

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08672

研究課題名(和文) 高社会性げっ歯類を用いた痛みの社会的修飾メカニズムの解明

研究課題名(英文) Modulation of nociception by social bonds in monogamous rodents.

研究代表者

由利 和也 (Yuri, Kazunari)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授

研究者番号：10220534

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、一夫一婦制を営む(特定のパートナーと生涯を共にする)げっ歯類がパートナーを失うと、不安行動が増し、機械的刺激や熱刺激に敏感になった。さらに、脳内オキシトシン回路の痛み刺激に対する反応性が低下することも示唆された。これらの結果より、社会心理的ストレスにより不安と痛み関連行動が増悪し、その発症メカニズムに脳内オキシトシン回路の機能変調が関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Partner-loss males of socially monogamous rodents showed increased anxiety-like behaviors in the open field test, low threshold of mechanical stimulus in von Frey tests and thermal stimulus in plantar test as compared to paired males. Furthermore, there was a correlation between anxiety-like behaviors and pain-related behaviors. The pain-related brain regions in partner-loss males showed decreased of Fos immunoreactivity during formalin-induced inflammatory pain as compared to paired ones, especially in the medial prefrontal cortex and nucleus accumbens. In addition, Fos expression in oxytocin neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus also decreased, suggesting that the response of brain oxytocin to the pain stimulus reduced under partner-loss condition.

Together, partner loss elicits anxiety-like behaviors and alters pain-related behaviors and brain oxytocin system may be involved in neural processes underlying the pain modulation by social bonds in monogamous rodents.

研究分野：神経解剖学

キーワード：情動 社会性

1. 研究開始当初の背景

慢性痛症の発症メカニズムの一つに、一次求心性入力部位である脊髄後角での神経系の可塑的变化が考えられている。この脊髄後角における痛みの伝達は、脳幹の下行性疼痛抑制系や内因性オピオイド系といった内因性疼痛抑制系により制御されるが、最近、絆の形成に重要とされている視床下部室傍核から種々の脳領域に神経投射している脳内オキシトシン回路も内因性疼痛抑制系として機能する可能性が示唆されている。線維筋痛症など慢性疼痛患者において内因性疼痛抑制系の機能低下が検出されたことから、この脳内オキシトシン回路を介した内因性疼痛抑制系の変調が慢性痛の発症要因となっている可能性がある。また、慢性痛の患者が家庭や職場での問題を抱えていることが多いことを考え合わせると、心理社会的ストレスが脳内オキシトシン回路の変調を引き起こし、ひいては内因性疼痛抑制系の機能低下から痛みを増悪することが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、雌雄間で非常に強い絆を形成する高社会性げっ歯類：プレーリーハタネズミに心理社会的ストレスを負荷し、痛みや不安の変化、さらには脳・脊髄における痛み伝導路の反応性を解析し、心理社会的ストレスによる痛みの修飾メカニズムを明らかにしていく。特に、プレーリーハタネズミの社会性の発現に重要で、かつ、痛み刺激でも活性化し内因性疼痛抑制系として機能することが注目されている脳内オキシトシン回路にも注目して解析を行う。

3. 研究の方法

本研究の解析はすべて、プレーリーハタネズミの雄について行った。プレーリーハタネズミは一夫一婦制を営む高社会性げっ歯類であることから、絆を形成したパートナーと別離（パートナーロス）させることにより心理社会的ストレスを負荷した。標準飼育ケージ内で7日間同居させることにより雌雄間に絆を形成させ、絆の有無はプリファレンステストにより行動学的に確認した。すなわち、プリファレンステストにて、パートナー雌のみに親和行動を示した雄を絆ありと判定し（絆あり群）それ以外の雄を絆なし（絆なし群）と判定した。その後、パートナーと同居を維持（維持群）もしくは別離（ロス群）させ、各群について、オープンフィールドテスト（フィールド：90×90 cm、午前9-11時に実施）により不安行動を、血中コルチコステロン濃度の測定（午前9-11時に心臓採血、ELISA法にて定量）によりストレス反応を、vonFreyテスト（13時-17時に実施）にて機械的刺激閾値を、プランターテスト（13時-17時に実施）にて熱刺激閾値を解析し、それぞれについてパートナー維持群とロ

