

論文内容要旨

Enhanced anxiety-like behavior induced by
chronic neuropathic pain and
related parvalbumin-positive neurons in male rats
(雄ラットの慢性神経因性疼痛によって引き起こされ
る不安様行動と関連するパルブアルブミン陽性神経)

Behavioural Brain Research, 459:114786, 2024

主指導教員：浦川 将 教授

(医系科学研究科 運動器機能医科学)

副指導教員：池上 浩司 教授

(医系科学研究科 解剖学及び発生生物学)

副指導教員：高橋 真 教授

(医系科学研究科 生体運動・動作解析学)

NGUYEN DANG THU

(医系科学研究科総合健康科学専攻)

[Introduction]

Chronic pain is one of the global issues, exerting an enormous personal and economic burden. Given its diverse and multifaceted effects, emotional disorders, including anxiety, are common and exacerbate pain conditions. This combination impedes treatment and profoundly affects the quality of life. During the development of chronic pain, various plastic structures in the brain are involved as neurological mechanisms. These include not only cortical regions that function to directly detect and prevent tissue damage from harmful stimuli but also the limbic system, which generates emotional behaviors essential for the experiential aspects. Imbalances in the inhibitory neuronal network have been suggested to contribute to the development, amplification, and perpetuation of the emotional-affective dimensions associated with chronic pain. Effective treatments require a comprehensive understanding of the interactions between pain progression and anxiety disorders and the underlying mechanisms in the central nervous system. However, these underlying mechanisms remain unclear. Therefore, we conducted this study to investigate the time-dependent effect of neuropathic pain on the development of anxiety-like behaviors and whether this interaction is associated with parvalbumin (PV)-positive neurons and cholecystokinin (CCK)-positive neurons, which are the largest subtypes of interneurons within the corticolimbic regions.

[Methods]

Partial sciatic nerve ligation (pSNL) was used in a neuropathic pain model that can present pain symptoms and mimic clinical neuropathic pain symptoms, including mechanical allodynia, heat-evoked hyperalgesia, and spontaneous pain. Eight-week-old male Wistar rats were divided into two groups: the pSNL group, in which one-third to half of the left sciatic nerve at the upper-thigh level was tightly ligated, and the sham group, in which the nerve was exposed but not ligated. Nociceptive behavior was evaluated using the von Frey test before and weekly after surgery. The elevated plus maze (EPM) and open field (OF) tests were conducted biweekly after surgery to assess anxiety-like behaviors. At 2 or 8 weeks after surgery, immediately after completing the behavioral tests, the rats were humanely killed, and their brains were harvested to analyze c-Fos-, PV-, and CCK-positive neurons using the immunohistochemistry method.

[Results]

Rats in the pSNL group reduced the mechanical withdrawal threshold in the surgical hind paw soon after surgery and enduring the experimental period presenting a chronic neuropathic pain condition.

From 4 weeks post-surgery, pSNL rats exhibited reduced OF center time, rearing, and initial activity, along with diminished EPM open-arm activities (time spent, head dips, movement,

and rearing), indicating anxiety disorder behaviors which correlated with the paw withdrawal threshold. These effects were absent at 2 weeks post-surgery. At 8 weeks post-surgery, specific behaviors (decreased total rearing and increased inactive time in EPM) were observed in the pSNL group. Using c-Fos as an indicator of neuronal activity, we found that some subregions of the amygdala and hippocampus were activated in response to anxious stimulation. While CCK-positive neuron density increased in the basolateral amygdaloid complex (BLC) of the amygdala in pSNL rats, it was not related to anxiety-like behavior parameters. PV-positive neuron alterations were observed in various regions, including the BLC, cornu ammonis areas 1 and 2 (CA1 and CA2) of the hippocampus, and the primary somatosensory cortex subregions. Interestingly, the decrease in PV-positive neuron density in the BLC and the increase in CA1 and CA2 were correlated with anxiety-like behaviors. Furthermore, PV-positive neurons in the BLC of pSNL rats were predominantly changed in large-cell subtypes and were less activated in response to anxious stimulation.

[Discussion]

Our primary findings reveal that pain induced by pSNL alters the emotionality of rats over time, with anxiety disorders exhibited during the later phase of pain progression but not during the earlier phase. This effect is likely due to the persistent and prolonged pain stimulus inducing significant structural and functional changes in the limbic–cortical circuitry, contributed by distinct alterations in PV-positive neurons in the amygdala and hippocampus subregions. As a result, the imbalance in the activity of PV-positive and projection neurons in emotional brain regions contributes to the promotion of anxiety-like behavior in pSNL rats. The findings also indicate a potential mediating role of specific PV-positive neuron subtypes in the anxiety-like behaviors exhibited in neuropathic pain. Although the exact mechanisms underlying the alterations in PV-positive neurons are not fully understood, some suggested mechanisms relate to inflammation and oxidative stress. Further studies need to be carried out to provide more details regarding the alteration and characteristics of PV-positive neurons during the time course of neuropathic pain. This could help to clarify the mechanisms and suggest targeted treatment of these disorders.

