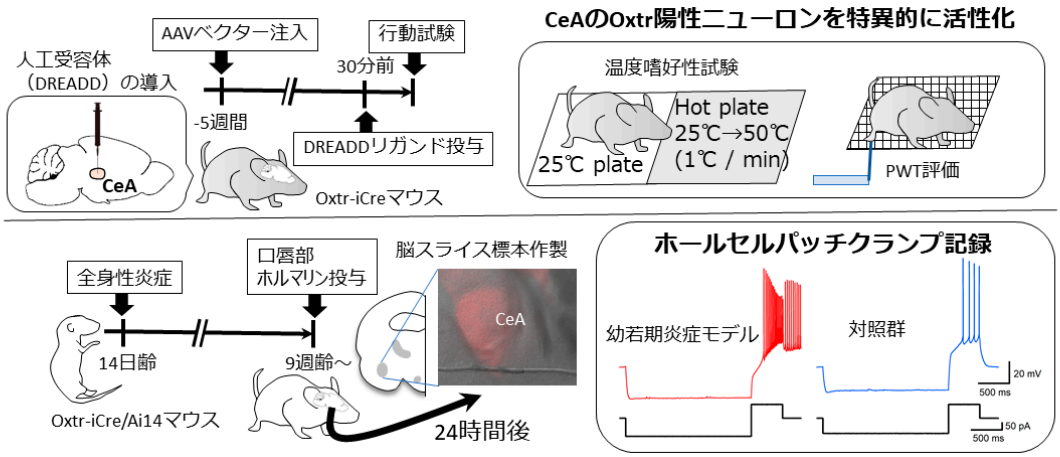
146　幼若期ストレスによる慢性痛プライミング機構の解明	杉村　弥恵

【目的】慢性痛は患者に苦痛を与え、日常生活や就労の障害、有効性の低い治療法への医療費支出など大きな社会的損失を生むが、広く奏功する治療法は確立していない。近年、慢性痛の発症と難治化の過程・機構に幼少期の疼痛体験や虐待経験などの精神的・身体的ストレスが影響を及ぼすことが疫学研究で示されてきた。基礎研究でも幼若期に炎症などのストレスを与えた動物で、成熟期の侵害受容閾値低下や疼痛行動の変容が報告されているが、その機構の解明は十分に進んでいない。本研究では、脳内痛みネットワークを構成する核のひとつである扁桃体中心核（CeA）において、鎮痛作用を有するオキシトシンの受容体（Oxtr）が豊富に発現していることに着目し、幼若期の炎症ストレスが CeA におけるオキシトシンシグナル系の可塑的変化を引き起こし、中枢性疼痛制御回路のプライミングを起こすという仮説を検証することを目的とした。

【方法】1. 人工受容体 DREADD（designer receptors exclusively activated by a designer drug）をコードするアデノ随伴ウイルス（AAV）ベクター（AAV5_hSyn-DIO- hM3D（Gq）-mCherry）を、Oxtr プロモーター制御下に iCre リコンビナーゼが発現するマウス（Oxtr-iCre マウス）の CeA に微量注入した。対照群には AAV5_hSyn-DIO-mCherry を注入した。5 週間後に DREADD リガンドを投与して、CeA の Oxtr 陽性ニューロンを特異的に活性化し、温度嗜好性と後肢足底の paw withdrawal threshold（PWT）を測定した。2. Oxtr-iCre マウスと Ai14 マウスを交配して得られた仔（Oxtr-iCre/Ai14 マウス）に対し、生後 14 日目に全身性炎症を誘発するリポ多糖（LPS）（または対照群として生理食塩水）を投与し、成熟期に広汎性痛覚過敏を誘発する口唇部ホルマリン（または対照群として生理食塩水）投与を行った。口唇部投与から 24 時間後に急性脳スライス標本を作製し、CeA の Oxtr 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ法によって膜電位を記録し、発火パターンなどの電気生理学的特性を解析した。

