

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 30 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21390431

研究課題名（和文） 豊かな環境における中枢神経新生を介した慢性疼痛に対する治療戦略

研究課題名（英文） Therapeutic strategy for the chronic pain through the neurogenesis of the central nervous system in enriched environment

研究代表者

山崎 光章（YAMAZAKI MITSUAKI）

富山大学・大学院医学薬学研究部（医学）・教授

研究者番号：70158145

研究成果の概要（和文）：

豊かな環境飼育では、海馬において神経新生が促進され、この新生に δ オピオイド神経系が関与していることが明らかとなった。豊かな環境飼育による海馬における BDNF mRNA 発現量の増加を伴った神経新生は、BDNF のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化の変化によって一部調節されている可能性が示唆された。また、神経障害性疼痛が神経新生促進作用を抑制することが示された。豊かな環境飼育によるマウス海馬神経新生は、坐骨神経を結紮により引き起こされる神経障害性疼痛により、有意な抑制が認められた。

こうしたアプローチは、慢性疼痛に対する神経新生を考慮した治療戦略の手がかりとなり、今後の臨床への応用が十分に期待できる。

研究成果の概要（英文）：

Our results indicate that exposure to an enriched environment enhances neurogenesis and regulates emotionality. Enriched environment increases BDNF mRNA expression via sustained epigenetic modification in the mouse hippocampus. The chronic pain process promotes astrogliosis in the cingulate cortex through the dysfunction of cortical μ -opioid receptors. Furthermore, chronic pain suppressed enriched environment mediated induction of both DCX- and NeuroD-labeled cells. These results suggest that chronic pain has stress-like damaging modulatory effects on hippocampal neurogenesis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2012 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：neuropathic pain, enriched environment, neurogenesis, central nervous system

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛はペインクリニックにおいて最も治療困難な疾患の一つである。この

慢性疼痛においては、治療が奏功せずに痛み
の回路が一旦形成されてしまうと、難治とな
り、患者の QOL 低下にも繋がる。我々は、こ

れまでの研究によって、豊かな環境（感覚・運動刺激の豊富な環境下における飼育 [enriched environment]、(ヒトにおいては、運動・知覚刺激の豊富な環境と考えられる)での中枢神経新生が、この痛み回路の形成を防ぎ、さらに情動や運動機能の回復をもはかる可能性のあることを明らかにしてきた。今回、中枢神経新生に焦点をあて、神経障害性疼痛に対する革新的な治療方法の開発(トランスレーショナル・リサーチ)を試みることにした。

これまでの神経障害性疼痛の研究の中心は脊髄レベル以下であった。しかし、神経障害性疼痛は不快や情動など脳と深く関連しており、上位中枢での研究が望まれるが、その本質は謎のままである。我々は、科学研究費C(平成19~20年度)「脳内における不安と痛みの相互作用機序解明および新しい慢性疼痛治療の開発」において、マウスの慢性神経障害性モデルを新たに作成し、抗うつ薬が脳(特に情動に関係の深い海馬・帯状回)に直接作用して鎮痛効果を示すことを初めて明らかにした。しかし、脳における抗うつ薬の有効性について、詳細な機序を解明することが出来なかった。

一方、中枢神経系の再生は不可能であると考えられてきたが、近年、自己複製能と多分化能を有する神経幹細胞の存在が明らかとなり、中枢神経(海馬や帯状回付近など)において神経幹細胞から神経新生の生ずることが明らかとなってきた。また、豊かな環境により、神経系や免疫系の様々な変化が生じ、神経新生が促進されることも明らかとなってきた。そこで、豊かな環境下における神経新生を海馬で確認した後、神経障害性疼痛マウスモデルを用い検討した。その結果、2008年に神経障害性疼痛がこの神経新生を抑制することを *in vivo* で初めて報告した。

