

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590717

研究課題名(和文) ストレス負荷により痛覚過敏が生じる脳メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of brain mechanism underlying stress-induced hyperalgesia

## 研究代表者

井辺 弘樹 (Imbe, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60326353

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：慢性ストレスに暴露することにより、動物に痛覚過敏(疼痛反応の増強)が生じることが知られていが、そのメカニズムは現在まで明らかにされていない。本研究において、慢性ストレス後、痛覚過敏を生じたラットの中脳中心灰白質においてアストロサイトの細胞骨格タンパク質であるGFAPおよびグリアグルタメートトランスポーターの減少が確認された。さらに慢性ストレス後、ラットの吻側延髄腹内側部のGFAPレベルと機械的感覚閾値の間に正の相関関係を見いだした。これら実験結果より、慢性ストレスによる痛覚過敏に下行性疼痛調節系のグリア細胞の変化が関与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It has been known that exposure to chronic stress for animal produces hyperalgesia (enhancement of nociceptive reaction). However the mechanism remains unknown. In the present study we have demonstrated that reductions of glial fibrillary acidic protein (GFAP), astrocyte-specific cytoskeletal protein, and glia glutamate transporter levels in the periaqueductal gray matter were observed in the rats with chronic stress-induced hyperalgesia and that in chronic stress group, the GFAP protein level in the rostral ventromedial medulla was positively correlated with mechanical threshold. These results have clearly shown that the glial change in descending pain modulatory system is involved in chronic stress-induced hyperalgesia.

研究分野：疼痛学

キーワード：ストレス 疼痛学 下行性疼痛調節系

## 1. 研究開始当初の背景

痛みの強さは不安や恐怖などの情動、注意、予期といった種々の因子により大きく変化する。急性の心理的ストレスは鎮痛作用を引き起こし、「運動競技中や戦争中に被った損傷は、受傷直後、大きな損傷でも比較的痛みを感じない。」ということがよく知られている。一方、慢性の心理的ストレスの患者では健常者に比べて皮膚痛覚閾値が低下しており、慢性の心理的ストレスは疼痛を増強する作用があると考えられている。このような心理的ストレスによる痛みの変化は侵害情報伝達を調節する中枢神経系の活動に由来するものである。

人や動物の脳には、痛みをコントロールする下行性疼痛調節系が存在している。大脳皮質、視床下部、扁桃体などの高位中枢からの入力の中脳中心灰白質 (PAG) を介して、吻側延髄腹内側部 (RVM)、背外側橋中脳被蓋 (DLPT) へ伝えられる。RVM の大縫線核 (NRM) はセロトニン (5HT) を、DLPT の青斑核 (LC) はノルアドレナリン (NA) を含み、ともに脊髄側索を下行して脊髄後角に至り痛みを抑制する。しかし約 10 年前、下行性疼痛調節系からの入力が神経因性疼痛を長期間持続させているという衝撃的な報告がなされ (Burgess et al. J Neurosci. 22:5129-36, 2002)、生理的条件下では疼痛を抑制する下行性疼痛調節系が、種々のとくに慢性化した病態下では、逆に疼痛を増強させることが知られるようになった。

強制水泳ストレスは心理・身体的ストレスに分類されている。申請者らは、ラットに強制水泳ストレスを 3 日間負荷することで生じる痛覚過敏に RVM からの下行性疼痛増強入力に関与することを他に先駆けて明らかにした (Imbe et al. Brain Res. 1329:103-12, 2010)。

さらに、申請者らはこれまでに、慢性ストレス後、RVM セロトニン神経系で細胞内情報伝達分子 ERK が活性化すること (Imbe et al. Pain. 112:361-71, 2004) を報告している。ERK の活性化はセロトニン生合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase (TPH) の転写を促進しセロトニン産生を増加させることが知られており、我々も慢性ストレス後、RVM で TPH の増加を確認している。RVM からの下行性セロトニン入力が脊髄において 5HT<sub>3</sub> 受容体を介して疼痛を増強することから、RVM でのセロトニン産生の増加が慢性ストレス後の疼痛反応の増強に関与している可能性が十分に考えられる。

予備実験において、慢性ストレス後、PAG でアストロサイトの減少が観察された。臨床的にも、うつ患者の大脳皮質でグリアの減少 (Si et al. Neuropsychopharmacology 29: 2088-96, 2004) が報告されている。アストロサイトは神経伝達物質のリサイクリングや局所のイオン環境の維持だけではなく、サ