ス群について比較を行った。さらに、足底下にホルマリン注射2時間後、各被検動物から4%パラホルムアルデヒド溶液灌流後に脳と脊髄を採取し、クリオスタットで作製した凍結切片上において、神経細胞の活動を cFos 蛋白の抗体で、パゾプレッシン産生細胞およびオキシトシン産生細胞の検出を各々の抗体で免疫組織化学的染色にて検出し、各陽性細胞の数をパートナー維持群とロス群間で比較を行った。また、脳内オキシトシンがパートナーによる痛み行動の変化に関与するのか検証する目的で、パートナーロス期間中に、体内埋め込み型マイクロインフュージョンポンプシステムにより側脳室へオキシトシンもしくはオキシトシン受容体アンタゴニストを投与して痛み行動の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) プリファレンステストでパートナー雌のみに親和行動スコア2.0以上を示したプレーリーハタネズミを絆ありと判定し、パートナー雌と同居を継続した群（維持群）と別離させた群（ロス群）に分け、ロス期間中にオープンフィールドテストを実施した。その結果、フィールド内の総歩行距離には差がなかったが、中央エリア（不安エリア）における歩行距離がロス群において維持群より有意に少なかった（図1）。このことから、パートナーロスに伴い不安が亢進していたことが示唆された。

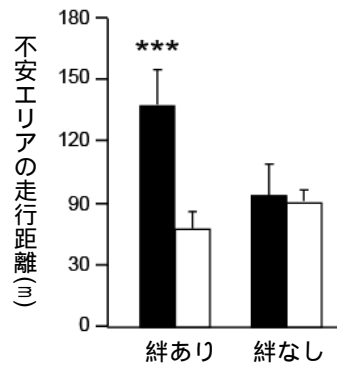


図1 オープンフィールドで不安エリアの歩行距離；黒：維持群 白：ロス群

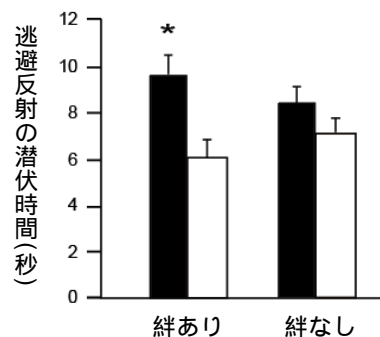


図2 プランターテストにおける逃避反射の潜伏時間 黒：維持群 白：ロス群

さらに、オープンフィールドテストの2日後にvonFreyテストを実施すると、維持群に比べてロス群で機械的刺激閾値が低かった。プランターテストも実施すると、逃避反射までの潜伏時間がロス群の方が維持群より有意に早かった(図2)。

オープンフィールドテストにおける不安行動とプランターテストにおける潜伏時間に相関がみられ、不安行動が多い個体ほどプランターテストにおける潜伏時間が早かった。すなわち、不安レベルが高いほど熱刺激閾値が低かった。さらに、パートナーロス1週間後に心臓採血を行い、血中コルチコステロン濃度をELISA法により測定し、維持群とロス群間で比較した。その結果、維持群に比べてロス群の血中コルチコステロン濃度が高い傾向にあった。

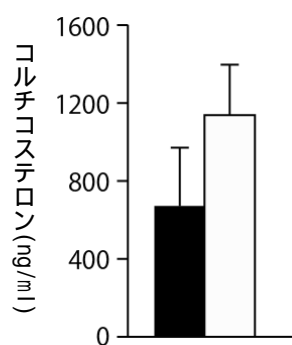


図3 血中コルチコステロン濃度
黒：維持群 白：ロス群

ここまでの結果をまとめると、雌雄間で強い絆を形成するプレーリーハタネズミにおいて、パートナーの消失により機械的刺激値と熱刺激閾値の低下といった痛み関連行動が悪化し、その背景にパートナーを失ったことに対する心理社会的ストレスによる不安レベルの増大があることが示唆された。

