

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15170

研究課題名(和文)慢性ストレスにおける固有感覚異常が惹起する異常疼痛発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) Mechanism underlying chronic pain seen in the animal model for the chronic fatigue syndrome

研究代表者

木山 博資 (Kiyama, Hiroshi)

名古屋大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00192021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：線維筋痛症や慢性疲労症候群(CFS)で見られる慢性疼痛発症メカニズムを明らかにするために、慢性ストレスを負荷するラットCSFモデルを用い検討した。このモデルではストレス負荷後に慢性的異常疼痛が見られる。ストレス負荷開始後、まず後根神経節の固有感覚ニューロンの過活動が生じ、次に脊髄後角の内側部でのミクログリアの活性化、さらに前角背側部の運動ニューロン周辺にミクログリアの活性化が認められた。これらの活性化が見られる領域は脊髄の反射弓に沿っており、抗重力筋などの無意識下の緊張の持続が反射弓の過活動を惹起し、それに沿った領域でミクログリアが活性化し、それが疼痛の記憶となっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Our previous study using animal model for chronic fatigue syndrome (CFS) suggested that the pain observed in patients with CFS and fibromyalgia syndrome (FMS) involves microglial activation, and therefore in the present study, we investigated the mechanism underlying the pain. Our results suggested that the stress loading elicits continuous and specific hyper-activation of proprioceptors in the dorsal root ganglia, and the hyper-activated signal triggers microglial activation in the specific regions of spinal cord. These activated regions locate along the spinal reflex arc, and the activated microglia along the arc thereby inducing prolonged and abnormal levels of pain. The results indicate that proprioceptor-induced microglial activation may be crucial in the initiation and maintenance of abnormal pain in patients with CFS.

研究分野：神経解剖学

キーワード：疲労 慢性ストレス 慢性炎症

## 1. 研究開始当初の背景

線維筋痛症(FM)や慢性疲労症候群(CFS)などの機能性身体症候群(FSS)は慢性的な過度の疲労感や疼痛・睡眠障害など多様な症状を呈する疾患であり、その原因が不明の疾患である。原因の一端は最近の複雑な社会的環境的ストレスによると考えられている。これらの疾患の共通な症状のうち特に問題となる疼痛や過度の疲労感是一般生活の活動性を極度に低下させるため、その治療法の開発が喫緊の課題となっている。

研究代表者は以前大阪市立大学で行われた21世紀COEプロジェクト「疲労を克服する」に参画し、慢性疲労ラットモデルの開発・提唱に加わった。このラットモデルは単一でなく複合的なストレスを慢性的に負荷することにより、CFSに見られる多くの症状を呈するようになる。我々は、このラットの視床下部や内分泌系臓器に著しい分子発現の変化や細胞死が生じていることを発表した(Ogawa et al, 2005, 2009, 2012, Konishi et al, 2010, 2011)。さらにこのモデル動物で得られた血漿中のMSHの増加が、罹患5年以内のCFS患者血漿中でも有意に上昇していることを明らかにし、このモデル動物の妥当性を示唆した(Shishioh-Ikejima et al, 2010)。2014年に、このモデルラットがアロディニアや筋痛を発症していること、その原因が脊髄後角のミクログリアの活性化にあることを発表した(Yasui et al, 2014)。また、水村和枝教授(中部大)や井上和秀教授(九州大学)らのグループとの共同研究により、FMモデルであるRCS(repeated cold stress)モデルやレゼルピンモデルで生じる慢性疼痛も同様にミクログリアの活性化が原因であることを明らかにした(Taguchi et al, 2015, Akagi et al, 2014)。これらの成果は全く異なる実験手法を用いた3つの慢性ストレスモデルで同様のミクログリアの活性化と疼痛が見られることを示しており、ここに異な

る疾患の共通症状を説明する鍵が見えてきた。

## 2. 研究の目的

上述のCSFモデル動物を用いて、痛みを引き起こすと考えられるミクログリア活性化のメカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。このため、(i)後角の内側に限局してミクログリアの集積が見られる理由の解明、(ii)後角に入力する後根神経節の神経細胞の特徴抽出と動態の検討、(iii)交感神経系の関与、などを中心に研究を進める。これらの研究により、脊髄内の局所で生じるミクログリアの活性化のメカニズム、さらには慢性ストレスで活性化する脊髄内神経回路の同定が期待される。また、我々が最近新たに開発したATF3(GFP<sup>mito</sup>/Cre)マウスを用いた検討を加えて試みる。