【結果】1. CeA の Oxtr 陽性ニューロンを活性化すると PWT は変化しなかったが、高温での嗜好性に変化が認められた。2. 幼若期に炎症を起こしたマウスの CeA における Oxtr 陽性ニューロンでは持続発火が多くみられる傾向があった。炎症の有無にかかわらず、CeA の Oxtr 陽性ニューロンには遅延発火型ニューロンが多かった。本研究の結果から、1）CeA の Oxtr 陽性ニューロンの温度嗜好性への関与、2）幼若期炎症ストレスによる Oxtr 陽性ニューロンの発火特性の変化が明らかになった。

CeA の Oxtr 陽性ニューロンの侵害受容における機能と幼若期炎症ストレスによる可塑的変化の検証



146. 幼若期ストレスによる慢性痛プライミング機構の解明

杉村　弥恵

東京慈恵会医科大学 神経科学研究部

Key words：幼若期ストレス，慢性痛，扁桃体中心核，オキシトシン受容体，電気生理学

緒　言

慢性痛は「3 カ月以上持続または再発する痛みの訴え」（WHO 国際疾病分類）であり、先進諸国で約 20%の成人が何らかの慢性痛を訴えている。主訴である苦痛に加え、日常生活や就労の障害、有効性の低い治療法への医療費支出など大きな社会的損失を生むが、広く奏功する治療法は確立していない。その背景として、慢性痛の発症と難治化の過程・機構に大きな個人差があることが示されており、中でも、幼少期の疼痛体験や虐待経験などの精神的・身体的ストレスが、成人の慢性痛の発症に影響を及ぼすことが疫学研究や基礎研究で示されてきた。幼若期に炎症などのストレスを与えた動物で、成熟期の侵害受容閾値低下や疼痛行動の変容が報告されているが、その機構の解明は十分に進んでいない［1］。

本研究では以下の理由から、扁桃体中心核（CeA）のオキシトシン受容体（Oxtr）陽性ニューロンが幼若期ストレスによる慢性痛プライミング機構に関与している可能性に着目した。1）CeA は腕傍核を介して脊髄後角から侵害受容情報の入力を受ける一方、下行性疼痛制御系の起始核である中脳水道周囲灰白質に出力しており、末梢と脳内痛みネットワークを結ぶ中枢性疼痛制御の「ハブ」として機能する可能性がある、2）炎症性疼痛モデルにおいて、腕傍核から CeA へのシナプス伝達が増強する［2］、3）CeA 内の多様な細胞集団が、それぞれ侵害受容閾値を制御する［3］、4）オキシトシンには鎮痛作用があり［4］、慢性腰痛患者の扁桃体を含む脳活動に影響を及ぼす［5］。以上から、幼若期の炎症などのストレスが CeA におけるオキシトシンシグナル系の可塑的変化を引き起こし、中枢性疼痛制御回路のプライミングを起こすという仮説が想定される。この仮説を検証するため、1）侵害受容閾値と疼痛行動における CeA の Oxtr 陽性ニューロンの役割、2）幼若期炎症ストレスモデルマウスにおける CeA の Oxtr 陽性ニューロンの電気生理学的特性、について検討した。

方　法

1.　化学遺伝学的手法を用いた扁桃体中心核におけるオキシトシン受容体陽性ニューロンの機能評価

Oxtr プロモーター制御下に特異的に iCre リコンビナーゼが発現するマウス（Oxtr-iCre マウス）を用いて、Cre 依存的に CeA に DREADD（designer receptors exclusively activated by a designer drug）を導入し、Oxtr 陽性 CeA ニューロンの侵害受容における機能を評価した。14～15 週齢の雄性 Oxtr-iCre マウスの右 CeA に AAV5_hSyn-DIO-hM3D（Gq）-mCherry または対照群として AAV5_hSyn-DIO-mCherry（Addgene）を微量注入した（200 nl）。AAV ベクターには Fluosphere（0.04 μm、505/515 Thermo Fisher Scientific Life Sciences）を混ぜ（20：1）、行動実験終了後にマウスを経心灌流固定して脳切片（50 μm）を作製し、蛍光顕微鏡下で注入部位の中心と蛍光蛋白の発現領域を評価した。CeA 以外に広範囲に発現がみられた個体、CeA に発現がみられなかった個体については結果から除外した。脳内局所微量注入から 5 週間後に下記の 2 つの行動試験を行った。