[Conclusion]

These data suggest that anxiety-like behaviors emerge in the late phase of neuropathic pain and relate to PV-positive neurons in corticolimbic regions of pSNL rats.

慢性疼痛は世界的な問題の一つであり、個人的および経済的に多大な負担をもたらす。その多様かつ多面的な影響から、不安を含む情動障害は慢性疼痛共通にみられ痛みの状態を悪化させる要因である。慢性疼痛にみられる情動障害は、治療を妨げ生活の質に重大な影響を及ぼす。慢性痛が深刻化していく神経基盤として、脳内のさまざまな可塑的構造が関与する。これらには、直接的に有害な刺激による組織損傷を検出して防止する機能をもつ大脳皮質領域のみならず、経験的側面に不可欠な情動行動を生成する大脳辺縁系が含まれる。抑制性ニューロンネットワークの不均衡は、慢性疼痛に関連する情動行動の発達や強化、持続性に寄与することが示唆されている。効果的な治療には、痛みの進行と不安障害の間の相互作用、および中枢神経系の根底にある機序を包括的に理解する必要がある。しかし、これらの根本的な機序は未だ不明である。そこで我々は、持続する神経因性疼痛の時間経過に伴う効果と不安様行動の変化、そしてこれらの相互作用が皮質辺縁系の抑制性介在神経であるパルブアルブミン (PV) 陽性ニューロンおよびコレシストキニン (CCK) 陽性ニューロンと関連しているかどうかを検証した。坐骨神経一部結紮モデル (pSNL) は、長期間持続する疼痛症状を示し、機械的異痛症、熱誘発性痛覚過敏、自発痛などの臨床的神経障害性疼痛症状を発症する慢性疼痛モデルとして使用した。8週齢の雄 Wistar ラットを群分けし、pSNL 群；左坐骨神経の3分の1から半分を大腿上部でしっかり結紮、偽処置群；神経を露出させたが結紮せず、の2群に分けた。侵害刺激に対する行動評価は、手術前と術後に毎週フォン・フライテストによって評価し、高架十字迷路 (EPM) テストとオープンフィールド (OF) テストは、手術後の不安様行動を評価するために隔週で実施し行動学的変化を評価した。術後2週間と8週間後の行動学的評価終了後に屠殺し、組織学的検証のために脳を取り出し、c-Fos 抗体、PV 抗体、CCK 抗体による免疫組織化学染色を実施した。

pSNL 群のラットは、手術直後からフォン・フライテストによる術側後肢の機械的引っ込み閾値を減少させ、実験期間中長期にわたって神経障害性の慢性疼痛症状を呈した。手術後4週間以降、pSNL 群のラットは、OF 中心滞在時間、立ち上がり、および初期活動の減少を示し、EPM ではオープンアームでの活動 (滞在時間、頭を下げる、動き、立ち上がり) の減少を示しており、これら不安様行動を示唆する行動パラメーターは、後肢の足引っ込み閾値と相関していた。これら痛みによる不安様行動の影響は、術後2週間ではみられなかった。手術後8週間で、pSNL 群で特定の不安様行動 (総立ち上がりの減少と EPM での不活動時間の増加) が観察された。神経活動の活性指標となる c-Fos 陽性神経を調べたところ、扁桃体亜核と海馬で不安を惹起する環境下で発現上昇することがわかった。CCK 陽性の神経細胞の密度は、扁桃体基底外側核で増加するが、不安様行動のパラメーターとは相関しなかった。PV 陽性の神経細胞密度は、扁桃体基底外側核や海馬 CA1、CA2 領域、一次体性感覚野などで変化することが観察された。興味深いことに、扁桃体基底外側核での PV 陽性細胞密度の減少と海馬 CA1/CA2 領域での PV 陽性細胞密度の増加が、不安様行動のパラメーターと相関することがわかった。扁桃体基底外側核での PV 陽性細胞の不安様行動を誘導する刺激下での変化は、主として神経細胞体の直径が大きなものでもたらされることがわかった。

我々の主要な発見は、pSNLによって引き起こされる痛みが時間の経過とともにラットの情動を変化させ、不安様行動は痛みの進行の後期にもたらされるが、初期では変化のないことを明らかにした。この効果は、持続する痛みによって扁桃体および海馬の特定領域におけるPV陽性ニューロンの変化によって、大脳皮質-辺縁系の神経回路の構造機能的変化が誘導されていると考えられる。今回の結果から、PV陽性神経と投射神経との不均衡がpSNL群の不安様行動を助長することにかかわっていることがわかった。これらの結果から、特定のPV陽性神経が神経障害性疼痛における不安様行動をもたらすことが示唆された。本研究結果は、これらの慢性疼痛関連障害に対する治療対象を示唆し、神経機序の理解の一助となるものである。

結論として、坐骨神経一部結紮による神経障害性疼痛の慢性期に不安様行動が出現し、この症状は皮質辺縁系のPV陽性神経の変化がかかわることが示唆された。