

「大脳皮質のシナプス可塑性に着目した慢性疼痛による睡眠障害の分子機構」

兵庫医科大学 生理学 神経生理部門 古賀 浩平

1 研究の背景と目的

慢性疼痛患者は国民の約 25%存在する深刻な疾患である。慢性疼痛を患うと痛覚過敏を示す。その他に合併する主症状として、不安やうつなどの負の情動を形成し慢性疼痛を増悪させることが知られている。さらに、慢性疼痛が睡眠に影響し睡眠障害を引き起こすことが挙げられている。しかしながら、慢性疼痛がいかに睡眠障害を引き起こすかを神経レベルで明らかにした報告はほとんどない。

申請者はこれまでに、慢性疼痛と負の情動に重要な脳部位である前帯状回に着目し、前帯状回のシナプス前終末における長期増強を同定した (Koga et al., J Neurosci 2015)。さらにこのシナプス前長期増強の機能が、慢性疼痛による不安のシナプス可塑性であることを明らかにしてきた (Koga et al., Neuron 2015; Koga et al., J Neurosci 2017)。

我々は、カテコールアミンの一つであるノルアドレナリン (NA)に着目している。興味深いことに、NA を含有する細胞群は、橋の青斑核から前帯状回を含む脳全体に投射することが解剖学的に知られており、NA は覚醒度と睡眠の制御に重要な役割を果たしていると考えられている(Sara, Nature Reviews Neuroscience 2009)。

本研究では、前帯状回において NA が興奮性シナプス伝達にいかなる調節を行っているかをシナプスから個体レベルで明らかにする。具体的には NA の作用と関係する NA 受容体、そして細胞内メカニズムを *in vitro* と *in vivo* の実験系から調べる。

2 研究方法・研究内容

方法

動物；

成熟の雄マウス (C57BL/6J、8-12 週齢)と週齢が同等の Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase type 1 knockout (AC1 KO mice)、 Ca^{2+} -stimulated adenylyl cyclase type 8 knockout (AC8 KO mice)を *in vitro* ホールセルパッチクランプ記録の解析に用いた。成熟の雄ラット (Sprague Dawley: SD, 250-300 g) を *in vivo* 細胞外記録に用いた。

脳スライス標本を用いた前帯状回からのホールセルパッチクランプ記録法；

冷やした標準人工脳脊髄液を用いて、脳スライス作成用のスライサーにより脳冠状断スライスを 300 μm の厚さで作製した。標準 K-gluconate 内液もしくは標準セシウム内液を用いて、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録を行った。AMPA/カイニン酸受容体を介した興奮性シナプス伝達は、標準 K-gluconate 内液を用いて、記録細胞を -60 mV に電位固定して記録を行った。GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス伝達は、標準セシウム内液を用いて、記録細胞を 0 mV に電位固定して解析を行った (Axon 200B、Molecular device)。シナプス伝達に対する NA の効果は、10、50、100 μM の NA を灌流投与して調べた。NA 受容体の同定は、 $\alpha 1$ 受容体拮抗薬 prazosin、 $\alpha 2$ 受容体拮抗薬 yohimbine もしくは β 受容体拮抗薬 propranolol を前もって灌流投与した後に NA を灌流投与した。

In vivo 細胞外記録法；

ラットにウレタン麻酔を施し (1.2-1.5 g/kg、腹腔内投与)、脳を脳固定装置に固定した。前帯状回と青斑核上部の骨をドリルで取り除き、硬膜をそれぞれ除去した。記録用タングステン電極を前帯状回に刺入して活動電位を記録した。細胞外記録が安定した後、NA ま

たはβ受容体作動薬を灌流投与した。前帯状回に投射する青斑核を活性化させる時は、事前に青斑核に双極タングステン電極を留置した。前帯状回からの細胞外記録が確立したのち青斑核に頻回電気刺激を与えた(Choi et al., J Physiol Sci. 2017)。