イトカイン産生により神経細胞の興奮性をコントロールしている。これら下行性疼痛調節系におけるグリアの変化が慢性ストレス後の痛覚過敏に関与している可能性も考えられる。これらの流れを踏まえて申請者らは、「慢性ストレスにより引き起こされる痛覚過敏の発現・維持に下行性疼痛調節系の可塑的变化が関与している。」という仮説を立てるに至った。これまで、寒冷環境、拘束ストレス、強制水泳などに繰り返し暴露することにより、動物に痛覚過敏が生じることが報告されている (Imbe et al. Front Biosci. 11:2179-92, 2006, Review)。しかし、慢性ストレスが痛覚過敏を起こすメカニズムは現在まで明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

慢性ストレス後、セロトニン神経系を含む下行性疼痛調節系にどのような変化が生じ疼痛反応に影響を与えるのか、そのメカニズムを明らかにしたい。

- (1) 慢性ストレス後の痛覚過敏における下行性疼痛調節系セロトニン入力の影響
- (2) 慢性ストレス後の下行性疼痛調節系におけるグリアを含む組織構築の変化
- (3) 慢性ストレス後の下行性疼痛調節系を構成する神経細胞の活動変化

## 3. 研究の方法

雄性ラット 140-330g を実験に使用した。

### (1) 実験 1

慢性拘束ストレス (6h/day, 3week) 負荷後、吻側延髄腹内側部 (RVM) および中脳中心灰白質 (PAG) を摘出し Western blot を用い以下のタンパク質の量を測定し、コントロール群と比較した。有意差が確認されたタンパク質に対しては免疫組織染色を行い、画像上どの領域で変化が著明であるのか、組織学的検討を加えた。

グリア細胞関連タンパク (GFAP, CD11b)

グルタメートトランスポーター (EAAT2)

### (2) 実験 2

naïve 群

強制水泳ストレスおよび complete Freund's adjuvant (CFA) 注射は行われていない。

CFA 群 足底に CFA 注射を行った。

FS 群

プラスチックシリンダー (幅 30cm、高さ 50cm) に 24-26 の水を 20cm の高さまで入れ、ラッ

トに強制水泳ストレス（第1日 10min, 第2-3日 20min）を負荷した。

#### FS+CFA 群

強制水泳ストレス（第1日 10min, 第2-3日 20min）を負荷した後、足底に CFA 注射を行った。

上記、動物群において、RVM やそれらの活動を制御する高位中枢で、p-CERB、c-fos の発現を免疫組織学的に調査した。

### (3) 実験 3

Rat Tph2 遺伝子断片(もしくはスクランブル配列)を含む short hairpin RNA (shRNA) プラスミドをエレクトロポレーション法を用いてラットの吻側延髄腹内側部 (RVM) に遺伝子導入し、RNA 干渉によりトリプトファン水酸化酵素 (TPH) の遺伝子発現を抑制する。下行性セロトニン入力を低下させたラットでストレス負荷により生じる痛覚過敏が変化するか否か検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 実験 1

慢性ストレス後、痛覚過敏を生じたラットの下行性疼痛調節系におけるグリアを含む組織構築の変化について検討を行った。その結果「慢性拘束ストレス後、下行性疼痛調節系の中脳中心灰白質においてアストロサイトのマーカーである GFAP およびグリアグルタメートトランスポーターが減少している。」というデータを得た。この結果は第35回日本神経科学大会(2012 名古屋)、第35回日本疼痛学会(2013 埼玉)において発表し、論文 (Imbe et al. *Neuroscience*. 223: 209-18, 2012) として掲載された。さらに、慢性ストレス後の痛覚過敏と下行性疼痛調節系の変化について「慢性ストレス後、ラットの吻側延髄腹内側部のGFAPレベルと機械的感覚閾値の間に正の相関関係がある。」ということを見いだした。第90回日本生理学会大会(2013 東京)において発表し、論文 (Imbe et al. *Neuroscience*. 241:10-21, 2013) として掲載された。また、これら研究成果を参考に、下行性疼痛調節系について和文総説 2 編(井辺ら、*Bone Joint Nerve*. 2:223-229, 2012; *ペインクリニック*, 34:1069-1077, 2013) をまとめた。さらに第43回北米神経科学学会(2013 San Diego)においても発表を行った。これら研究により、慢性ストレスによる疼痛反応の増強に下行性疼痛調節系のグリア細胞の変化が関与することが世界で初めて明らかにされた。