1）温度嗜好性試験

2 種類の温度可変プレート上を自由にマウスが移動できる温度嗜好性測定装置（Bioseb）を用いた。25℃から 50℃まで温度が上昇する（1℃/min）プレート（Plate 1）と 25℃のプレート（Plate 2）をマウスが行き来する様子を 25 分

間ビデオ撮影し、各プレートの滞在時間と移動回数を解析した。1 回目の試験を行った翌日、DREADD リガンドである Deschloroclozapine（DCZ）を腹腔内投与し（100 μg/kg BW、0.01 ml/g BW）、30 分後に試験を行った。

2）von Frey test

メッシュプレート上にマウスをおき、30 分間環境に馴化させた後、von Frey filament を用いて Yalcin らの方法 [6] に従って、足底の paw withdrawal threshold（PWT）の測定を行った。1、2 日目は生理食塩水を腹腔内投与（0.01 ml/g BW）した 30 分後に PWT を測定し、2 回の試験結果の平均値をベースラインとした。3 日目は DCZ を腹腔内投与し（100 μg/kg BW、0.01 ml/g BW）、30 分後に PWT を測定した。

2. 幼若期ストレスモデルの扁桃体中心核におけるオキシトシン受容体陽性ニューロンの電気生理学的特性の評価

Oxtr-iCre マウスと Ai14 マウスを交配して得られた仔（Oxtr-iCre/Ai14 マウス）に生後 14 日目にリポ多糖を腹腔内投与し（LPS、Sigma、0.1 mg/kg BW、0.01 ml/g BW）、幼若期炎症モデルを作製した。対照群は生理食塩水（0.01 ml/g BW）を投与した。成熟期（9 週齢以降）に、右または左口唇部に 5% formalin 溶液または生理食塩水（20 μl）を投与し、幼若期 LPS・成熟期 formalin 投与（LPS＋Formalin）群、幼若期 LPS・成熟期 saline 投与（LPS＋Saline）群、幼若期 saline・成熟期 formalin 投与（Saline＋Formalin）群、幼若期 saline・成熟期 saline 投与（Saline＋Saline）群の 4 群を作製した。口唇部投与から 24 時間後に CeA を含む急性脳スライス標本（300 μm）を作製した。顕微鏡下で CeA の中でも特に腕傍核から密な投射を受ける外包亜核の Oxtr 陽性ニューロンを同定し、ホールセルパッチクランプ記録法を用いて膜電流または膜電位を記録した。膜電流固定下では−80 mV より深く過分極するように電流を注入した後、10 pA ずつ段階的に脱分極パルス（duration、500 ms）を与えて、活動電位を記録した。

結果および考察

1. 扁桃体中心核におけるオキシトシン受容体陽性ニューロンの活性化が温度嗜好性に及ぼす影響

1 日目の温度嗜好性試験においては hM3D 群と対照群の preference ratio（各時点前後 300 s の Plate1 にいた率）に有意な差は認められなかったが、2 日目の DCZ 投与後においては 16〜17 分（41.6〜42.4℃）の時点で有意に hM3D 群の preference ratio が上昇した（$P<0.05$、hM3D 群 n＝5、対照群 n＝6；unpaired t-test；図 1A）。一方、transition（120 秒あたりのプレート間移動回数）に有意な差は認められなかった（$F_{(12, 108)}=1.39$、$p=0.18$、hM3D 群 n＝5、対照群 n＝6；two-way ANOVA；図 1B）。CeA には熱刺激に応答する侵害受容ニューロンが存在することが報告されており［7］、Oxtr 陽性ニューロンを活性化することによって、熱刺激に対する行動に変化が生じる可能性が示唆される。

