

氏 名 石川 達也

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1644 号

学位授与の日付 平成25年9月27日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Synaptic remodeling in somatosensory cortex ipsilateral to
injured periphery in chronic pain model mouse

論文審査委員 主 査 教授 吉村 由美子
教授 鍋倉 淳一
教授 池中 一裕
教授 小泉 修一 山梨大学

論文内容の要旨
Summary of thesis contents

Background

Chronic pain syndrome is a clinical condition in which an individual endures pain that persists over several months that cannot be relieved with common painkillers. Functional magnetic resonance imaging (fMRI) indicates that plastic changes in the brain likely contribute to chronic pain syndrome. In addition to the functional changes of neuronal circuits in the spinal cord and anterior cingulate cortex which are known to contribute to chronic pain syndrome, recent evidences indicate the primary somatosensory cortex (S1), which receives pain sensation originated from the contralateral periphery, contributes to chronic pain. To develop successful treatment strategies for chronic pain, it is important to improve the understanding of S1 contributions to chronic pain at the circuit level. Among the symptoms of chronic pain syndrome, patients with peripheral nerve injury can suffer from a mirror-image pain that persists at uninjured sites contralateral to the peripheral nerve injury. In these patients, the neuronal processing of pain sensation originated from the intact periphery should also be affected.

Functional MRI signals could occasionally be increased in the S1 bilaterally in patients of chronic pain. Because fMRI measures hemodynamic responses within the brain and an increased activity of astrocytes induces the vasodilation of penetrating arterioles, astrocyte activity might also increase in the ipsilateral S1 (ipsi-S1) receiving peripheral sensation from uninjured periphery. Together with well accepted evidences that astrocytes contribute to synapse remodeling, I suspect the activation of astrocytes and synapse remodelings in the ipsi-S1 could play an important role in inducing pain at the periphery contralateral to the injury.

Methods

Partial sciatic nerve ligation (PSL), behavior test, and long-term drug application

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

Under the anesthesia with isoflurane, or ketamine and xylazine, the right sciatic nerve of male C57BL/6 mice was exposed and the nerve was lightly ligated with 9-0 suture (PSL mice). These mice were calibrated in pain behavior by von Frey hairs.

After craniotomy, the long-term drug application was conducted by implanting Elvax (non-inflammatory drug delivery system, EV40W, DuPont-Mitsui Polychemicals).

in vivo imaging

For imaging of spine motility and spine turnover, the craniotomy (2-3mm in diameter) was performed on right S1. Spine imagings were performed under two-photon microscopy. Metamorph (Molecular Devices) and Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) were used to analyze the characteristics of individual spines. Spine length was measured from the dendritic shaft to tip of spines and the motility was calculated as average absolute Δ length per 30 minutes. Long term (2 days) spine turnover rate was calculated by counting the number of generated and eliminated spines.

To obtain Ca^{2+} imaging in the astrocytes and neurons, multicell bolus loading was performed to load layer 1 inhibitory neurons and astrocytes with Oregon Green BAPTA1-AM and sulforhodamine 101 to identify the astrocytes. I quantified fluorescent signals of *in vivo* two-photon Ca^{2+} imaging in layer 1 inhibitory neurons and astrocytes.

Results and discussion

I observed the number of spontaneous astrocytic Ca^{2+} surges during a 10 min interval was significantly increased in the ipsi-S1 following PSL, compared with non-PSL mice. These activities were decreased by applying TTX to the contra-S1, or MPEP, an antagonist of metabotropic glutamate receptor type V, to the ipsi-S1. These results suggest that PSL increased the activity of astrocytes in the ipsi-S1 and these activations are mediated by the activation of callosal projection and mGluR5 receptor. Callosal inputs originating from contralateral layer 5 pyramidal neurons project to layer 1 inhibitory neurons and then inhibit layer 5 pyramidal neurons. Hence, to determine whether inhibitory neurons in the ipsi-S1 indeed increase their activity in

(別紙様式 2)
(Separate Form 2)

PSL mice, I examined the Ca^{2+} transients of layer 1 inhibitory neurons in ipsi-S1. The increased Ca^{2+} transients of layer 1 inhibitory neurons were observed at the ipsi-S1. However, the spine motility of pyramidal neurons remained unchanged, and the threshold for mechanical stimuli applied to the intact hind paw contralateral to peripheral injury was unaffected. These data suggest that an increased activity in layer 1 inhibitory neurons in the ipsi-S1 following PSL likely inhibits layer 5 pyramidal neurons.