解析・統計；

データは平均値±標準誤差で表した。二群間の統計には Student's t-test、多群間の比較には分散分析を用いた。P 値が 0.05 未満を有意な差とした。

具体的な研究内容；

- ① 前帯状回の興奮性シナプス伝達と抑制性シナプス伝達に対する NA の作用
- ② NA が作用する受容体の同定と NA シグナリングの分子機構
- ③ 生きたラットの青斑核を電気刺激した時と NA を前帯状回に灌流投与した時の前帯状回の神経応答

3 研究成果

- ① 前帯状回の興奮性シナプス伝達と抑制性シナプス伝達に対する NA の作用

これまでの我々の先行研究において、前帯状回に投射する NA を含有する神経終末を調べた結果、NA 線維は主に興奮性神経伝達物質をもつ錐体細胞に投射していることが明らかとなっている。一方、抑制性細胞には NA 線維はほとんど投射していない。

従って、興奮性および抑制性シナプス伝達に対する NA の役割を明らかにするために、前帯状回の第 II/III 層の錐体細胞からホールセルパッチクランプ記録法を行い、グルタミン酸の放出と AMPA/カイニン酸型受容体を介する興奮性シナプス伝達を記録した(Koga et al., J Neurosci 2015a, Neuron 2015b, J Neurosci 2017)。その後、NA (10, 50, 100 μM)を灌流投与した結果、興奮性シナプス伝達の発生頻度の増加、すなわちグルタミン酸の放出が促進された (図 1)。

次に、NA が抑制性シナプス伝達に影響するかを調べた結果、NA は自発性抑制性シナプス後電流の発生頻度と振幅に効果を示さなかった (図 2)。以上の結果から、NA は興奮性シナプス伝達に作用し、抑制性シナプス伝達には影響しないことが示唆された。

- ② NA が作用する受容体の同定と NA シグナリングの分子機構

次に、興奮性シナプスにおいて NA が作用する受容体を薬理的に同定した。α1 受容体拮抗薬 prazosin、α2受容体拮抗薬 yohimbine もしくはβ受容体拮抗薬 propranolol を前もって灌流投与した後に、NA を灌流投与すると、propranolol は NA によるグルタミン酸の放出促進効果を抑制した。一方、prazosin や yohimbine は NA の効果に影響しなかった (図 3)。このことから、NA はβ受容体を介してグルタミン酸の放出を促進することが明らかとなった。

図1 NAは前帯状回の興奮性シナプス伝達を促進させる。

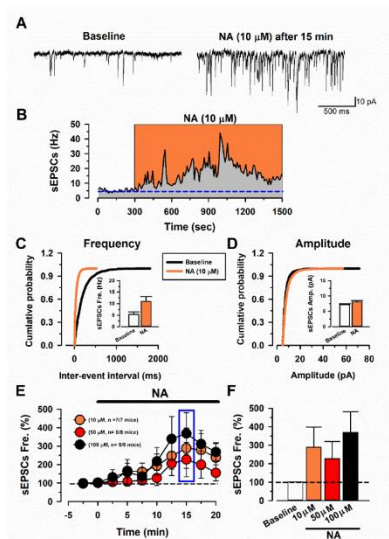
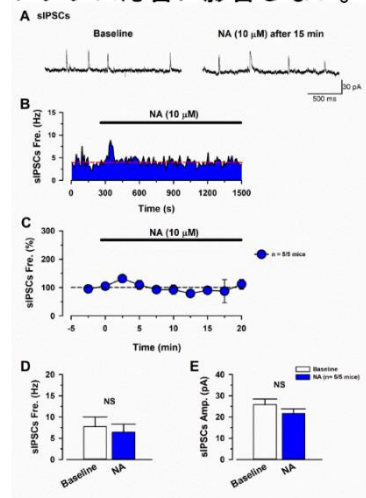
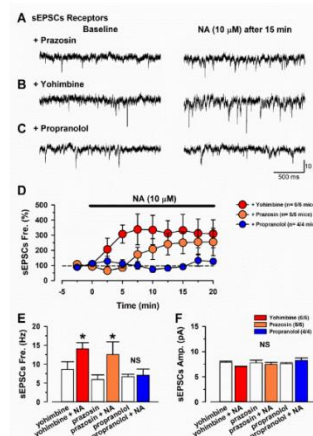