2. 扁桃体中心核におけるオキシトシン受容体陽性ニューロンの活性化が PWT に及ぼす影響

hM3D 群、対照群ともに、ベースラインと比較して DCZ 投与 30 分後の PWT に有意な差は認められなかった（hM3D 群、Baseline 1.37±0.32 g、DCZ 1.40±0.31 g、P＝0.96、n＝3、対照群、Baseline 1.88±0.36 g、DCZ 1.33±0.17 g、P＝0.30、n＝3；paired t-test；図 1C）。CeA は異なる分子マーカーを発現する細胞集団から構成されており、主に外側亜核と外包亜核に局在する protein kinase C-delta（PKC δ）陽性ニューロンの活性化は機械性閾値の低下に、より内側の外側亜核に局在する somatostatin 陽性ニューロンの活性化は機械性閾値の上昇に働くことが報告されている［3］。PKC δ 陽性ニューロンの大半は Oxtr 陽性ニューロンと共局在するが［8］、その一方で Oxtr 陽性ニューロンは CeA の主要な出力核である内側亜核まで含め、広く分布しており、機械性閾値の低下に働く PKC δ 陽性ニューロン以外に、侵害受容において異なる機能を有するニューロンを同時に活性化していると考えられ、結果として明瞭な閾値の変化が生じなかった可能性がある。また、何も炎症や損傷がない状態では Oxtr 陽性ニューロンの活動が PWT に影響しないが、痛覚過敏を呈する炎症モデル動物では Oxtr 陽性ニューロンの活動操作が何らかの影響を及ぼす可能性もあり、今後検証を進める予定である。

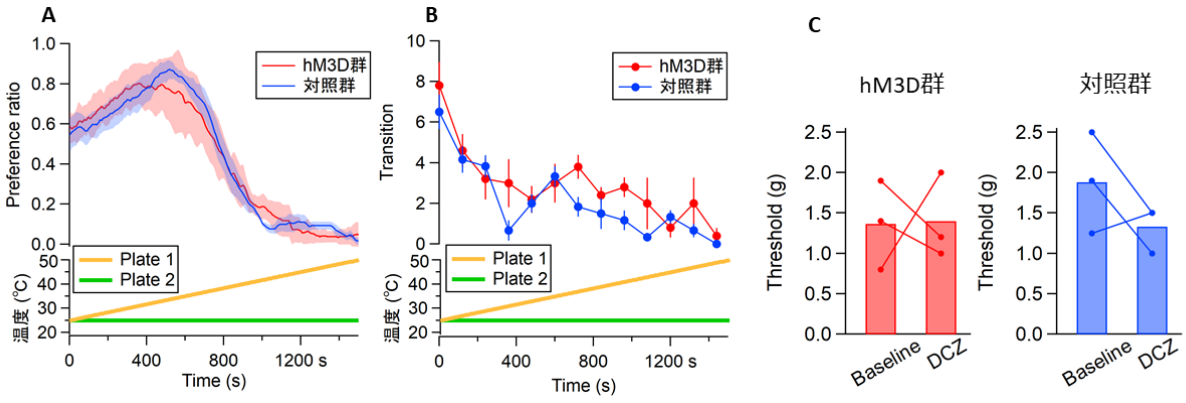


図 1. Oxtr 陽性 CeA ニューロンの活性化が温度嗜好性と PWT に及ぼす影響

A) 上段は DCZ 投与 30 分後の preference ratio、下段は各 plate の温度変化のプロット。hM3D 群は対照群と比較して、16～17 分（41.6～42.4℃）の時点で有意に preference ratio が上昇した（mean±SE、P＜0.05、hM3D 群 n＝5、対照群 n＝6；unpaired t-test）。

