

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32676

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293346

研究課題名(和文)慢性疼痛発現における脳内報酬・快樂ネットワーク異常応答の解明

研究課題名(英文)Analysis of the dysregulation of the brain reward system induced by chronic pain

研究代表者

成田 年(Narita, Minoru)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：40318613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 9,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛およびがん性疼痛下において、電気生理学的手法により中脳辺縁ドパミン神経の神経活動が著しく低下していることを明らかにした。このような条件下、光遺伝学的手法ならびに薬理遺伝学的手法を駆使した中脳辺縁ドパミン神経系の特異的活性化制御により一過性の除痛効果が得られた。一方、中脳辺縁ドパミン神経の投射先である側坐核領域において、神経障害性疼痛下でmiR-200b/429の発現低下を伴ったDnmt3aの発現増加が引き起こされていることを明らかにした。さらに、この側坐核領域において、DNAメチル化の亢進を伴ったPde10a遺伝子の著しい発現低下が引き起こされていることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In this research, we first clarified that the intrinsic neuronal excitability of ventral tegmental area (VTA) dopaminergic neurons projecting to the nucleus accumbens (N.Acc.) was significantly reduced in neuropathic pain- and cancer pain-model mice using patch clamp electrophysiology. Under these conditions, we found that phasic activation of mesolimbic dopaminergic neurons produced a significant but transient anti-allodynic effect in these mice using optogenetics or designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) technology. On the other hand, we revealed that the expression of Dnmt3a was significantly increased along with the downregulation of miR-200b/429 expression in the N.Acc. under the neuropathic pain condition. Furthermore, we found that a significant decrease in Pde10a expression in the N.Acc. was caused by an increase in the level of DNA methylation at the Pde10a promoter.

研究分野：麻酔科学

キーワード：中脳辺縁ドパミン神経 疼痛制御 モルヒネ エピジェネティクス オプトジェネティクス DREADD

1. 研究開始当初の背景

痛みは、生体防御機構において重要な役割を担う反面、不快情動であることから、快情動に対して負の相関を示すことが知られている。一方、これまでに、「快樂ネットワーク」として中心的な役割を担う中脳辺縁ドーパミン神経が、「鎮痛」を施すことにより活性化されることが示されている (Navratilova and Porreca, *Nat Neurosci*, 2014)。こうした背景から、近年、古典的な痛みの中枢回路に加え、腹側被蓋野から側坐核へ投射する快樂ネットワークと痛みの関係が注目されている。我々は、長年に渡り、この「快樂ネットワーク」の生体における多彩な生理機構を研究している。その成果の一つとして、激しい痛みが生じている場合、この快樂ネットワークに異常が起き、その影響からモルヒネによる欲求効果が著しく低下する。これが、いわゆる「がん疼痛などの強い痛みがあるときには、モルヒネ依存はそれほど問題とならない」という科学的根拠となり、世界の緩和医療の発展に寄与する足がかりとなった (Niikura et al., *Trends Pharmacol Sci*, 2010)。さらには、急性痛モデル動物を作製し、functional MRI 法に従って、疼痛応答による脳神経系の反応性の評価を行ったところ (Taketa et al., *Anesthesiology*, 2010)、痛み刺激により、側坐核領域および腹側被蓋野領域においても、一過性の反応の亢進が認められることを明らかとした。一方、坐骨神経を結紮した神経障害性疼痛モデルマウスを用い、側坐核内の神経活性変化について検討したところ、結紮群において神経活性の低下が認められ、また、腹側被蓋野刺激による側坐核領域におけるドーパミン遊離量の著明な低下も認められた。実際に、臨床においても、慢性腰痛症患者の側坐核領域における神経活動の著しい低下が、痛覚伝達に大きく寄与していることが報告されている (Baliki et al., *Neuron*, 2010)。また、女性において estrogen 分泌が低い時期に痛みに対して脆弱となるが、これもまた側坐核の神経活動の低下に起因している可能性が示唆されている (Smith et al., *J Neurosci*, 2006)。このような背景から、痛みの慢性化への移行には、中脳辺縁ドーパミン神経系の投射先である側坐核領域の機能低下がその原因となっている可能性が考えられる。そこで、本研究では、痛みによる「快樂ネットワーク」の異常応答の詳細な解明を試み、さらには機能低下している「快樂ネットワーク」のリセット機構を明らかにすることを試みた。

