

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590721

研究課題名(和文) 幼若期ドーパミン神経系傷害が成熟後の痛覚機構におよぼす影響に関する研究

研究課題名(英文) Effects of neonatal dopamine depletion on pain mechanism in the adulthood

研究代表者

緒形 雅則 (Ogata, Masanori)

北里大学・医療衛生学部・講師

研究者番号：20194425

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：幼若期ドーパミン神経傷害が成熟後の痛覚機構におよぼす影響を行動学的、組織学的手法を用いて調べた。また痛みを伴わない情動行動への影響も検討をした。行動解析では痛覚過敏行動が化学物質による持続痛に対して特異的に観察された。またこの痛覚過敏は、幼若期ドーパミン神経系傷害に伴う自発運動量の増加を抑える作用を持つメタンフェタミンの投与でも抑制されなかった。組織学的解析では化学的刺激に伴う脊髄後角神経細胞の興奮の延長が示唆された。情動行動においても複数の行動試験で、不安関連行動の減少が観察された。以上の結果より幼若期DA神経系傷害は痛覚並びに情動行動発現機構の発達に影響を与えることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify effects of neonatal dopamine depletion on somatosensory nociceptive response and emotional response in the adulthood using behavioral and histological methods. The rats with neonatal dopamine depletion exhibited behavioral hyperalgesic response to chemical stimulation, but not mechanical and thermal stimulation. The behavioral hyperalgesic response associated with long lasting neuronal hyperactivities in the spinal neuron. Treatment of methamphetamine, which ameliorates motor hyperactivity induced by neonatal dopamine depletion, did not reverse the hyperalgesic response to chemical stimulation. Decreases of anxiety-related behavior in the rats with neonatal dopamine depletion were also observed in some behavioral tests.

These results suggest that dopaminergic neural system play a crucial part in development of mechanism for exhibiting normal nociceptive and anxiety-related behavior.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：神経科学 脳・神経 疼痛 ドーパミン神経系 神経系機能発達

1. 研究開始当初の背景

ドーパミン神経系と痛覚・鎮痛系との関連は、以前より報告されているが、その詳細は不明な点が多い。最近、脊髄からの痛覚情報が入力する橋・結合腕傍核と中脳ドーパミン細胞との直接連絡が報告された。ドーパミン神経系の変性・脱落を主要因とするパーキンソン病患者では、その62%が体性感覚異常を訴えている。ラットを用いた基礎的実験でも、中脳ドーパミン神経細胞の破壊により痛覚過敏が誘発されることが報告されている。しかし、これら臨床的、基礎的報告は、成熟後にドーパミン神経系が脱落した際の報告であり、幼若期に傷害されたものではない。ドーパミン神経系は、幼若期の低酸素や母子分離などの各種ストレスの影響を受けやすいことが最近報告されている。一方で、幼若期のドーパミン神経系の脱落にともない、ドーパミン神経系の投射先である線条体でのセロトニン量の増加や黒質緻密部での抑制性神経系であるGABA受容体の感受性変化が報告されており、ドーパミン神経系の幼若期脱落が他の神経系の発達に影響をおよぼしている可能性が示唆される。さらに、ドーパミン神経系はその傷害を受ける時期により個体行動におよぼす影響が異なる。成熟後のドーパミン神経系の傷害は運動量の減少を引き起こすが、幼若期の傷害は個体の成長にともない青年期には多動を示し、また成熟後はドーパミン系薬剤刺激により自傷行動が誘発される。自傷行動は、発達障害児にみられる症状の一つであるが、神経因性慢性痛症モデル動物でも観察され、痛みとの関連も深い。このような背景の下、私は幼若期に様々なストレスを受けたことによるドーパミン神経系の変調・傷害が、成熟後の痛覚機構に変化を及ぼしている可能性があると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、幼若期ドーパミン神経系傷害の成熟後における痛覚機構への影響を行動学的解析並びに組織学的解析により解明することを目的とする。さらに痛覚機構は情動系とも強く関連しており、ドーパミン神経系、セロトニン神経系とも不安・情動系との関与が知られていることから、不安行動に対する幼若期ドーパミン神経系傷害の影響も併せて検討する。