## 3. 研究の方法

(1)慢性ストレス負荷モデルとして、慢性疲労症候群(CFS)モデル(Ogawa et al, J Neurochem 2009)と線維筋痛症(FM)モデル(Nasu et al, 2010)を用いる。このモデルでは、1.5cmの高さに水を入れたケージ内でラットを5~6日飼育することで、睡眠障害(レム睡眠の欠乏、ノンレム睡眠の半減)・過活動による疲労(昼夜に関わらず自発行動量が増加する)など複合的なストレス負荷を安定的にかけることができ、再現性の良い結果を得ることができる(Ogawa et al, J Neuroendocrinol 2012)。一方、このモデルではラットは拘束ストレスのように消化管に潰瘍ができない。また、ACTHやCRHの著明な増加は慢性的には見られない。摂食量には大きな変化は見られない。5日のストレス負荷後にストレス負荷を除くと、活動リズムや睡眠量は1~2日で正常に戻るが、異常な疼痛はストレス負荷後数日間継続する。また、別のモデルとして用いる予定の線維筋痛症

(FM)モデルではケージ内の温度を 30 分ごとに室温と 4℃ に変化させ、夜間は低温で維持するモデルである (Nasu et al, 2010)。本モデルではストレス負荷後、筋の圧痛が長期間現れる。また、ラット以外にマウスを用いた研究を行ないやすい点が特徴である。

(2)実験動物：Sprague-Dawley (SD) 系ラット (SLC, Hamamatsu, Japan) 雄 150g~200g を用いた。また、我々が開発した BAC トランスジェニックマウス ATF3(GFP-mito/Cre)(C57BL/6 系統) (Kiryu-Seo et al, 2016) を用いて解析した。ATF3 は神経系では通常脳内には発現していないが、神経細胞損傷が損傷あるいは過活動すると神経細胞特異的に発現する。このマウスでは ATF3 のプロモーターを含む BAC クローンにミトコンドリアを標識する GFP 蛋白と Cre の遺伝子を導入し、ATF3 プロモーター作動条件下でミトコンドリアを GFP 蛍光標識すると同時に Cre 蛋白を発現することができる。このマウスを用いることにより、軸索損傷あるいは過活動神経細胞のミトコンドリアを GFP 蛍光で標識することが可能になる。

(3)疼痛行動の解析：ストレス負荷による疼痛閾値の解析には、von Fray hair test, Randall-selitto test などを用いる。アロディニアの同定には、足底の疼痛閾値を von Fray test により、また、筋の圧痛の検討には、前脛骨筋を用い Randal Seritto テストを行う。

(4)筋電図：筋電図の測定には、電極を埋め込んでテレメトリーシステムにより経時的に計測した。

(5)組織染色：免疫染色は定法により行った。

(6)PCR: 組織内の各種分子 mRNA 発現の変化は PCR 法を用いて行った。

本研究では遺伝子組換え実験と実験動物を使用した。これらの実験の遂行にあたっては、実験計画等の機関承認をすべて受けた。また、

動物の取り扱いや DNA 組換え実験に必要な講習会などについても、研究代表をはじめ参加する大学院生は適切に受講した。

#### 4. 研究成果

本ラットモデルは 5 日間のストレス負荷を行うモデルであるが、ストレス負荷を 5 日から 6 日間に 1 日延長するとストレス負荷後の疼痛が著しく遷延し慢性化することが新たに明らかになった。このことから 6 日間のストレスモデルが疼痛の慢性化を研究する上でより良い実験系になると考えられた。また、6 日間のストレス負荷は、脊髄前角の背側に位置する運動ニューロンの周囲にもミクログリアの集積と活性化を惹起した。