(2)(1)で観察された痛みの心理社会的修飾作用の作用メカニズムを探索する目的で、脊髄および疼痛関連脳領域の痛み刺激に対する反応性を、Fos蛋白の発現を指標に解析した。脊髄後角を10層に層分類し、侵害刺激が入力するI-II層(浅層)とV-VI層(深層)において解析を行った。その結果、浅層・深層ともに炎症側で著しいFos発現がみられたものの、炎症側におけるFos発現細胞数に、維持群とロス群間で有意差は検出されなかった。脊髄後角のFos発現量と痛み行動量が比例しないという過去の報告も多数あることから、本研究結果もこれら先行研究の報告と一致すると考える。加えて、脊髄後角におけるFos発現は、脳幹からの下行性疼痛抑制系により活性化する興奮性および抑制性介在ニューロンのFos発現も混在していると思われる。脊髄後角の抑制性介在ニューロンは、その大部分がGABA作動性ニューロンであるとの報告があるので、GABA合成酵素であるグルタミン酸デカルボキシラーゼGAD67の抗体を用いての免疫組織化

学的染色法により抑制性介在ニューロンを検出し、それらニューロンのFos発現を維持群・ロス群間で比較解析を行った。その結果、GAD67陽性ニューロンが検出できたものの、維持群・ロス群間でGAD67/Fos陽性ニューロン数に有意な差は検出されなかった。脊髄後角の介在性ニューロンには、抑制性介在ニューロン以外に、興奮性介在ニューロンも多数存在することが知られている。現在までのところ、興奮性介在ニューロンを特異的に検出する分子マーカーが見つかっておらず、本研究においても脊髄後角での投射ニューロン、興奮性介在ニューロン、抑制性介在ニューロンを染め分けすることができなかった。今後は、これらニューロンのタイプ別におけるFos発現を解析することが必要だと思われる。さらに、疼痛関連脳領域の痛み刺激への反応性も解析した。特に本研究では、前脳領域の疼痛関連領域(前頭前野、前帯状回、側坐核、島)において解析を行った。Fosタンパクの発現を指標に炎症性疼痛誘発時における神経活性度をロス群と維持群で比較した。Fos蛋白は、痛み以外の種々の刺激によってもその発現が誘導され、さらに疼痛関連脳領域とストレス関連脳領域に重複している部分があることから、痛み刺激を入れない状態の疼痛関連脳領域でのFos蛋白の発現をコントロール群として、炎症性疼痛誘発時におけるFos発現をペイン群として、それらの比較解析を行った。その結果、コントロール群では維持群 vs ロス群でFos発現に違いは見られなかったが、ペイン群において維持群に比べてロス群でのFos発現が低かった。特に、前頭前野と側坐核において維持群とロス群間で顕著な発現差が検出された(図4)。

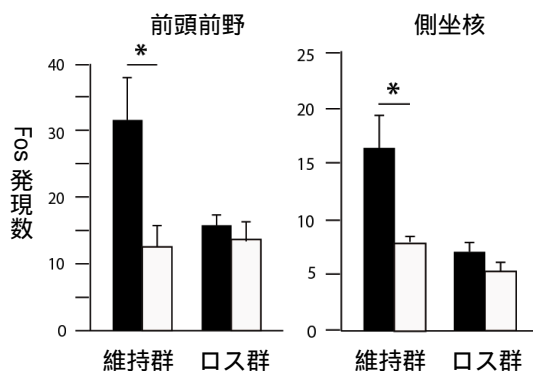


図4 炎症性疼痛時の Fos 発現
黒：ペイン群 白：コントロール群
ロス群の前頭前野と側坐核において活性が著しく低い(*)。

この2つの脳領域には、視床下部神経ペプチド(オキシトシン・バゾプレッシン)ニューロンから豊富な神経投射がみられることから、脳内オキシトシン・バゾプレッシン回路の主要な構成領域である。この回路は絆の形成に重要であることが明らかになっている。加えて、脳内オキシトシンおよびバゾプレッシン