3. 研究の方法

(1) 幼若期ドーパミン神経系傷害動物の作製

冷却麻酔下にて、小型頭部定位固定装置を用い生後5日目の雄ラットの両側の側脳室に6-hydroxydopamine (6-OHDA) を片側に50 μ g/5 μ l 注入し、ドーパミン神経系を傷害した。また6-OHDAの毒性からノルアドレナリン神経系を保護する目的で、腹腔内に塩酸デジプラミン(25mg/kg)を6-OHDA注入30分前に投与した。全処置終了後、麻酔回復までの時間は体温維持システム下で動物を管理し

た後に、母ラットケージ内に処置仔ラットを戻した。また同腹の仔ラットを用いて無処置群(NT群)、vehicle(0.1%アスコルビン酸含有生理食塩水)処置群(Vehicle群)も作製した。

(2) 行動学的解析

験者の動物への接触による行動試験結果への影響を減ずるために、生後8週目より動物に対しハンドリングを行った。動物は行動試験開始20分以上前に飼育部屋から行動解析室へ移動し、環境に適應させた後に以下の行動試験を行った。

ホルマリン試験

各処置動物の右後肢足底に5%ホルマリンを50 μ l 注入し、速やかに行動観察箱に戻した。その後75分間ビデオカメラで行動を撮影するとともに、痛み行動をスコア化した。スコア化の基準は野田らの報告(Brain Res., 2003)に準じて行った。また、ドーパミン作動薬の効果を調べる実験では、ホルマリン注入15分前にメタンフェタミン(MAP; 1mg/kg, 2mg/kg, 4mg/kg)を腹腔内に投与し、ホルマリンによる痛みスコアへの影響を調べた。また痛みスコアをホルマリン注入0分から5分(Phase 1)、6分から15分(Interphase)、16分から50分(E-Phase 2)、51分から75分(L-Phase 2)に分類し、幼若期ドーパミン神経系傷害がおよぼす影響を比較、検討した。

オープンフィールド試験

各処置動物を白色オープンフィールド用行動観察箱(100cm \times 100cm \times 50cm)に移動し、30分間の自発運動をCCDカメラで記録するとともに、コンピュータ解析を行い、移動距離、観察箱内の滞在位置とそこでの滞在時間との関連を解析した。

明暗箱試験

中央が通路で繋がっている白色と黒色の観察箱(各々30cm \times 30cm \times 30cm)を用いて15分間の自発行動様式を赤外線センサーと行動解析システムを用いて解析した。

高架式十字迷路試験

床からの高さが50cmの十字状の通路(90cm \times 90cm、一方の通路には高さ40cmの壁が装着されている)に各処置動物を5分間置き、自由行動をさせ、壁のある領域(Closed arm)と無い領域(Open arm)の滞在時間、Open armへの侵入回数、通路の下を覗き込む(Head dips)回数等を測定した。

(3) 組織学的解析

灌流固定および凍結切片の作成

行動実験終了後、25%ウレタンをラットの腹腔内に投与し、深麻酔下にて灌流固定を行った。初めにヘパリン入り生理食塩水200ml、続いて4%パラホルムアルデヒドを含むリン

酸緩衝液(pH7.4) 400ml を経心的に灌流し、組織の固定を行った。断頭後、脳と脊髄を摘出し、前記と同様の固定液を用いて4日間、後固定を行った。その後30%スクロース液に置き換え、脳が沈むまで浸した。c-Fos免疫陽性細胞数の解析実験では、ホルマリン注入または高架式十字迷路試験開始、2時間あるいは4時間後に前記の灌流操作を行った。

灌流固定後の脳並びに脊髄を用いミクロトームにより厚さ40 μ mの凍結切片を作成し免疫組織化学染色に用いた。

免疫組織化学染色

チロシン水酸化酵素(TH)に対する抗体を用いて、ドーパミン神経系並びにノルアドレナリン神経系の傷害を確認した。0.1Mリン酸緩衝液ナトリウム溶液(PBS)を用い、切片を洗浄後、0.3% H₂O₂溶液により内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害を行った。4%正常ウマ血清と0.25% Triton-Xを含む0.1M PBSを用い室温で1時間反応させ、非特異的な反応を阻害した。2%正常ウマ血清、0.1% Triton-X、モノクローナルTH抗体(MILLIPORE, 1:2000)を含む0.1M PBSを用い、4日間24時間、一次抗体反応を行った。ビオチン標識されたAnti-mouse IgG (Vector, 1:200)、2%正常ウマ血清、0.1% Triton-Xを含む0.1M PBSを用い、室温で1時間、二次抗体反応を行った。その後、アビジン ビオチンコンプレックス複合体溶液(Vector)を用い、室温で1時間反応させ増感反応を行った。0.1M PBSで洗浄後、0.05% ジアミノベンチジンとH₂O₂の混合溶液で発色反応させ、TH陽性細胞を可視化させた。また細胞の興奮性の指標としてc-Fosを用いてその抗体により免疫組織染色を行った。一次抗体にはポリクローナルc-Fos抗体(Santa Cruz Biotechnology 1:2000)を用い、正常血清として正常ヤギ血清を使用した。二次抗体にはAnti-Rabbit IgG (Vector, 1:200)を用い、その他の操作はTH抗体による染色法と同様に行った。