B) 上段は DCZ 投与 30 分後の plate 間移動回数、下段は各 plate の温度変化のプロット。hM3D 群と対照群の間に有意な差は認められなかった（mean±SE、$F_{(12, 108)}$ ＝1.39、P＝0.18、hM3D 群 n＝5、対照群 n＝6；two-way ANOVA）。

C) ベースライン（Baseline）と DCZ 投与 30 分後（DCZ）の PWT。hM3D 群、対照群ともに baseline と DCZ の間に有意な差は認められなかった（hM3D 群 P＝0.96、n＝3；対照群、P＝0.30、n＝3；paired t-test）。

3. 幼若期ストレスおよび広汎性痛覚過敏モデルにおけるオキシトシン受容体陽性ニューロンの電気生理学的特性

処置に関わらず、いずれの群においても Oxtr 陽性ニューロンは脱分極パルスを与えた際の 1 発目の活動電位発生までの潜時が長い、遅延発火型を示すニューロンが多かった（図 2C）。また、段階的脱分極パルスに応じて増加する発火数は各群間で有意に異ならなかったが（$F_{(60, 480)}$ ＝0.69、p＝0.96；two-way ANOVA；図 2D）、LPS＋Formalin 群では脱分極パルスが終わった後も発火が続く bursting が認められることが多い傾向があった（図 2E）。報告者が所属する研究室では口唇部炎症を誘発し、さらに 3～8 週間後に足底に炎症を誘発したマウスにおいても同様に、CeA において bursting を示すニューロンが増加する傾向を見出している（未発表データ）。Bursting を示すニューロンには afterdepolarization が伴うことが多く、幼若期の炎症体験によって Oxtr 陽性ニューロンのイオンチャネル発現に変化が生じる可能性が示唆される。我々は予備実験において、対照群と比較して、幼若期 LPS 投与マウスでは成熟期に口唇部炎症発症後の足底の広汎性痛覚過敏が改善しにくい傾向を見出しており、このような痛覚過敏の維持機構に CeA の Oxtr 陽性ニューロンの興奮性変化が関与している可能性がある。今後は bursting などの特定の興奮性に着目して、その発生頻度増加の機構を検討するとともに、腕傍核－CeA シナプス伝達の記録を進める予定である。

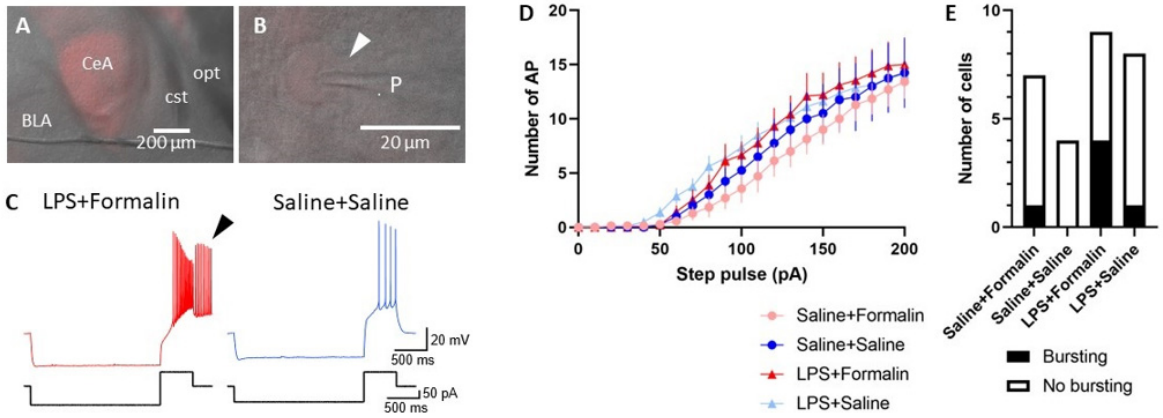


図 2. Oxtr 陽性ニューロンの電気生理学的特性

A) Oxtr-iCre/Ai14 マウスの CeA を含む急性脳スライス標本の代表的な画像。赤色蛍光蛋白を発現している Oxtr 陽性ニューロンが特に CeA に発現している（スケールバー：200 μm）。cst：commissural stria terminalis、BLA：basolateral amygdaloid nucleus、opt：optic tract。

