

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860380

研究課題名(和文)慢性疼痛形成時の一次体性感覚野におけるグリア性シナプス再編機構の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of glial cell-dependent synapse remodeling in primary somatosensory cortex underlying development of chronic pain

研究代表者

柴田 圭輔 (SHIBATA, Keisuke)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号：50580411

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)：本研究では、神経障害性疼痛モデルマウスのS1で起こるATPシグナルの時間依存的変化と慢性機械的アロディニア形成への関与について調べた。その結果、1)神経障害性疼痛モデルマウスのS1では、シナプス再編が活発に起こる時期に先行して時間限定的なATP濃度上昇が起こることを見出した。また、2)S1頭蓋窓へのATP滴下(10分間静置)により、末梢神経損傷後のS1アストロサイトに見られる機能変調及びシナプス再編、さらには慢性的機械アロディニアが誘導されることを見出した。本研究結果から、末梢神経損傷後にS1で起こる細胞外ATP濃度上昇が神経障害性疼痛形成メカニズムの必要条件であることが強く示唆された。

研究成果の概要(英文)：We showed that an increase in extracellular ATP concentration ([ATP]e) in S1 by PNI is an initial event that triggers the astrocyte-mediated mechanical allodynia. Using microdialysis screening in vivo, we found that 1) [ATP]e was increased within contralateral S1 by PNI, which was preceded by synapse-remodeling, 2) a single brief ATP-treatment into S1 was enough to induce excess Ca²⁺ excitation and up-regulation of thrombospondin-1 (TSP-1), one of synaptogenic factors, in astrocytes, synapse-remodeling in S1 and subsequent mechanical allodynia, and 3) the ATP-induced mechanical allodynia was dependent on astrocytic Ca²⁺ excitation. These results suggested that the increase in [ATP]e within S1 is a key event that initiates the astrocyte-dependent synapse-remodeling and subsequent mechanical allodynia.

研究分野：神経薬理学

キーワード：アストロサイト 神経障害性疼痛 一次体性感覚野 ATP シナプス再編 神経回路組み替え

1. 研究開始当初の背景

これまで神経障害性疼痛研究は国内外ともに末梢神経及び脊髄を中心に展開されてきた。しかし、末梢神経損傷後から数日後までの間に、知覚情報の最終到達点である大脳一次体性感覚野 (S1) で、神経回路の組み替え (シナプス再編) が活発に起こっていることが、神経障害性疼痛モデルマウスを用いた基礎実験により証明された (Kim et al., Mol. Pain, 7:87, 2011)。つまり、S1 におけるシナプス再編が慢性疼痛の原因である可能性が示されたのである。従って、これまでの末梢神経及び脊髄の研究だけでなく、「S1 で起こるイベント及びその理解」が難渋する本疾患の分子病態解明には必須であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 我々はこれまでに、多光子励起レーザー顕微鏡を用いた *in vivo* ライブイメージング法により、このシナプス再編はグリア細胞 (特にアストロサイト) の変化により誘導される「グリア性シナプス再編」であることを明らかとしている。しかし、このグリア性シナプス再編の分子メカニズムは未解明のままである。

一方、ATP は生体のエネルギー通過としての役割だけでなく、グリア伝達物質としてグリア細胞から放出され神経機能をダイナミックに制御する役割も持つ。我々は本研究に先立ち、抹消神経損傷後に S1 細胞外 ATP 量が増加すること、また ATP を正常マウスの S1 に直接投与すると神経障害性疼痛様の知覚異常 (アロディニア) が長期間にわたり観察されることを見出している。これらの結果は、S1 における ATP 増加がグリア性シナプス再編及び神経障害性疼痛の病態形成・維持メカニズムの鍵イベントである可能性を強く示唆するものである。そこで本研究では、グリア性シナプス再編の分子メカニズムを、細胞外 ATP の役割を切り口として解明することを計画した。

(2) 前述の通り、ATP を正常マウスの S1 に単回投与しただけで長期間にわたる疼痛行動が誘発されたが、この結果は S1 の操作だけで知覚情報をコントロールできることを示唆している。従って、我々は「シナプス再編によって組み替えられた異常な知覚神経回路を」、再びシナプス再編を誘導 (シナプス再々編) することにより、正常な神経回路に戻すことができる」との仮説を立てた。そこで、本研究では慢性化した神経障害性疼痛モデル動物を用いて、人工的にシナプス再編を誘導することにより神経障害性疼痛を治療するというチャレンジングな課題に取り組む、新たな治療戦略の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデル: 片側坐骨神経を部分的に強固に結紮することにより作製