c-Fos 免疫反応陽性(c-Fos 陽性)細胞数の計測

脊髄後角におけるc-Fos陽性細胞数の算出は、各個体からの120 μ m間隔の連続切片を用い行った。最初に40倍の光学顕微鏡下にて第5腰髄(L5)分節を選び、さらに染色性の良いものを10切片選出した。その後、選出した10切片のc-Fos陽性細胞数の算出を100倍の光学顕微鏡下にて画像解析ソフト(cellsense Dimension, Olympus)を用いて行った。得られた10切片のc-Fos陽性細胞数の多いもの4切片を用い、平均を求め各個体のc-Fos陽性細胞数とした。また脊髄後角を表層部分のI-II層と深層部分のV-VI層に分けてc-Fos陽性細胞数の検討を行った。

背側縫線核におけるc-Fos陽性細胞数の算出は、各個体から得られた160 μ m間隔の連続切片より背側縫線核を含む3つの切片

(Bregumaから尾側へ7.08 mm, 7.68 mm, 8.04 mm)を40倍の光学顕微鏡下で選出し、その後、脊髄と同様に100倍の光学顕微鏡下でc-Fos陽性細胞数を算出した。

(4)統計学的解析

各実験結果の数値は平均 \pm 標準誤差で示した。統計解析はGraphPad Prism6.0 windows版(GraphPad, USA)を用い、棄却率を5%未満として行った。2群間の平均に対する比較には、スチューデントのt検定を用いた。3群間の平均の比較には、分散分析解析を用いた。その後の多重比較にはTukey'sテストまたはBonferroni'sテストを用いた。

4. 研究成果

(1)本研究により得られた主な実験結果

TH抗体を用いた免疫組織化学染色によるドーパミン神経系傷害の確認

図1に示すように、幼若期の6-OHDAと塩酸デジプラミンの処置により、中脳の黒質と腹側被蓋野のTH陽性細胞はほぼ保護完全に消失していた。一方、橋の青斑核ではNT群、Vehicle群、6-OHDA群で、TH免疫陽性反応に違いはみられなかった。このことは、本研究で作製した6-OHDA処置動物はドーパミン神経系が特異的に傷害されており、ノルアドレナリン神経系は6-OHDA処置の影響を受けていないことを示している。

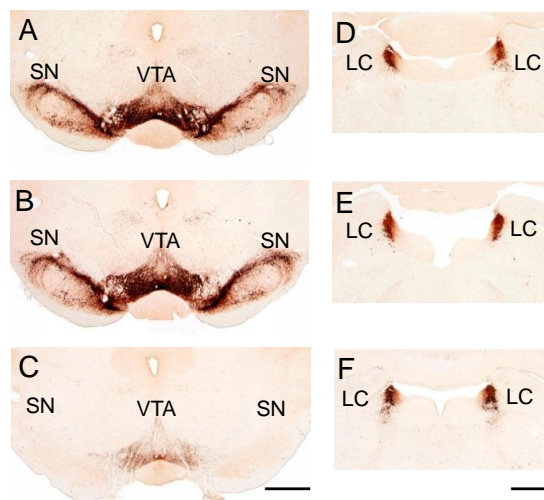


図1 TH免疫組織化学染色の典型例

AとDはNT群、BとEはVehicle群、CとFは6-OHDA群を示している。SNは黒質、VTAは腹側被蓋野、LCは青斑核を示す。下段のスケールバーは1000 μ mである。

ホルマリン誘発性疼痛に対する反応性の行動学的並びに組織学的解析

化学物質による炎症性持続痛に対する幼若期ドーパミン神経系傷害の影響をホルマリン試験を用いて検討した。その行動解析結果から、6-OHDA群はVehicle群に比べ、ホル