これらから、1)、神経障害性疼痛により、不快や情動に関係する神経(海馬、帯状回、島)の新生が阻害されること、2)豊かな環境にあると、逆に神経新生が促進されること、3)神経障害性疼痛の状況においても、何らかの方法(豊かな環境、薬物など)により神経新生の促進がはかれれば、痛みのみならず、情動障害の改善、さらには運動機能の回復などの効果も期待できると考えた。

さらに、抗うつ薬が海馬において神経新生に重要な役割を果たしていること(Lee J. et

al, Science 2003)や、オピオイド作動薬が神経新生の促進に関与していること(日本神経精神薬理学会で発表, 2007)、帯状回の機能低下にアストロサイトの亢進が関係することも我々の最近の研究でわかってきた。

そこで、抗うつ薬やオピオイドなどで中枢神経情動系(海馬・帯状回・島)の機能低下を防ぐことが慢性疼痛に対して効果的であり、より神経新生を促進することがすばらしい治療成績を生み出すのではないかとの考え、現存の実験系を応用することによって、神経新生を期待した慢性疼痛に対する研究を遂行しようとの着想に至った。

これまで、上位中枢における慢性疼痛と豊かな環境との関連や薬物の関与について検討された報告は極めて少ない。特に、慢性疼痛の状況において、抗うつ薬、麻薬などの治療薬を投与し、神経新生の観点から論じた研究はない。

仮に、脳内において、豊かな環境、あるいは代表的な鎮痛薬(麻薬)、鎮痛補助薬(抗うつ薬、抗けいれん薬など)や *future analgetics* としてのカンナビノイド・*glial-modulating agents* (アストロサイトの機能抑制作用がある)などが、神経新生の観点から効果があり、その機序が解明されれば、新しい慢性疼痛治療方法の開発につながる。これらの結果は、慢性疼痛に苦しむ患者にとって大いなる福音となることが期待される。

2. 研究の目的

本研究では、マウスを用い、

1) 豊かな環境や神経障害性疼痛による中枢神経(海馬・帯状回などの情動系と体性感覚野(S1, S2))における細胞新生の変化について、我々の作成した慢性疼痛モデル(4~8週間慢性疼痛を感じないモデル)を用いて、行動薬理的・免疫組織学的な検討を行い明らかにする。

2) さらにエピジェネティクス解析を行い、遺伝子レベルでの観点から検討を加え、神経障害性疼痛の発症機構のみならず、治療効果について明らかにする。

3) オピオイド受容体および内因性リガンドが神経細胞だけではなく、神経幹細胞にも出現していることから、各オピオイドの神経新生への関与を検討する。豊かな環境におけるオピオイドの神経新生との関連性について明

らかにする。

4) 神経の生存・分化および機能維持に重要な役割を果たしている BDNF (脳由来神経栄養因子) とオピオイドの関連について検討する。さらに、この BDNF が豊かな環境における神経新生と関連があるかどうかについて明らかにする。

5) 神経障害性疼痛に対する薬物をこの痛みモデルに適応し、痛み改善効果について豊かな環境や中枢での神経新生の観点から検討を加え、その効果について明らかにしたい。

3. 研究の方法

2ヶ月齢の雄性マウスを用い、豊かな環境群 (感覚・運動刺激が豊富な環境下で4週間飼育を行う群) と通常飼育群とを以下の順序 (1~3: 免疫組織学的方法、分子生物学的方法) に従って比較検討する。これらにより、豊かな環境群と通常飼育群の神経新生促進の程度および δ オピオイドの関与について検討する。

さらに、豊かな環境下での神経障害性疼痛の影響について検討 (4) する。

1. 中枢神経 (海馬、帯状回) の神経新生の変化についての検討

神経各部位の凍結切片において、免疫染色法により、nestin (神経幹細胞に特異的に発現)、doublecortin (神経芽細胞や未熟な神経細胞に発現)、neuroD (神経への分化に促進的に働く転写因子)、Brd U (細胞増殖マーカー)、Neu N (神経細胞マーカー) を測定し、それぞれの局在について検討する。