した (Seltzer's モデル)。

(2) S1 内 ATP 量の測定: *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて S1 の細胞外液性因子を回収し、ルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイ法を用いて回収液中の ATP 量を定量した。回収中の ATP 分解を回避する為に、ATP 分解酵素阻害薬 (ARL67156; 50 μ M) を灌流液中に添加した。

(3) 疼痛行動評価: von Frey test, plantar test, 電流知覚閾値試験 (Current Perception Threshold test; CPT test) を行った。CPT 法は電気刺激の周波数によって知覚神経選択的な刺激が可能である Neurometer®を用いて片側後肢の足趾を電気刺激し、回避行動を示した電流強度を閾値と評価する方法である [A β 線維: 2000 Hz, A δ 線維: 250 Hz, C線維: 5 Hz]。

(4) S1 アストロサイトサイトの関与: アストロサイト特異的 GCaMP3 発現マウス (Glast-CreERT2::RoSA26-loxP-STOP-loxP-GCaMP3 マウス) を用いた *in vivo* 二光子カルシウムイメージング、免疫組織化学染色法、アストロサイトの細胞内カルシウム振動が阻害された IP₃-R2 欠損マウスでの疼痛行動評価を行った。

(5) S1 シナプス再編の観察: Thy1-GFP マウス (大脳皮質 V 層の錐体細胞に GFP が発現) を用いて、*in vivo* 長期繰り返し二光子イメージングを行った。

4. 研究成果

(1) 末梢神経損傷により S1 における ATP 濃度が一過性に増加した。

神経障害性疼痛モデルマウスの S1 における ATP 増加の程度及び経時変化を調べるために、*in vivo* マイクロダイアリシス法により S1 より細胞外 ATP を回収し、ルシフェリン-ルシフェラーゼアッセイ法を用いて回収液中の ATP 量を定量した。S1 における細胞外 ATP をマイクロダイアリシスによって断続的に回収し ATP 濃度を測定したところ、末梢神経損傷前と比較して損傷後 1 時間~2 日に有意な増加が認められ、3 日後以降は損傷前と同程度であった (図 1)。興味深いことは、この一過性の S1 における ATP 濃度増加 (S1/ATP 増加) はシナプス再編が活発に起こる時期に先行して起こっていたことである。また、S1/ATP 増加が末梢神経損傷によるアロディニア形成に関与するか否かを確かめるために、ATP 及びその分解物であるアデノシンの全関連受容体に対するアンタゴニストの混合液を S1 に投与したところ、末梢神経損傷後に起こるアロディニアが顕著に抑制された (データ示さず)。これらの結果から、末梢神経損傷によって起こる S1/ATP 増加は S1 シナプス再編及びその結果誘導されるアロディニアの引き金である可能性が

示唆された。

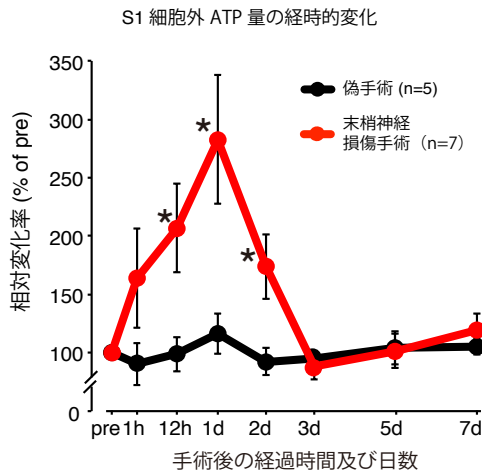


図1 S1細胞外ATP量の経時的変化

(2) S1/ATP 投与によりアロディニアが形成されるが、熱痛覚過敏は形成されなかった。

我々はATPをS1に投与(S1/ATP投与)することで神経障害性疼痛の主徴であるアロディニアだけでなく、もう一つの熱痛覚過敏も慢性的に形成されるか否かについて検討した。S1/ATP投与によりアロディニアが形成されたマウスを用いてplantar試験を行ったが、神経障害性疼痛モデルマウスで見られる熱痛覚過敏は形成されなかった(図2A)。この結果をさらに検証するために、Neurometer®を用いた各種知覚線維選択的電流閾値(current perception threshold: CPT)測定を行ったところ、Aβ線維のCPTのみ有意に低下し、Aδ及びC線維のCPTは変化が見られなかったことから(図2B)、やはり、S1/ATP投与によりアロディニアが形成されるが、熱痛覚過敏は形成されないことが明らかとなった。これらの結果は神経障害性疼痛の関連症状がそれぞれ異なるメカニズムで制御されている可能性を示している。