ホルマリン誘発性の痛み反応が多いことが明らかとなった。図2はホルマリン注入後の痛み行動反応の経時変化を示している。6-OHDA群ではホルマリン注入6分後から15分後のInterphase並びに51分後から75分後のL-Phase 2で痛みスコアの有意な増加がみられた。

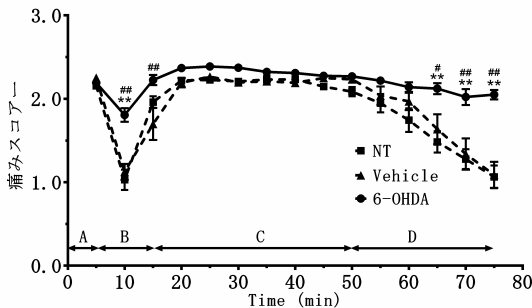


図2 ホルマリン試験

AはPhase1、BはInterphase、CはE-Phase2、DはL-Phase2を示す。*はNT群と#はVehicle群と比較した際に、有意な差がみられたことを示している。*: $p<0.05$, **と##: $p<0.01$ 。

次に、本研究でNT群とVehicle群に対して鎮痛効果が認められており、さらに他の研究報告により幼若期ドーパミン神経系傷害に伴う多動を鎮静化する効果があることが既に示されているMAPの痛覚過敏反応に対する効果を検討した(図3)。その結果、6-OHDA群にみられたホルマリン誘発性の持続痛に対する痛覚過敏反応は、1mg/kgから4mg/kgのMAP腹腔内投与により抑制されなかった。

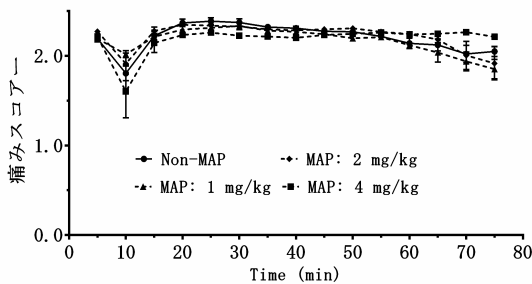


図3 6-OHDA群におけるホルマリン試験に対するMAPの効果

脊髄後角における痛み関連神経細胞の興奮性をホルマリン注入によるc-Fos陽性細胞数を指標として組織学的に解析をした。その脊髄後角表層における結果を表1に示す。ホルマリン注入2時間後ではVehicle群と比較し、6-OHDA群に有意な差は認められなかったが、4時間後では6-OHDA群で有意にc-Fos陽性細胞が多く確認された。また脊髄後角深層部でも同様に4時間後に6-OHDA群でc-Fos陽性細胞数の増加が観察された。

表1 脊髄後角表層におけるc-Fos陽性細胞数

	2時間後	4時間後
Vehicle群	45.8±6.3	16.7±3.2
6-OHDA群	56.4±8.0	31.7±4.7

オープンフィールド試験に対する影響

新規環境下に対する適応能力並びに不安関連行動への6-OHDA処置の影響をオープンフィールド試験にて検討した。その結果、6-OHDA群の30分間における自発運動量はVehicle群に比べ約38%の増加を示した。また、不安関連行動の減少の指標である行動観察箱内の中心部領域に滞在する時間が、6-OHDA群ではVehicle群の約4.3倍に増加していた。

明暗箱試験に対する影響

げっ歯類が生まれつき暗所を好む性質を利用して明箱と暗箱が繋がった行動観察箱内での各箱の滞在時間、運動量を検討した。その結果Vehicle群、6-OHDA群ともに暗所を好む傾向に差は認められなかった。しかし暗箱内での運動量は6-OHDA群で有意な低下が認められた($p<0.01$)。

高架式十字迷路試験を用いた行動学的並びに組織学的解析

高所における不安に対する反応を高架式十字迷路により検討した。その行動解析の結果、図4に示すように6-OHDA群はVehicle群に比べOpen armに侵入する回数、Open armから床を覗き込む回数の有意な増加が認められた($p<0.01$)。さらに高架式十字迷路試験に伴う中脳背側縫線核内の興奮性をc-Fos陽性細胞数を指標にして検討した。その結果c-Fos陽性細胞数は、Vehicle群では22.3±9.4、6-OHDA群では59.5±7.1であり、6-OHDA群で有意に多く認められた($p<0.05$)。