2. 研究の目的

これまでに、痛みの慢性化と脳内報酬系の機能異常との関連性に関しては、様々な研究により示唆されてきているが、実際に、慢性疼痛下における中脳辺縁ドーパミン神経と側坐核の神経細胞を中心とした快樂ネットワークの細胞変容と痛みの難治化との関連性について直接的なエビデンスを示す研究は、

ほとんどない。そこで本研究では、光遺伝学的手法や薬理遺伝学的手法を駆使し、さらにはエピジェネティクス網羅解析、miRNA 発現解析などの多角的なアプローチにより、慢性痛の発生・維持と、脳内報酬・快樂ネットワークの変容の相関因果解析を行うことを目的とした。本研究により、痛みによる側坐核内の“エピジェネティクス修飾”変化と“痛み発現”の時間的相関が得られ、また痛みによる側坐核内環境変化のリセット治療法 (エピジェネティクス医薬治療、運動治療など) を提示できるものと予想される。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスおよび骨がん性疼痛モデルマウスの作製

神経障害性疼痛モデルマウスは、右後肢坐骨神経を結紮することで作製した。骨がん性疼痛モデルマウスは、マウス骨肉腫細胞株である AXT 細胞を、マウスの右大腿骨髄腔内に細胞移植することにより作製した。これらのマウスは、足底熱刺激法および von Frey ファイラメント法により、痛覚閾値の低下が引き起こされていることを確認した。

(2) 電気生理学的手法による中脳辺縁ドーパミン神経の細胞活動記録

神経障害性疼痛モデルマウスおよび骨がん性疼痛モデルマウスより、腹側被蓋野領域を含む急性脳スライス切片を作製し、標準人工脳脊髄液の灌流条件下で、current clamp 法により細胞記録の測定を行った。側坐核へ投射している腹側被蓋野神経細胞から記録するために、逆行性蛍光トレーサーである DiI を側坐核に微量注入したマウスを使用し、DiI 陽性細胞から細胞記録後、記録細胞が tyrosine hydroxylase (TH) 陽性ドーパミン神経細胞であることを免疫染色により確認した。

(3) 中脳辺縁ドーパミン神経の特異的かつ人為的な活動操作が可能な遺伝子改変マウスの作製

① 薬理遺伝学的手法の応用による腹側被蓋野ドーパミン神経の特異的細胞活動操作

薬理遺伝学的手法の一種である designer receptors exclusively activated by designer drugs (DREADD) 法を応用し、腹側被蓋野ドーパミン神経の特異的活性化を試みた。Cre 存在下においてのみ遺伝子改変型ムスカリン M3 受容体 (hM3Dq) を発現させることの可能なアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクターを TH-Cre マウスの腹側被蓋野領域に微量注入することで、腹側被蓋野ドーパミン神経特異的に hM3Dq を発現させた遺伝子改変マウスを作製した。痛覚閾値の測定を行う際に、hM3Dq の特異的リガンドである clozapine N-oxide (CNO) を腹腔内投与することで、腹側被蓋野ドーパミン神経の特異的活性化を行った。

②光遺伝学的手法の応用による中脳辺縁ドーパミン神経の特異的細胞活動操作

Cre 存在下においてのみ光感受性陽イオンチャネルである channelrhodopsin-2 (ChR2) を発現させることの可能な AAV ベクターを TH-Cre マウスの腹側被蓋野領域に微量注入することで、腹側被蓋野ドーパミン神経特異的に ChR2 を発現させた遺伝子改変マウスを作製した。このマウスに対し、中脳辺縁ドーパミン神経が投射する側坐核領域に光ファイバーを留置させた。このような条件下、痛覚閾値の測定を行う際に、特定波長の光 (473nm, 20Hz) を側坐核領域に局所照射することで、中脳辺縁ドーパミン神経の投射経路特異的な活性化を行った。