後根神経節については、ATF3 を指標に過活動しているニューロンの同定を試みた。その結果ストレス負荷 2 日目から ATF3 陽性の神経細胞が観察され、ATF3 陽性細胞は徐々に増加した。また、前角でミクログリアが取り囲んでいる大型細胞の核にもストレス負荷 6 日に ATF3 陽性反応が観察された。ATF3 は通常脳内の神経細胞には発現していないが神経細胞の軸索損傷や過活動にตอบสนองして障害神経細胞特異的に発現すると考えられる。このことから、慢性ストレス負荷により、まず後根神経節内の一部のニューロンに過活動が生じ、その後数日経てから脊髄前角の運動ニューロンの一部が過活動状態になっていることが予想される。後根神経節の ATF3 陽性細胞の機能を明らかにするために、各種モダリティーのマーカールと ATF3 の二重染色を行ったところ、多くの ATF3 ニューロンは TrkC 陽性であり、固有感覚を伝達するニューロンであることが明らかになった。また、逆行性トレーサーを用いた研究から、後根神経節内の ATF3 陽性細胞は主に抗重力筋であるヒラメ筋を支配していることが明らかになった。さらに、脊髄前角の ATF3 陽性細胞は NeuN 陽性であるが転写因子 Err3 陰性であることが

ら運動ニューロンではなく運動ニューロンであることが明らかになった。また、逆行性トレーサー実験からこれらの運動ニューロンは主にヒラメ筋を支配することも明らかになった。

上述の結果から、最初に後根神経節内のヒラメ筋を支配する固有感覚細胞の過活動が生じ、その中枢枝が入力する後角の内側部のミクログリアが次に活性化し、最後にヒラメ筋を支配する運動ニューロンの過活動が見られたことになる。これは脊髄の反射弓に沿って神経の過活動が生じていることを示している。そこで、実際にヒラメ筋で過活動が生じているかどうかを筋電図で確認した。筋電図の採取には、電極と送信デバイスを皮下に埋め込みテレメトリーシステムを用いラットの自由行動下でデータを採取した。ストレス負荷の時間経過に沿って、筋活動の漸増が認められた。このヒラメ筋の過活動を抑制するために、足の関節を物理的に固定しヒラメ筋の収縮を制限したところ、このストレスモデルではミクログリアの活性化と疼痛行動はともに抑制された。これらのことから、ヒラメ筋のような抗重力筋の無意識下での緊張の持続が反射弓の過活動を起こし、それに沿った領域でミクログリアの活性化が疼痛の記憶を定着していることが予想された。

一方、最近我々が新たに開発したATF3(GFPmito/Cre)マウスは、ATF3のプロモーター下でCreリコンビナーゼとミトコンドリアを標識するGFPを発現する。このトランスジェニックマウスを用い慢性ストレスを負荷すると、過活動状態の神経細胞のミトコンドリアを特異的に標識することが期待された。そこで、このトランスジェニックマウスを用いて、予備的な実験を行なった。その結果、ATF3発現が見られる一部の運動ニューロンのミトコンドリアがGFP標識されることが明らかになった。ただ、マウス低水位ケージモデルでは、マウスの行動様式がラットと

異なることから、ラットと同様なストレス負荷をかけにくいことも明らかとなった。これは今後の課題である。一方、慢性ストレスによる交感神経の関与についてもラットで観察したが、交感神経節から後根神経節への入力神経を切断すると疼痛が著しく減弱する傾向が見られた。このことから、交感神経の活動も本ストレスモデルでの疼痛の慢性化に関与していることが示唆された。慢性ストレスによる疼痛発症における交感神経系の関与については今後の課題である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Wei L, Tokizane K, Konishi H, Yu HR, Kiyama H, (2017) Agonists for G protein-coupled receptor 84 (GPR84) alter cellular morphology and motility but do not induce pro-inflammatory responses in microglia, *J Neuroinflammation* 14(1):198. doi: 10.1186/s12974-017-0970-y (査読あり)  
Kobayashi M, Konishi H, Sayo A, Takai T, Kiyama H, (2016) TREM2/DAP12 signal elicits pro-inflammatory response in microglia and exacerbates neuropathic pain, *J Neurosci* 36(43):11138-11150 DOI:10.1523/JNEUROSCI.1238-16.2016 (査読あり)

[学会発表](計3件)

木山博資、特別講演、慢性ストレスは脳を起点として恒常性維持機構を崩壊させる、第9回耳鼻咽喉科心身医学研究会 2017年10月14日、慶応義塾大学、東京  
Kiyama H, Microglia as a determinant of injured neuron fate, 2017 FAN symposium (国際学会), 2017年10月6日、Freiburg, German.

木山博資、招待講演、新たな技術による末梢神経再生メカニズム研究の新展開、

第 28 回日本末梢神経学会学術集会, 2017  
年 8 月 26 日、ウインクあいち, 名古屋,  
愛知

## 1 研究組織

### (1) 研究代表者

木山 博資 (KIYAMA Hiroshi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号 : 00192021