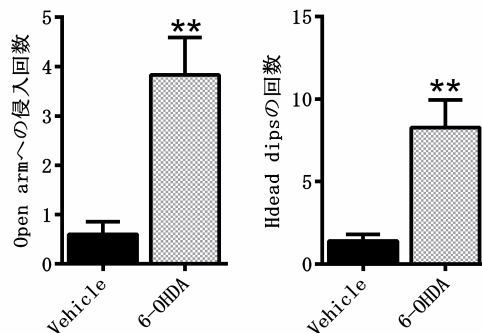


図4 高架式十字迷路試験

(2) 本研究成果の国内外における位置づけ

今回の結果並びに私達の以前の報告から、幼若期ドーパミン神経系傷害は、熱、機械刺激による痛覚閾値に影響を与えないが、持続痛に対する過敏行動を引き起こすことが明らかとなった。さらにその持続痛に対する痛覚過敏行動は、脊髄における痛み関連神経細胞

胞の異常興奮をとまなっていることも解明された。そしてこれら痛覚系における異常の機序は、幼若期ドーパミン神経系傷害によって現れる青年期の多動の発現機序とは異なることが示唆された。成熟後のドーパミン神経系傷害の痛覚機構への影響に関する報告は既にされていたが、幼若期ドーパミン神経系傷害の成熟後の痛覚機構への影響を報告した研究は、国内外でも本研究が初めてである。さらに今回観察された幼若期ドーパミン神経系傷害に伴う痛覚異常が、持続痛にのみ認められたことは、成熟後にドーパミン神経系を傷害した場合と異なる点である。

さらに今回、幼若期ドーパミン神経系傷害が痛みを伴わない不安関連行動にも影響を与えることをオープンフィールド試験と高架式十字迷路を用いて明らかにした。幼若期ドーパミン神経系傷害動物に対する記憶や認知機能を対象とした行動実験による報告はあるが、上記の2つの行動課題によるものは本研究が初めてである。さらに組織学解析により不安関連行動の異常の背景にセロトニン神経系である背側縫線核の神経細胞の異常興奮が関与していることを示した。最近、高架式十字迷路試験により背側縫線核の細胞が興奮することが報告されており、本研究成果はその結果を支持するものでもある。

(3)今後の展望

本研究成果により幼若期ドーパミン神経系傷害が成熟後の痛覚、不安関連行動に影響を与えることは明確となった。しかしその機序の解明には更なる研究が必要である。組織学的解析や電気生理学的解析により異常が認められた神経領域の細胞分子レベルでの解析や異常神経回路網の同定が必要といえる。またその成果は、本異常行動の薬剤処置による正常化を可能にするものでもある。本研究結果より、幼若期のドーパミン神経系傷害は成熟後における持続的な外界からのストレスに対する異常反応を誘発することが示された。よって本モデル動物は持続的な体性感覚刺激の一つである痒み刺激に対する研究でも有用であると考えられる。本研究の遂行による今後のさらなる成果は、ストレスに対する脆弱性を持つ各種疾患の機序解明並びに治療法開発の一助にもなりうる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計4件)

緒形雅則、幼若期ドーパミン神経系傷害は成熟後の不安関連行動の減少をもたらす、第91回日本生理学会大会、2014/03/18、鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)

緒形雅則、幼若期ドーパミン神経系傷害ラットの成熟後における機械、熱、化学刺激に対する侵害受容性行動反応、第90回日本生理学会大会、2013/03/28、タワーホール

船堀(東京都江戸川区)

Ogata Masanori, Neonatal dopamine depletion-induced hyperalgesia in the adulthood was not reversed by methamphetamine. 第14回国際疼痛学会、2012/08/30、ミラノコンベンショナルセンター(イタリア、ミラノ)

Ogata Masanori, Reduced anxiety-related behavior in the adulthood of rat with neonatal dopamine depletion. 北米神経科学会、2011/11/13、ワシントンコンベンショナルセンター(米国、ワシントンDC)

6. 研究組織

(1)研究代表者

緒形 雅則 (OGATA, Masanori)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 20194425

(2)研究分担者

秋田 久直 (AKITA, Hisanao)
北里大学・医療衛生学部・准教授
研究者番号: 70118777

野田 和子 (NODA, Kazuko)
北里大学・医療衛生学部・講師
研究者番号: 60050704