2. 中枢神経におけるオピオイド神経系の変化

RT-PCR 法により、神経各部位の μ 、 δ 、 κ オピオイドペプチド前駆体である POMC、PENK、PDYN の mRNA 量を測定する。

また、 δ オピオイド作動薬が神経新生の促進に関与していることが我々の研究でわかってきた (日本神経精神薬理学会 2007 において発表) ので、SNC80 (δ オピオイド作動薬) を反復投与し、海馬、帯状回における Neuro D の蛍光免疫活性を測定する。

3. 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の mRNA 量の変化の検討

RT-PCR 法により、海馬、帯状回における BDNF mRNA 発現量を検討する。

4. 豊かな環境下での神経障害性疼痛 (慢性モデル) の影響に関する検討

イソフルラン麻酔下にマウス右坐骨神経半周結紮モデル (神経障害性疼痛モデル) を作成する (Narita M, et al. Eur J Pharmacol. 2000, 401, 189-190)。坐骨神経の剖出のみで結紮しない群を対照群とする。その後、4週間豊かな環境あるいは通常飼育した群に上記2~4に従って、1) 神経新生の成熟度、2) オピオイド神経系の変化、3) BDNF 量を測定する。

4. 研究成果

(1) 豊かな環境飼育による中枢神経 (海馬、帯状回) の神経新生の変化についての検討を行った。

豊かな環境飼育群 (感覚・運動刺激が抱負な条件下でマウスを4週間飼育) では、通常飼育群と比較して、海馬歯状回顆粒細胞下層における nestin (神経幹細胞に特異的に発現) に違いはなかったが、doublecortin (神経芽細胞や未熟な神経細胞に発現) 活性、Neuro D (神経への分化に促進的に働く転写因子) 陽性細胞数、BrdU (細胞増殖マーカー) 陽性細胞数が増加した。

(2) 豊かな環境飼育による中枢神経におけるオピオイド神経系の変化について検討を行った。

豊かな環境飼育群では、視床下部における POMC と PDYN の mRNA には変化がなかったが、PENK (δ オピオイド前駆体) mRNA 発現量が増加した。また、 δ オピオイド作動薬である SNC80 投与群では、海馬歯状回顆粒細胞下層における NeuroD 陽性細胞数が増加した。豊かな環境飼育によって認められた doublecortin および NeuroD 陽性細胞増加は、坐骨結紮により抑制された。これらより、豊かな環境飼育では、海馬において神経新生が促進され、この新生に δ オピオイド神経系が関与していることが明らかとなった。また、神経障害性疼痛が神経新生促進作用を抑制することが示された。

Freund adjuvant を用いた痛みモデルでは、帯状回、感覚野、島、視床においてファンクショナル MRI のシグナルの増強が認められた。これらの影響は、プロダイノルフィンノックアウトマウスでは認められなかった。プロダイノルフィン mRNA とダイノルフィン A (内因性 κ 受容体作動性オピオイド) がこのモデルの同側の脊髄において強く発現した。ダイノルフィン A を脊髄中に注入すると、疼痛行動

を生じ、上記脳領域における活動性を増加させた。MK-801 (NMDA アンタゴニスト) は、ダイノルフィン A による痛み行動やシグナル増強を抑制した。これらは、ダイノルフィン A が脊髄後角の NMDA 受容体を介して上行性に痛み刺激を活性化することを示唆する。

(3) 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の mRNA 量の変化ならびにエピジェネティクス修飾の関与について、検討を行った。