(3) 側坐核領域における miRNA の網羅的発現変動解析

マウスの側坐核組織サンプルから RNA を抽出し、miRNA マイクロアレイにより 384 種類の miRNA について網羅的な発現解析を行った。個々の miRNA に対する定量解析は、TaqMan[®] microRNA assays による qPCR により解析を行った。

(4) レンチウイルスベクターを用いた miRNA の脳内過剰発現方法

miR-200b および miR-429 をそれぞれ過剰発現させることの可能なレンチウイルスベクターをマウスの側坐核領域に微量注入し、側坐核特異的に miR-200b および miR-429 を過剰発現させた。このような条件下、マウスの坐骨神経を結紮し、疼痛閾値の変化について解析を行った。

(5) miRNA の標的遺伝子の抽出ならびに 3'-UTR レポーターアッセイ

3 種類の miRNA 標的遺伝子検索データベースを利用し、miR-200b と miR-429 の共通となる標的遺伝子の抽出を行った。さらに、抽出した遺伝子が、miR-200b および miR-429 により直接発現制御を受けるか否かについて検討を行う目的で、3'-UTR レポーターアッセイを行った。3'-UTR レポーターアッセイは、標的遺伝子の 3'-UTR 配列をルシフェラーゼ遺伝子がコードされたレポーターベクターに挿入し、pre-miR-200b および pre-miR-429 と同時にトランスフェクションすることで、発光強度の減弱を指標に定量を行った。

(6) 側坐核領域における DNA メチル化解析

マウスの側坐核組織サンプルから DNA を抽出し、methyl-CpG-binding domain 2 (MBD2)-seq により、DNA メチル化の網羅的解析を行った。一方、マウスの側坐核組織サンプルから RNA を抽出し、mouse exon microarray により、mRNA の網羅的発現解析を行った。これらの結果を基に相関解析を行い、神経障害性疼痛下の側坐核領域における

DNA メチル化を伴った発現低下が認められる遺伝子の抽出を行った。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛下およびがん性疼痛下における中脳辺縁ドーパミン神経の細胞活動記録

坐骨神経結紮 7 日後の神経障害性疼痛モデルマウスを用いて、中脳辺縁ドーパミン神経の細胞活動の変化について電気生理学的手法により検討を行ったところ、中脳辺縁ドーパミン神経における spike number の有意な減少が認められた。また、骨肉腫細胞の細胞移植 7 日後の骨がん性疼痛モデルマウスについても同様に検討を行ったところ、中脳辺縁ドーパミン神経における spike number の有意な減少が認められた。

(2) 神経障害性疼痛下およびがん性疼痛下において中脳辺縁ドーパミン神経を人為的かつ特異的に活性化させた際の痛覚閾値への影響

まず、薬理遺伝学的手法および光遺伝学的手法を応用し、中脳辺縁ドーパミン神経の特異的細胞活動操作による神経障害性疼痛に対する除痛効果の有無について検討を行った。その結果、中脳辺縁ドーパミン神経の phasic 刺激による特異的活性化により、一過性の除痛効果が認められた。また、骨がん性疼痛モデルマウスを用い、中脳辺縁ドーパミン神経の特異的細胞活動操作によるがん性疼痛に対する除痛効果の有無について、同様の手法により検討を行った。その結果、同様に、中脳辺縁ドーパミン神経の phasic 刺激による特異的活性化により、一過性の除痛効果が認められた。