に疼痛抑制機能があることが報告され、新たな内因性疼痛制御系として注目され始めている。したがって、本研究におけるパートナーロスによる痛みの増悪メカニズムに、これら脳内オキシトシン・バゾプレッシン回路の痛み刺激に対する機能変調が関与している可能性が示唆される。

(3)(2)において、パートナー維持群とロス群間で炎症性疼痛惹起時の脳内オキシトシン・バゾプレッシン回路構成領域において Fos 発現に著明な差が検出された。そこで、脳内オキシトシン・バゾプレッシン産生ニューロンの痛み刺激に対する反応性を検証する目的で、オキシトシン産生ニューロンおよびバゾプレッシン産生ニューロンが豊富に存在する視床下部室傍核にて炎症性疼痛時における Fos 発現を解析した。オキシトシンおよびバゾプレッシン抗体と Fos 抗体を用いての免疫組織化学的二重染色法にてオキシトシン抗体陽性 / Fos 抗体陽性細胞、バゾプレッシン抗体陽性 / Fos 抗体陽性細胞を検出し、維持群とロス群それぞれにおいてコントロール群とペイン群の細胞数をカウントして各群で比較解析した。その結果、バゾプレッシン産生ニューロンにおける Fos 発現に維持群 vs ロス群で有意な差は検出されなかった。一方、オキシトシン産生ニューロンにおいては、ロス群において Fos 発現が有意に少なかった。(図5)。これら結果から、パートナーロスによる前頭前野と側坐核における痛み刺激への反応性の低下は、脳内オキシトシン回路の痛み刺激に対する機能変調により引き起こされている可能性がある。

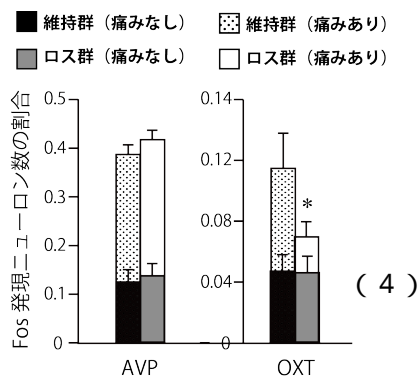


図5 炎症性疼痛時の視床下部の Fos 発現
ロス群のオキシトシン産生ニューロンにおいて Fos 発現が低い(*)。AVP: バゾプレッシン OXT: オキシトシン

(4)(3)で炎症性疼痛時の視床下部オキシトシンニューロンの Fos 発現が低下し、脳内オキシトシンニューロンの痛み刺激に対する反応性の低下が示唆された。そこで、パートナーロスに伴う痛み行動の増悪に脳内オキシトシンが関与しているのか検証する目的で、パートナーロス期間中に、体内埋め込み型マイクロインフュージョンポンプシステムを使

用して、人口脳脊髄液(200nl)、人口脳脊髄液+オキシトシン(1ng/μl)、人口脳脊髄液+オキシトシン(1ng/μl)+オキシトシン受容体アンタゴニスト(10μg/μl)のいずれかを流速0.5μl/hrで側脳室へ投与し、各グループの炎症性疼痛時の痛み行動を解析した。その結果、人口脳脊髄液のみを投与したパートナーロス群に比べて、人口脳脊髄液+オキシトシン投与群では痛み行動が少ない傾向にあり、その痛み行動の減少はオキシトシン受容体アンタゴニスト投与群ではみられなかった。さらに、人口脳脊髄液+オキシトシン投与群とパートナー維持群の痛み行動を比較しても有意差は検出されなかった。パートナーロスに伴う痛み行動の増悪が、脳内へのオキシトシン投与によりパートナー維持群と同等レベルまで緩和されたことから、痛みの心理社会的修飾メカニズムに脳内オキシトシンが関与することが示唆された。