神経分化を促進的に制御する BDNF の発現変化について検討を行ったところ、豊かな環境飼育 4 週目の海馬歯状回において、通常飼育群と比較して、BDNF mRNA 量の有意な増加が認められた。こうした BDNF の発現増加についてトランスクリプトーム解析ならびにエピジェネティクス解析を行ったところ、BDNF Promoter 3 (P3) ならびに P6 にて、H3K4 のメチル化の増加、ならびに BDNF P4 における H3K9 のメチル化の減少、さらには、BDNF P3 ならびに P4 における H3K27 のメチル化の減少が認められた。また、こうした条件下、DNA メチル化酵素、ヒストンを修飾するメチル化酵素ならびに脱メチル化酵素、microRNA 発現に変化は認められなかった。以上の結果より、豊かな環境飼育による海馬における BDNF mRNA 発現量の増加を伴った神経新生は、BDNF のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化の変化によって一部調節されている可能性が示唆された。さらに豊かな環境飼育により、海馬領域においてアセチルコリン神経に高頻度に発現している ChAT 陽性細胞の発現の増加が認められた。

(4) 豊かな環境下での神経障害性疼痛 (慢性モデル) の影響に関する検討を行った。

豊かな環境飼育といった外因性の刺激のみならず、慢性疼痛のような末梢性侵害刺激による海馬領域の変化についても解析を行った。マウスの坐骨神経を結紮し、神経障害性疼痛モデルを作製し、作成同日から 4 週間、豊かな環境飼育することにより、神経新生の変化を検討した。その結果、豊かな環境飼育によるマウス海馬神経新生は、坐骨神経を結紮により引き起こされる神経障害性疼痛により、有意な抑制が認められた。

この一連の研究により、神経障害性疼痛の発症機構だけではなく、慢性疼痛治療と神経新生との関連を上位中枢内の機序から科学的に証明することが出来る。さらに、臨床上、

慢性疼痛の治療に対する、早期からの運動リハビリテーションや疼痛緩和の意義、そして既存の抗うつ薬、麻薬 (δ オピオイド作動薬など) に加え将来有望視される治療薬についての神経新生を期待した新しい情報を提供できることが十分に期待される。

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 4 件)

① Takemura Y, Furuta S, Hirayama S, Miyashita K, Imai S, Narita M, Kuzumaki N, Tsukiyama Y, Yamazaki M, Suzuki T, Narita M. Upregulation of bradykinin receptors is implicated in the pain associated with caerulein-induced acute pancreatitis. *Synapse*, 65, 608-616, 2011. 査読あり

② Takemura Y, Yamashita A, Horiuchi H, Furuya M, Yanase M, Niikura K, Imai S, Hatakeyama N, Kinoshita H, Tsukiyama Y, Senba E, Matoba M, Kuzumaki N, Yamazaki M, Suzuki T, Narita M. Effects of gabapentin on brain hyperactivity related to pain and sleep disturbance under a neuropathic pain-like state using fMRI and brain wave analysis. *Synapse*; 65, 668-676, 2011. 査読あり

③ Niikura K, Furuya M, Narita M, Torigoe K, Kobayashi Y, Takemura Y, Yamazaki M, Horiuchi H, Enomoto T, Iseki M, Kinoshita H, Tomiyasu S, Imai S, Kuzumaki N, Suzuki T, Narita M. Enhancement of glutamatergic transmission in the cingulate cortex in response to mild noxious stimuli under a neuropathic pain-like state. *Synapse*; 65, 424-432, 2011. 査読あり

④ Taketa Y, Niikura K, Kobayashi Y, Furuya M, Shimizu T, Narita M, Imai S, Kuzumaki N, Maitani Y, Yamazaki M, Inada E, Iseki M, Suzuki T, Narita M. Direct evidence for the ongoing brain activation by enhanced dynorphinergic system in the spinal cord under inflammatory noxious stimuli. *Anesthesiology*; 112, 418-431, 2010. 査読あり

[学会発表] (計 10 件)

① 伊東久勝、池上大悟、山崎光章、成田年：神経障害性疼痛の難治化における脊髄内エピジェネティクス修飾の関与、日本ペインクリニック学会第 46 会大会、2012 年 7 月 5-7 日、島根

