 俊太郎, 池田 弘, 村瀬 一之, 竹内 翔汰, Contribution of the descending pain inhibitory system to the analgesic effect by smelling the aroma oil. 第 35 回日本神経科学学会, 2012. 9. 19, 愛知県名古屋
- ② 池田 弘, 林 努, 村瀬 一之, 前帯状回における神経興奮の長期増強へのアストロサイトの関与. 第 35 回日本神経科学学会, 2012.9.19, 愛知県名古屋
- ③ H. Ikeda, K. Mochizuki, K. Murase, Astrocyte involves in the long-term facilitation of neuronal excitation in the anterior cingulate cortex of mice with inflammatory pain. NIPS-WS 2012 Central Neuroplasticity in Sensory Emotional Link 2012.9.13, 愛知県岡崎市
- ④ 竹内 祥太, 池田 弘, 村瀬 一之, Contribution of emotional and descending pain inhibitory system in the brain to analgesia effect of lemon odor. 第 33 回日本疼痛学会, 2011.7.22, 愛媛県松山市
- ⑤ 池田 弘, 村瀬 一之, Role of glial cells to the neuronal plasticity in the spinal dorsal horn under hyperalgesia. 第 33 回日本疼痛学会, 2011.7.22, 愛媛県松山市
- ⑥ 池田 弘, 村瀬 一之, Differential

contribution of microglia and astrocytes to the central sensitization under peripheral nerve injury and tissue inflammation. 第 34 回日本神経科学学会, 2011.9.16, 神奈川県横浜市

- ⑦ 村山 美郷, 池田 弘, 村瀬 一之, Augmentation of neuronal excitability by glial cells in the rat spinal dorsal horn under persistent pain state revealed by optical imaging with voltage-sensitive dye. 第 34 回日本神経科学学会, 2011.9.16, 神奈川県横浜市
- ⑧ Ikeda H, Kiritoshi T, Murase K, Contribution of the glial activity to the facilitation of neuronal excitation in the rat spinal dorsal horn under neuropathic pain. *Neuro2010*, 2010.9.4, 兵庫県神戸市
- ⑨ Kiritoshi T, Ikeda H, Murase K, Involvement of protein kinases in pain-related synaptic plasticity in the rat central nucleus of the amygdala. *Neuro2010*, 2010.9.4, 兵庫県神戸市
- ⑩ Ebuchi T, Ikeda H, Murase K, The mechanism of long-term facilitation of optically-recorded neuronal excitation and the effect of mu-opioid receptor agonist DAMGO in the rat central nucleus of the amygdala. *Neuro2010*, 2010.9.4, 兵庫県神戸市
- ⑪ Murayama M, Ikeda H, Murase K, Contribution of glial cells on the optically-recorded neuronal excitation in the rat spinal dorsal horn under neuropathic pain. *Neuro2010*, 2010.9.4, 兵庫県神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田 弘 (IKEDA HIROSHI)
福井大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号：80377473

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：