図2 NAは前帯状回の抑制性シナプス伝達に影響しない。



次に、NA β 受容体はGタンパク質共役型受容体なので、cAMPの合成酵素であるアデニル酸シクラーゼ(AC)の関与が考えられる。従って、NAの下流であるACのサブタイプを同定した。AC1とAC8は主なCa²⁺-stimulated adenylyl cyclaseのサブタイプである。我々は、AC1 KOマウスとAC8 KOマウスの2つの遺伝子改変マウスから脳スライス標本を作製して、上記の実験と同様にホールセルパッチクランプ記録を行った。NAを灌流投与するとAC8 KOマウスはNAによるグルタミン酸促進効果を抑制した。一方、AC1 KOマウスはNAの効果に影響しなかった(図4)。

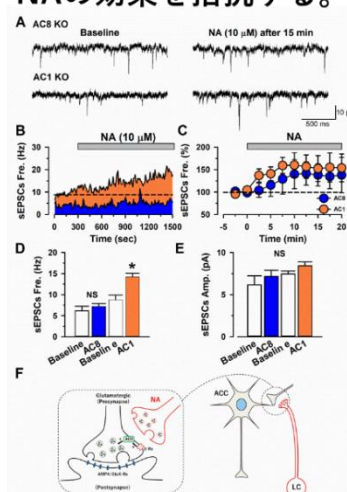
図3 NAは β 受容体を介してグルタミン酸放出を促進する。



③ 生きたラットの青斑核を電気刺激した時とNAを前帯状回に灌流投与した時の前帯状回の神経応答

前帯状回におけるNAの機能をより生理学的な条件下で検討した。ラットにウレタン麻酔を施し、前帯状回の記録前に青斑核に電気刺激用の電極を埋め込んだ。その後、前帯状回から細胞外記録を行い、青斑核を電気刺激した時の前帯状回の神経興奮応答を解析した。記録が安定したのち、青斑核のNA細胞群に20 Hzの周波数の頻回電気刺激を与えると、前帯状回の活動電位の発生頻度が有意に上昇した(図5)。

図4 AC8 KOマウスはNAの効果을拮抗する。



さらに、NAや β 受容体作動薬を前帯状回の脳表面から灌流投与しても前帯状回における活動電位の頻度が上昇した(図6)。

以上の結果から、青斑核から前帯状回に投射する細胞群を活性化すると前帯状回における活動電位の発生頻度が上昇すること、またNAによる効果には β 受容体が関与することが生理的条件下においても示された。

考察；

本研究から、NAが慢性疼痛や慢性疼痛による不安に関与する前帯状回において興奮性シナプス伝達を制御すること、特にNAは興奮性シナプスの神経終末に作用して、グルタミン酸の放出を促進させることが明らかとなった。さらに、NAが作用する受容体は β 受容体であることが薬理的検討から明らかとなった。 β 受容体はGタンパク質共役型の受容体であることから、その下流のシグナルを調べるとAC8が重要であることが示された。生きた動物での解析、すなわちより生理的条件下においても、NAが前帯状回の神経興奮を促進させること、 β 受容体作動薬でも神経が興奮すること、さらに、NAを含有する青斑核を頻回電気刺激すると前帯状回の神経が活性化される結果から、覚醒度や睡眠に関わるNAが慢性疼痛や負の情動に重要な前帯状回において影響を及ぼす可能性が考えられる。