② 伊東久勝、古田貞由、山崎光章、池上大悟、酒井寛泰、成田年：横隔膜下迷走神経

機能不全による侵害性知覚神経の感作. 日本麻酔科学会 第 59 回学術集会、2012 年 6 月 7-9 日、神戸

③ 竹村佳記, 山下 哲, 堀内 浩, 柳瀬 諒, 大石美緒子, 山崎光章, 成田 年: 疼痛制御機構に関する研究: 慢性疼痛モデルと比較したセルレイン誘発急性膵炎モデルでの疼痛発現機構の検討. 日本臨床麻酔学会第 31 回大会、2011 年 11 月 3-5 日、沖縄

④ 長澤阿津実、葛巻直子、成田道子、池上大悟、竹島秀幸、牛島俊和、山崎光章、成田年: Enriched environment 飼育によるエピジェネティクス修飾を伴った海馬神経新生促進機構の解析. 第 34 回日本神経科学大会、2011 年 9 月 14-17 日、横浜

⑤ 竹村佳記, 古田貞由, 平山重人, 宮下和彦, 今井哲司, 成田道子, 葛巻直子, 山崎光章, 鈴木 勉, 成田 年: Caerulein 誘発急性膵炎モデルでの疼痛発現機構における bradykinin 受容体の関与. 第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22-24 日、横浜

⑥ 竹村佳記、今井哲司、葛巻直子、山崎光章、鈴木勉、成田年: 炎症性疼痛下での脳活動の変化や睡眠障害に対するメロキシカム (モービック) の影響; fMRI および脳波解析による検討. 日本麻酔科学会 第 57 回学術集会、2010 年 6 月 3-5 日、福岡

⑦ Y. Takemura, M. Narita, S. Furuta, K. Miyashita, S. Imai, M. T-Narita, N. Kuzumaki, M. Yamazaki, and T. Suzuki: Up-regulation of bradykinin receptors function in the dorsal root ganglia under the acute pancreatitis pain-like state. The International Narcotics Research Conference (INRC), 2010 年 7 月 11-16 日, Sweden

⑧ 屋代涼子、成田 年、古田貞由、吉澤一巳、竹村佳記、榎本達也、成田道子、今井哲司、山崎光章、井関雅子、葛巻直子、鈴木 勉. 第 3 回日本緩和医療薬学会年会、2009 年 10 月 17-18 日、横浜

⑨ 竹村佳記、尾関あゆみ、橋本敬輔、山崎光章、成田 年、鈴木 勉: 疼痛制御機構に関する研究 (第 100 報): Fentanyl による μ -opioid 受容体代謝回転ならびに中枢性 Na⁺ チャネルに対する影響-Fentanyl が示す特異性の解析-. 日本麻酔科学会 第 56 回学術集会、2009 年 8 月 16-18 日、神戸

⑩ 竹村佳記、平山重人、古田貞治、今井哲司、山崎光章、葛巻直子、成田 年、鈴木 勉: 疼痛制御機構に関する研究 (第 105 報): Caerulein 誘発膵炎モデルにおける疼痛発現機構の解析. 日本ペインクリニック学会 第 43 回大会、2009 年 7 月 16-18 日、名古屋

[図書] (計 2 件)

①伊藤久勝, 池上大悟, 酒井寛泰, 山崎光

章, 成田 年: メディカルレビュー, オキシコドンの今後の可能性-基礎研究の観点から-

②成田 年, 山下 哲, 釈永清志, 山崎光章: 真興交易, 痛みの統合的理解と除痛の意義. 臨床麻酔, 2012; 3: 381-387.

[その他]

ホームページ

<http://www.med.u-toyama.ac.jp/anesth/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 光章 (YAMAZAKI MITSUAKI)

富山大学・大学院医学薬学研究部 (医学)・教授

研究者番号: 70158145

(2) 研究分担者

成田 年 (NARITA MINORU)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 40318613

畠山 登 (HATAKEYAMA NOBORU)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号: 70251907