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2件)

Osako Y, Nobuhara R, Arai Y-CP, Tanaka K, Young LJ, Nishihara M, Mitsui S, Yuri K; Partner loss in monogamous rodents: Modulation of pain and emotional behavior in male prairie voles; Psychosomatic Medicine, 査読有, 80, 2018, 62-68 DOI: 10.1097/PSY.0000000000000524

Aki Arai, Yu Hirota, Naoki Miyase, Shiori Miyata, Larry J. Young, Yoji Osako, Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui; A single prolonged stress paradigm produces enduring impairments in social bonding in monogamous prairie voles; Behavioural Brain Research, 査読有, 315, 2016, 83-93 DOI: 10.1016/j.bbr.2016.08.022

[学会発表](計8件)

Yoji Osako, Reiko Nobuhara, Takahiro Okuda, Young-Chang P Arai, Takahiro Ushida, Kazunari Yuri; Neuropathic pain impairs pair-bonding in Monogamous rodent; 第39回日本疼痛学会、2017

Takahiro Okuda, Yoji Osako, Kou Takahashi, Koji Takimoto, Takao Okabe, Kenjiro Tanaka, Makoto Nishihara, Kazunari Yuri; Modulation of nociception by social bonds in monogamous rodents: c-Fos expression in the spinal cord and the brain "pain matrix" under conditions of inflammatory pain; 第39回日本疼痛学会、2017

奥田 教宏、大迫 洋治、竹林 秀晃、滝本 幸治、宮本 謙三、宅間 豊、井上 佳和、宮本 祥子、岡部 孝生、由利 和也; 痛みの社会的修飾メカニズムの一考 : 一夫一婦制げっ歯類

を用いた基礎的研究；第 52 回日本理学療法
学術大会、2017

Yoji Osako, Reiko Nobuhara, Kenjiro
Tanaka, Kou Takahashi, Larry J. Young,
Takahiro Ushida, Makoto Nishihara,
Kazunari Yuri; Modulation of nociception
by social bonds in monogamous animal,
prairie voles; 16th World Congress on Pain,
2016

Takahiro Okuda, Yoji Osako, Young-Chang
P Arai, Shoko Miyamoto, Hideaki
Takebayashi, Larry J Young, Takahiro
Ushida, Kazunari Yuri; Modulation of
nociception by social bonds in monogamous
prairie voles: Fos expression in the spinal
cord and the brain “pain matrix” under
conditions of inflammatory pain; 16th World
Congress on Pain, 2016

奥田 教宏、大迫 洋治、竹林 秀晃、滝本 幸
治、井上 佳和、岡部 孝生、宮本 祥子、宅間
豊、宮本 謙三、由利 和也；心理社会的要因
による痛み関連脳領域 の変化：高社会性げっ
歯類を用いた基礎研究；第45回四国理学療法
士学会、2016

大迫 洋治、西原 真理、信原 玲子、内田 有
希、牛田 享宏、三井 真一、Larry J Young、
由利 和也；一夫一婦制げっ歯類におけるパー
トナーロスによる痛みの修飾；第38回日本神
経科学大会、2015

新井 亜紀、廣田 湧、吉澤 萌香、石澤 美
衣、佐藤 葵、民部 由莉、Larry J. Young、
大迫 洋治、由利 和也、三井 真一；パロキセ
チンはSingle prolonged stressによって阻害
されたプレーリーハタネズミのつがい形成を
復元する；第38回日本神経科学大会、2015

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

由利 和也 (YURI, Kazunari)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・教授
研究者番号：10220534

(2) 研究分担者

大迫 洋治 (OSAKO, Yoji)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部
門・准教授
研究者番号：40335922

(3) 連携研究者

西原 真理 (NISHIHARA, Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授 (特任)
研究者番号：60380325

(4) 研究協力者

()