B) Oxtr 陽性ニューロンからホールセルパッチクランプ記録を行っているときの代表的な画像。P は記録電極を、矢頭は電極が赤色蛍光蛋白を発現している Oxtr 陽性ニューロンに接していることを示す（スケールバー：20 μm）。

C) 膜電流固定記録の代表例。過分極電流注入後の状態から、脱分極パルスを与えると、1 発目の活動電位の発生が遅い、遅延発火型の活動電位発生パターンが観察される。LPS＋Formalin 群では脱分極パルス後に過分極電流注入前の膜電流に戻したのちも発火が続いている（矢頭）。

D) 段階的脱分極パルスと、それによって誘発される活動電位数のプロット。各群間で有意な差は認められなかった（mean±SE、$F_{(60, 480)}$ =0.69、p=0.96；two-way ANOVA）。

E) 脱分極パルスの終了後に持続的連続発火を示すニューロン（"Bursting"）と、示さないニューロン（"No bursting"）の数。Saline＋Saline 群では 1 例も認められなかったが、LPS＋Formalin 群では記録ニューロンの約半数が持続的連続発火を示した。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東京慈恵会医科大学の加藤総夫教授およびその教室員の方々である。また Oxtr-iCre マウスは国立精神神経医療研究センターの井上由紀子先生に提供していただいた。感謝いたします。

文　献

1) Williams MD, Lascelles BDX. Early Neonatal Pain—A Review of Clinical and Experimental Implications on Painful Conditions Later in Life. Front Pediatr. 2020;8(February). PMID: 32117835 PMCID: DOI: 10.3389/fped.2020.00030

2) Sugimura YK, Takahashi Y, Watabe AM, Kato F. Synaptic and network consequences of monosynaptic nociceptive inputs of parabrachial nucleus origin in the central amygdala. J Neurophysiol. 2016 Jun 1;115(6):2721-39. PMID: 26888105 DOI: 10.1152/jn.00946.2015

3) Wilson TD, Valdivia S, Khan A, Ahn H-S, Adke AP, Gonzalez SM, et al. Dual and Opposing Functions of the Central Amygdala in the Modulation of Pain. Cell Rep. 2019;29(2). PMID: 31597095 DOI: 10.1016/j.celrep.2019.09.011

4) Paloyelis Y, Krahé C, Maltezos S, Williams SC, Howard MA, Fotopoulou A. The Analgesic Effect of Oxytocin in Humans: A Double-Blind, Placebo-Controlled Cross-Over Study Using Laser-Evoked Potentials. J Neuroendocrinol. 2016;28(4). PMID: 26660859 DOI: 10.1111/jne.12347
5) Schneider I, Schmitgen MM, Boll S, Roth C, Nees F, Usai K, et al. Oxytocin modulates intrinsic neural activity in patients with chronic low back pain. Eur J Pain (United Kingdom). 2020;24(5):945–55. PMID: 32061140 DOI: 10.1002/ejp.1543
6) Yalcin I, Megat S, Barthas F, Waltisperger E, Kremer M, Salvat E, et al. The sciatic nerve cuffing model of neuropathic pain in mice. J Vis Exp. 2014;(89). PMID: 25078668 DOI: 10.3791/51608
7) Neugebauer V, Weidong L. Processing of nociceptive mechanical and thermal information in central amygdala neurons with knee-joint input. J Neurophysiol. 2002;87(1):103–12. PMID: 11784733 DOI: 10.1152/jn.00264.2001
8) Haubensak W, Kunwar PS, Cai H, Ciocchi S, Wall NR, Ponnusamy R, et al. Genetic dissection of an amygdala microcircuit that gates conditioned fear. Nature. 2010 Nov 11;468(7321):270-6. PMID: 21068836 DOI: 10.1038/nature09553