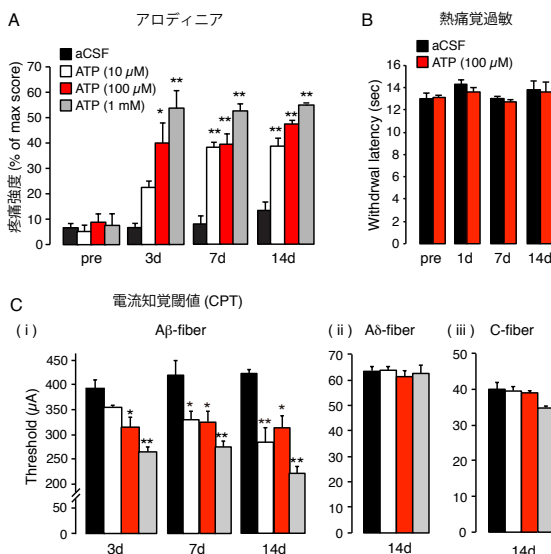
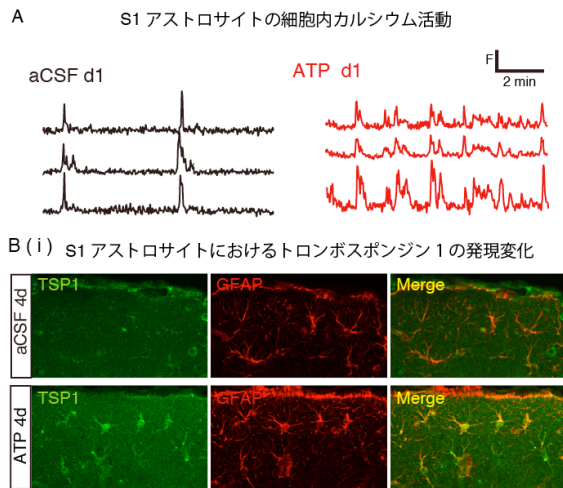


図2 S1/ATP投与による疼痛行動の変化

(3) S1/ATP投与によりS1アストロサイトの細胞内カルシウム活動亢進及びthrombospondin-1(TSP1)発現量増加が誘導された。

S1/ATP刺激したアストロサイト特異的GCaMP3発現マウスのS1アストロサイトの細胞内カルシウム活動を二光子顕微鏡で長期間観察したところ、投与前と比較して投与後1時間、24時間(1日)、3日目に顕著に細胞内カルシウム振動の頻度が亢進していた(図3A)。我々はアストロサイトの細胞内カルシウム活動の亢進がシナプス新生促進因子の一つであるthrombospondin-1(TSP1)発現増加を誘導することを報告している(Kim et al., Journal of Clinical Investigation, 2016)。そこで、免疫組織染色法によってATP/S1投与4日後のS1アストロサイトでのTSP1発現量を定量したところ、対照のaCSF投与マウスと比較してATP投与群では有意にTSP1発現量が増加していた(図3B)。一方、アストロサイトの細胞内カルシウム活動が阻害されたIP₃R2-KOマウスではATP/S1投与によるTSP1増加促進効果が顕著に抑制され(図3B)、さらにアロディニア形成も抑制された(図3C)。これらの結果から、ATP/S1投与によるアストロサイトの細胞内カルシウム振動亢進がTSP1発現増加及びアロディニア形成に寄与していることが明らかとなった。



(ii) TSP1発現量(定量結果)

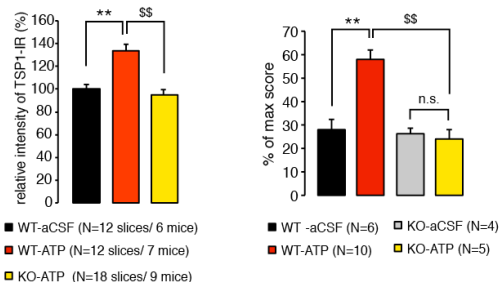


図3 S1/ATP投与によるS1アストロサイトの機能変化及びアロディニア形成への関与

(4) S1/ATP 投与により S1 シナプス再編が誘導された。

Thyl-GFP マウス (大脳皮質 V 層の錐体細胞に GFP が発現) に S1/ATP 投与し、二光子励起レーザー顕微鏡で神経樹状突起 (特にシナプス) の形態変化を経日的に観察したところ、投与直後から投与 1 日後にかけて新生スパイン数及び除去スパイン数が顕著に増加した (図 4)。この結果は、S1/ATP 投与によって S1 シナプスターンオーバーが誘導されること、つまり、神経回路の組み替えが起こっている可能性があることを示唆している。さらに、この結果は ATP 制御がシナプス再編を誘導するための有用なツールとなることも示している。