Interestingly, chronic application of the SR95531, a GABAA receptor antagonist, to the ipsi-S1 of PSL mice increased the turnover rate and motility of dendritic spines in the ipsi-S1, and decreased the threshold to mechanical stimuli in the intact hind paw contralateral to the PSL. These results suggest that the synergic activation of astrocytes and excitatory circuits (or the neuronal activity of pyramidal neuron itself) facilitated synapse destabilization and spine remodeling in layer 5 pyramidal neurons. Change of neuronal circuits in ipsi-S1 likely induced a mirror-image pain in the intact hind paw contralateral to the PSL.

Conclusion

Neural circuit remodeling is an underlying mechanism for long-term changes in brain functions. Synaptic changes in the ipsi-S1 induced additional impairment; thus, an impairment of excitation-inhibition balance in the ipsi-S1 could be an underlying mechanism for mirror-image pain. These findings may offer a new treatment strategy for chronic pain symptoms, particularly mirror image allodynia.

博士論文の審査結果の要旨

Summary of the results of the doctoral thesis screening

慢性疼痛は数カ月を超えて持続する痛みであり、通常の鎮痛剤があまり効果的でないため、治療法開発にあたりその発症メカニズムの解明が強く望まれている。末梢の体性感覚情報は、感覚を受けた部位と反対側の大脳皮質一次体性感覚野（S1）に伝えられる。慢性疼痛の中でも神経障害性疼痛においては、その発症には中枢神経の変化が関与すると考えられており、例えば、障害を受けた末梢部位と対側の S1 の神経回路が再編され、障害部位への機械刺激に対する対側 S1 ニューロンの応答が過剰になることが報告されている。臨床的には、通常は触覚・圧感覚として知覚される程度の触刺激や機械刺激を、神経障害後には疼痛と感ずる症状（アロディニア）も見られる。アロディニアの中には、障害を受けた側と対側の部位に痛みを感じる症状（ミラーイメージペイン）が発生する場合がある。アロディニアを示すヒトやモデル動物において、障害を受けた部位と反対側にある、障害を受けていない部位への機械刺激に対しても、障害部位と同側にある S1 領域の活動が亢進することが fMRI を用いた研究により見出されている。従って、ミラーイメージペインにおいても S1 の神経回路再編が関与していると予想されるが、その回路メカニズムについてはほとんどわかっていない。

石川達也氏は、ミラーイメージペインに伴う S1 神経回路の再編メカニズムを明らかにすることを目的に、一方の後肢の坐骨神経を結紮することにより慢性疼痛を発症したモデルマウスに 2 光子励起顕微鏡を用いた生体カルシウムイメージング法やスパイン形態の長期観察と痛覚評価テストを適用して解析を行った。片方の後肢の坐骨神経を結紮すると、結紮側と同側の S1 のアストロサイトの自発活動が上昇しており、この上昇は 1 ヶ月以上持続することを見出した。このアストロサイトの活動上昇は、障害を受けた坐骨神経からの情報を処理する対側 S1 の神経活動を薬理的に遮断、あるいは同側の S1 の代謝型グルタミン酸受容体（mGluR5）を遮断すると観察されなかったことから、障害部位からの入力を受けた対側 S1 ニューロンが脳梁を介して同側 S1 に投射し、同側 S1 のアストロサイトにある mGluR5 を活性化することによりアストロサイトの興奮性が上昇すると考えられる。次にアストロサイトの活動上昇により神経回路のリモデリングが起こるかを調べるために、大脳皮質 5 層の少数の錐体細胞に緑色蛍光蛋白が発現しているマウスを用いて、結紮側と同側の S1 における 5 層ニューロンのスパインの motility と turnover を調べたところ、結紮をしていないコントロールマウスと有意な差異は認められなかった。これまでに、スパインの変化にはアストロサイトとニューロンの両方の活動が関与することが報告されているので、結紮側と同側の S1 に GABA 受容体の阻害剤を投与し、ニューロン活動を上昇させると、スパインの motility と turnover rate が、結紮せずに GABA 受容体阻害剤を投与したコントロールと比べて有意に上昇することを見出した。このマウスを用いて痛覚テストを実施したところ、障害部位と反対側の後肢への機械刺激に対する閾値が下がっており、この低下は同側 S1 のアストロサイトの活動を薬理的に阻害するとみられなかった。以上の結果から、興奮性神経細胞とアストロサイト両方の活動上昇が S1 のシナプス再編を惹起することにより、末梢神経損傷を受けた後肢と反対側の健常後肢においても慢性疼痛様行動が誘発されることが示唆された。

(Separate Form 3)

以上の博士研究は、ミラーイメージペイン発症の神経回路メカニズムの解明に大きく貢献するものであり、研究内容の質も高く、学位論文として十分な内容を有していると判断された。