残された課題；本研究では、前帯状回におけるNAのシナプスレベルでの役割は明らかとなったが、前帯状回のNAが慢性疼痛や睡眠障害にどのように関与するかは不明である。

今後の課題；残された課題を明らかにするために、青斑核から前帯状回に投射している線維に対して光遺伝学を用いて選択的に活性化する。そして、青斑核—前帯状回を選択的な活性化がどのような睡眠や慢性疼痛の行動を示すかについて調べる予定である。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、慢性疼痛に起因する睡眠障害の仕組みを明らかにするために、そのシナプス機構について睡眠や覚醒に関わるモノアミンの1つであるノルアドレナリンと慢性疼痛や負の情動形成に関わる前帯状回に着目して調べた。今回、NAが前帯状回の興奮性シナプスを調節していることが明らかとなった。また、このNAによる興奮性シナプス伝達の促進にはβ受容体さらに下流のAC8がターゲットとなることが示された。

今回同定したこれらの分子機構に着目し、さらに、今後の課題である行動薬理学や光遺伝学を用いて慢性疼痛による睡眠異常の仕組みが明らかになれば、NA受容体やシグナル伝達の拮抗薬を用いて慢性疼痛や睡眠障害の改善を試みる基盤となることが考えられる。本研究を基に明らかとなったシグナル伝達を制御して睡眠異常が改善される場合は、慢性疼痛による睡眠障害を制御する新たな鎮痛薬や治療法を開発する手がかりとなり、日常生活における生活の質(Quality of Life)の改善につながる。さらに、これまで未解明である慢性疼痛による睡眠障害と負の情動の相互関係の解明にも発展でき、疼痛学研究に新たな概念がもたらされると期待できる。

参考文献

1. Koga K et. al., J Neurosci. 2015 Feb 4;35(5):2033-43. Impaired presynaptic long-term potentiation in the anterior cingulate cortex of Fmrl knock-out mice.
2. Koga K et. al., Neuron. 2015 May 20;86(4):1109. Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain.
3. Koga K et. al., J Neurosci. 2017 Apr 5;37(14):3887-3895. SCRAPER Selectively Contributes to Spontaneous Release and Presynaptic Long-Term Potentiation in the Anterior Cingulate Cortex.
4. Sara SJ. Nat Rev Neurosci. 2009 Mar;10(3):211-23. The locus coeruleus and noradrenergic modulation of cognition.
5. Choi S et. al., J Physiol Sci. 2017 May;67(3):431-438.

図5 青斑核の電気刺激は前帯状回の神経応答を亢進する。

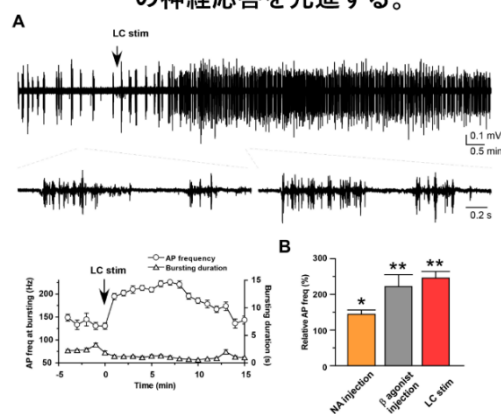
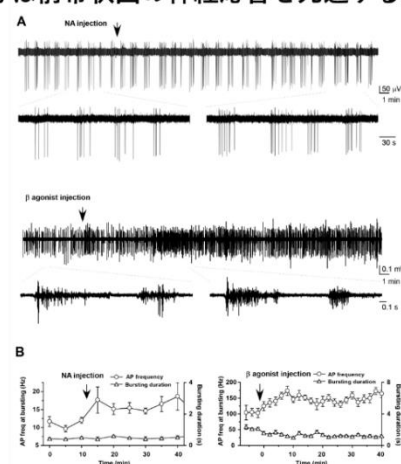


図6 NAとβ受容体作動薬の前帯状回局所投与は前帯状回の神経応答を亢進する。



Noradrenergic inhibition of spinal hyperexcitation elicited by cutaneous cold stimuli in rats with oxaliplatin-induced allodynia: electrophysiological and behavioral assessments.