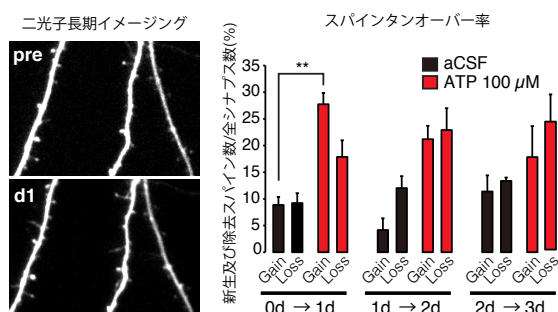


図 4 S1/ATP 投与による S1 シナプス構造変化

以上、本研究結果から、末梢神経損傷後に S1 で起こる細胞外 ATP 濃度上昇がアロディニア形成の必要十分条件であること明らかとなった。また、ATP 投与によりアストロサイトにおいて TSP 1 産生・放出増加し、シナプス再編が誘導されることも見出した。

本研究結果で明らかとなった ATP 制御によるアストロサイト性シナプス再編機構は、神経障害性疼痛形成メカニズムとして重要であるだけでなく、新規治療戦略としても高いポテンシャルを有しており、神経障害性疼痛治療研究の布石の一つに位置付けることができると考えられる。

しかし、S1/ATP 投与によってアロディニアのみが形成されたことから、S1 内 ATP 制御だけでは治療戦略としては不十分であることも分かった。また、脳への ATP 投与は低侵襲ではあるものの、臨床応用には未だ高い壁がある。今後、より正確な、かつ臨床応用可能な ATP 制御する手法の探索を含め、さらなる研究が必要である。

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 3 件)

① Mizuno K, Shibata K, Komatsu R, Omiya Y, Kase Y, Koizumi S. An effective therapeutic approach for oxaliplatin-induced peripheral neuropathy using a combination therapy with

goshajinkigan and bushi. *Cancer Biol Ther.* 査読有、2016、Nov;17(11):1206-1212.

② Miyamoto A, Wake H, Ishikawa AW, Eto K, Shibata K, Murakoshi H, Koizumi S, Moorhouse AJ, Yoshimura Y, Nabekura J. Microglia contact induces synapse formation in developing somatosensory cortex. *Nat Commun.* 査読有、2016、7:12540. doi: 10.1038/ncomms12540.

③ Kim SK, Hayashi H, Ishikawa T, Shibata K, Shigetomi E, Shinozaki Y, Inada H, Roh SE, Kim SJ, Lee G, Bae H, Moorhouse AJ, Mikoshiba K, Fukazawa Y, Koizumi S, Nabekura J. Cortical astrocytes rewire somatosensory cortical circuits for peripheral neuropathic pain. *J Clin Invest.* 査読有、2016、126(5):1983-97. doi: 10.1172/JCI82859.

① 柴田圭輔、久保田啓太、石川達也、篠崎陽一、繁富英治、御子柴克彦、鍋倉淳一、小泉修一、一次体性感覚野の ATP 増加がアストロサイト性シナプス再編及び機械的アロディニアを引き起こす、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日、「長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール アストピア (長崎)」

② 檀上洋右、繁富英治、柴田圭輔、高梨健太、金善行、鍋倉淳一、小泉修一、神経障害性疼痛の発症には大脳皮質体性感覚野のアストロサイトにおける mGluR5 発現上昇が必要である、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、「長崎ブリックホール、長崎新聞文化ホール アストピア (長崎)」

③ 柴田圭輔、久保田啓太、石川達也、鍋倉淳一、小泉修一、慢性疼痛形成時の一次体性感覚野における ATP の役割、第 20 回 Japan Purine Club Meeting、2016 年 10 月 26 日、「東京慈恵会医科大学 (東京)」

④ 高梨健太、柴田圭輔、水野景太、大宮雄司、小泉修一、牛車腎気丸の抗発癌誘発ニューロパチー抑制作用、第 18 回応用薬理シンポジウム、2016 年 8 月 6 日、「名古屋大学 (愛知)」

⑤ 小泉修一、柴田圭輔、ブシ末による慢性疼痛のグリア性制御 (ショートセッション)、第 46 回日本神経精神薬理学会年会、2016 年 7 月 3 日、「ソウル (韓国)」

⑥ 久保田啓太、柴田圭輔、江藤圭、稲田浩之、石川達也、高梨健太、繁富英治、篠崎陽一、鍋倉淳一、小泉修一、アストロサイトのプリン作動性シグナルによる一次体性感覚野における神経ネットワーク制御、第 89 回

日本薬理学会年会、2016年3月9日、「パシ
フィコ横浜（神奈川）」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 圭輔 (SHIBATA, Keisuke)

山梨大学・大学院総合研究部・助教

研究者番号：50580411