(3) 神経障害性疼痛下の側坐核領域における miRNA の発現変動

中脳辺縁ドーパミン神経の投射先である側坐核領域に着目し、坐骨神経結紮 7 日後における miRNA の網羅的発現変動解析を行った。その結果、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核領域において、miR-200b および miR-429 の著明な発現低下が認められた。このような条件下、miRNA を後天的に神経細胞に遺伝子導入し、*in vivo* において行動解析を行うことにより、miR-200b/miR-429 の疼痛制御における機能・役割を検討した。我々は、miR-200b および miR-429 を強制発現させるレンチウイルスベクターを構築し、これを側坐核内に直接微量注入することで、神経障害性疼痛下で認められる miR-200b および miR-429 の発現低下をレスキューさせた。その結果、miR-200b および miR-429 を強制発現させた群において、疼痛閾値の低下の有意な改善が認められた。

(4) miR-200b/miR-429 の標的遺伝子の抽出

次に、*in silico* でのデータベース解析を基にこれら miRNA により発現制御される標

的遺伝子の探索を試みた。その結果、miR-200b および miR-429 の共通のターゲット遺伝子として、363 種類の遺伝子が候補として抽出された。その多くは、細胞形態に関わるものや、DNA メチル化を誘導する酵素、メチル化 CpG 結合蛋白質 (転写抑制蛋白質) など、長期的な遺伝子の発現抑制に関わる分子であった。その中でも、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核領域において、Dnmt3a タンパク質の発現量の著しい増加が認められた。さらに、3'UTR レポーターアッセイにより、miR-200b、miR-429 がダイレクトに Dnmt3a の発現調節を行っていることが明らかとなった。

(5) 神経障害性疼痛下の側坐核領域の DNA メチル化変動解析

神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核領域において、Dnmt3a の発現量の増加が認められたことから、DNA メチル化を伴った各種遺伝子の発現低下が引き起こされていることが予想される。そこで実際に、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核組織サンプルを用いて、MBD2-seq により DNA メチル化変動の解析を試みた。さらに、マイクロアレイにより得た mRNA 発現解析の結果との相関解析を試みたところ、転写開始点における顕著な DNA メチル化の亢進を伴った phosphodiesterase 10a (Pde10a) の遺伝子発現の有意な発現低下が引き起こされていることを見出した。

(6) 側坐核内モルヒネ活性化細胞の解析および鎮痛効果への影響

モルヒネは、既知の鎮痛発現機序に加え、中脳辺縁ドーパミン神経系の賦活により快情動を発現させることから、この中脳辺縁ドーパミン神経系の賦活に伴う側坐核領域の神経活動応答の変化が、モルヒネの pathological pain に対する除痛効果に重要な役割を担っている可能性が考えられる。そこで実際に、神経障害性疼痛モデルマウスの側坐核領域にドーパミン D1 受容体拮抗薬である SCH-23390 を微量注入したところ、モルヒネの除痛効果の有意な減弱が認められた。さらに、側坐核領域におけるモルヒネ活性化細胞の解析を試みたところ、その多くがドーパミン D1 受容体陽性中型有棘細胞様の特徴を示し、特に、Dnmt3a エンリッチな神経細胞であることを見出した。

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 78 件)

• Watanabe M, Sugiura Y, Sugiyama E, Narita M, Navratilova E, Kondo T, Uchiyama N, Yamanaka A, Kuzumaki N, Porreca F, Narita

M: Extracellular N-acetylaspartylglutamate released in the nucleus accumbens modulates the pain sensation: analysis using a microdialysis/mass spectrometry integrated system. *Mol Pain*, 14, 1-10 (2018)

• Watanabe M, Narita M, Hamada Y, Yamashita A, Tamura H, Ikegami D, Kondo T, Shinzato T, Shimizu T, Fukuchi Y, Muto A, Okano H, Yamanaka A, Tawfik VL, Kuzumaki N, Navratilova E, Porreca F, Narita M: Activation of VTA dopaminergic neurons reverses pathological allodynia resulting from nerve-injury or bone cancer. *Mol Pain*, 14, 1-10 (2018)