### (2) 実験 2

強制水泳ストレス負荷により、前部島皮質で p-CREB および c-Fos の発現が有意に増加することが明らかとなった。さらに、強制水泳ストレス負荷ラットの足底に CFA 注射を行うと痛覚過敏の有意な増加が確認され、島皮質での c-Fos の発現が有意に減少することが明らかとなった。これら結果は、第91回日本生理学会大会(2014 鹿児島)において発表し、論文 (Imbe et al. *Neuroscience*. 259:1-11, 2014) として掲載された。これら研究により、慢性ストレスによる疼痛反応の増強に、下行性疼痛調節系に入力を送る島皮質での変化が関与することが世界で初めて示唆された。

### (3) 実験 3

Rat Tph2 遺伝子断片(もしくはスクランブル配列)を含む shRNA プラスミドをエレクトロポレーション法を用いて naive ラットの RVM に遺伝子導入を試みた。一部細胞で遺伝子の導入が確認されたが、個体差が大きく安定した導入を得ることが出来なかった。今後、市販されているエレクトロポレーターを用い新計画にて実験を継続する予定である。

## 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 5 件)

Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y : Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. *Neuroscience* 259:1-11, 2014. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.11.045. 査読有り

Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y : Effects of restraint stress on glial activity in the rostral ventromedial medulla. *Neuroscience*. 241:10-21. 2013. doi: 10.1016/j.neuroscience.2013.03.008. 査読有り

井辺弘樹, 仙波恵美子 : 下行性疼痛促進系. *ペインクリニック*. 34(8): 1069-1077, 2013. 査読なし

Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y : Chronic restraint stress decreases glial fibrillary acidic protein and glutamate transporter in the periaqueductal gray matter. *Neuroscience* 223: 209-218, 2012. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.08.007. 査読有り

井辺弘樹、仙波恵美子：下行性制御機構：下行性疼痛制御機構におけるセロトニンの役割 Bone Joint Nerve. 2(2): 223-229, 2012. 査読なし

〔学会発表〕(計 9 件)

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：繰り返し強制水泳ストレスはCFA注射後の熱刺激に対する痛覚過敏を増強し、島皮質におけるpCREBやc-Fos発現に影響を及ぼす第91回日本生理学会大会、2014年3月16-18日、鹿児島

Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y: Chronic restraint stress decreases glial fibrillary acidic protein and glutamate transporter in the periaqueductal gray matter. 43th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 9-13, 2013, San Diego, USA.

井辺弘樹：慢性拘束ストレス後の中脳中心灰白質におけるGFAPおよびglutamate transporterの減少 第35回日本疼痛学会、2013年7月12-13日、さいたま市

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：吻側延髄腹内側部のグリア活性に対する拘束ストレスの影響 第90回日本生理学会大会、2013年3月27-29日、東京

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：吻側延髄腹内側部のグリア活性における拘束ストレスの影響 第106回近畿生理学談話会、2013年11月2日、橿原市

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：慢性拘束ストレスによる中脳中心灰白質におけるGFAPおよびグルタメートトランスポーターの減少 第35回日本神経科学大会、2012年9月18-21日、名古屋

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：慢性拘束ストレス後の中脳中心灰白質におけるGFAPおよびglutamate transporterの減少 第105回近畿生理学談話会、2012年9月29日、守口

Imbe H, Kimura A, Donishi T, Kaneoke Y: Chronic restraint stress decreases glial fibrillary acidic protein in the periaqueductal gray. 41th Annual Meeting of the Society for Neuroscience, Nov. 12-16, 2011, Washington DC, USA

井辺弘樹、木村晃久、堂西倫弘、金桶吉起：慢性拘束ストレス後の下行性疼痛調節系

におけるGFAPの減少 第104回近畿生理学談話会、2011年10月1日、大阪

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等  
[http://www.wakayama-med.ac.jp/med/physiology1/Dept\\_of\\_Physiology,\\_Wakayama\\_Medical\\_University/jiao\\_shi\\_shao\\_jie.html](http://www.wakayama-med.ac.jp/med/physiology1/Dept_of_Physiology,_Wakayama_Medical_University/jiao_shi_shao_jie.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

井辺 弘樹 (IMBE HIROKI)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：60326353

### (2) 研究分担者

木村 晃久 (KIMURA AKIHISA)  
和歌山県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号：20225022