• Suda Y, Kuzumaki N, Sone T, Narita M, Tanaka K, Hamada Y, Iwasawa C, Shibasaki M, Maekawa A, Matsuo M, Akamatsu W, Hattori N, Okano H, Narita M: Down-regulation of ghrelin receptors on dopaminergic neurons in the substantia nigra contributes to Parkinson's disease-like motor dysfunction. *Mol Brain*, 11, 6 (2018)

• Mori T, Kuzumaki N, Arima T, Narita M, Tateishi R, Kondo T, Hamada Y, Kuwata H, Kawata M, Yamazaki M, Sugita K, Matsuzawa A, Baba K, Yamauchi T, Higashiyama K, Nonaka M, Miyano K, Uezono Y, Narita M: Usefulness for the combination of G-protein- and β -arrestin-biased ligands of μ -opioid receptors: Prevention of antinociceptive tolerance. *Mol Pain*, 13, 1-9 (2017)

• Morikawa S, Ikegaya Y, Narita M, Tamura H: Activation of perineuronal netexpressing excitatory neurons during associative memory encoding and retrieval. *Sci Rep*, 7, 46024 (2017)

• Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, Narita M: Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Mol Pain*, 12, 1744806916681567 (2016)

• Doi S, Mori T, Uzawa N, Arima T, Takahashi T, Uchida M, Yawata A, Narita M, Uezono Y, Suzuki T, Narita M: Characterization of methadone as a β -arrestin-biased μ -opioid receptor agonist. *Mol Pain*, 12, 1744806916654146 (2016)

• Koh K, Hamada A, Hamada Y, Yanase M, Sakaki M, Someya K, Narita M, Kuzumaki N, Ikegami D, Sakai H, Iseki M, Inada E, Narita M: Possible involvement of activated locus coeruleus-noradrenergic neurons in pain-related sleep disorders. *Neurosci Lett*, 589, 200-6 (2015)

• Juliandi B, Tanemura K, Igarashi K, Tominaga T, Furukawa Y, Otsuka M, Moriyama N, Ikegami D, Abematsu M, Sanosaka T, Tsujimura K, Narita M, Kanno J, Nakashima K: Reduced Adult Hippocampal Neurogenesis and Cognitive

Impairments following Prenatal Treatment of the Antiepileptic Drug Valproic Acid. Stem Cell Reports, 5, 1-14 (2015)
他、69 報 (総説を含む)

[学会発表] (計 89 件)

招待講演

・ Asian College of Neuropsychopharmacology (AsCNP) 2017, 2017 年 4 月 27-29 日, Nusa Dua Bali, Indonesia, Complex interplay between pain relief and opioid addiction: chronic pain diminishes the mesolimbic dopaminergic network, Narita M

・ IASP 16th World Congress on Pain, 2016 年 9 月 26-30 日, Yokohama, Japan, Epigenetic modifications in chronic pain syndromes, Narita M

・ 30th CINP World Congress on Neuropsychopharmacology, 2016 年 7 月 3-5 日, Seoul, Korea, Neuropathic pain negatively modulates mesolimbic dopaminergic transmission related to suppression of the analgesic potency and abuse potential of morphine, Narita M

・ IASP 15th World Congress on Pain, 2014 年 10 月 6-11 日, Buenos Aires, Argentina, Pain-induced epigenetic cell modification and significance of primary pain-control, Narita M

・ 8th IGAKUKEN International Symposium on "Pain Modulation and Opioid Functions", 2014 年 9 月 5 日, Tokyo, Japan, Chronic nociceptive stimuli suppress the mesolimbic dopaminergic transmission related to negatively controlling the abuse potential of opioids, Narita, M

他、シンポジウム 44 回、一般演題 40 回

[図書] (計 3 件)

・ Q&A でわかるがん疼痛緩和ケア, 成田 年 (分担執筆), じほう, 2014

他、2 編

[その他]

ホームページ等

<http://polaris.hoshi.ac.jp/kyoshitsu/yakuri/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成田 年 (NARITA MINORU)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40318613