

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26460702

研究課題名(和文) ストレスによる疼痛増強 - 脳内疼痛制御機構の可塑的变化 -

研究課題名(英文) Stress-induced enhancement of pain : neuroplastic changes of pain modulation system in the brain

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) 3,900,000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人や動物に痛覚過敏(疼痛反応の増強)が生じることが知られている。しかし、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、慢性ストレスは炎症性痛覚過敏を増強し、島皮質における炎症による pCREB や FosB の発現およびヒストン H3 のアセチル化を減弱することが確認された。一方、吻側延髄腹内側部では炎症によるこれら転写因子の発現およびヒストンアセチル化の増加が確認された。これら実験結果より、慢性ストレスによる痛覚過敏に島皮質の活性低下、吻側延髄腹内側部の活性増加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 human and animal produces hyperalgesia (enhancement of nociceptive reaction). However the mechanism remains unknown. In the present study we have demonstrated that the chronic stress enhances inflammatory mechanical hypersensitivity and attenuates the expression of pCREB and FosB and the acetylation of histone H3 in the insular cortex (IC). In contrast we have also demonstrated that the chronic stress enhances the expression of these transcription factors and the acetylation of histone H3 in the rostral ventromedial medulla (RVM). These results have clearly shown that hypoactivity in the IC and hyperactivity in the RVM are 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。モルヒネによる鎮痛もこの経路が重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし、下行性疼痛調節系からの入力が神経障害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、生理的条件下では疼痛を抑制する下行性疼痛調節系が、種々の特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・身体的ストレスとされている。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、吻側延髄腹内側部 (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、強制水泳ストレス後、前部島皮質に特異的に pCREB、c-Fos の増加が確認された。最近、人の fMRI を用いた画像研究において、「刺激前の前部島皮質の活動が高ければ高いほど、加えられた刺激は有痛性と判断される。」ことが示された。島皮質から下行性疼痛調節系には密な線維連絡

が存在することから、下行性疼痛調節系をコントロールする高位中枢からの入力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
- (4) 慢性ストレス後の痛覚過敏における高位中枢から下行性疼痛調節系への入力変化の影響

## 3. 研究の方法

雄性ラット 150-350g を実験に使用した。

### (1) 実験 1

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酸化酵素 (TPH) 遺伝子発現の抑制を試みた。

### (2) 実験 2

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、シナプス関連タンパク質 (PSD-95) の量を測定し、コントロール群と比較した。

### (3) 実験 3

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 ℓ 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

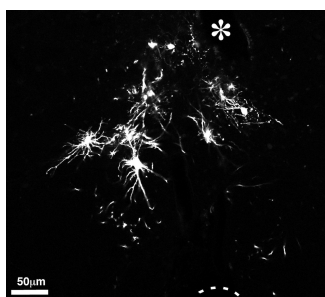
強制水泳ストレス(第 1 日 10min, 第 2-3 日 20min) を負荷した後、足底に CFA 注射を行った。

上記、動物群において、吻側延髄腹内側部 (RVM) と青斑核 (LC) として、それらの活動を制御する大脳皮質 (島皮質、前帯状皮質) で、p-CREB、FosB、アセチル化 histone H3 の発現を免疫組織学的に調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験 1

Rat Tph2 遺伝子断片を含む shRNA プラスミドをエレクトロポレーション法を用いて naïve 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。



吻側延髄腹内側部 (RVM) への遺伝子導入例 : shRNA プラスミドには GFP 遺伝子が含まれており、神経細胞に導入されると蛍光顕微鏡にて観察可能となる。\* は shRNA プラスミドの脳内微量注入部位を示す。

しかし、遺伝子導入の成功率は 60% 程度であった。遺伝子導入専用のエレクトロポレーターを用いると、成功率は 90-100% になることが、デモ機の使用で明らかとなったため、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予定である。

##### (2) 実験 2

慢性拘束ストレス後、痛覚過敏を生じたラットの RVM において、PSD-95 の発現が増加する傾向が認められたが、有意差にはいかなかった。今後、遺伝子転写調節関連タンパ

ク質を中心に新計画にて実験を継続予定である。

##### (3) 実験 3

慢性ストレス後、下行性疼痛調節系の活動をコントロールする高位中枢の検討から「強制水泳ストレスは CFA 後の機械刺激に対する感覚過敏を増強し、島皮質における CFA による pCREB や delta-FosB の発現およびヒストン H3 のアセチル化を減弱する。」というデータを得た。この結果は、第 92 回日本生理学会大会 (2015 神戸)、第 38 回日本疼痛学会 (2016 札幌)、第 16 回世界疼痛学会 (2016 横浜) において発表し、論文 (Imbe et al. *Neuroscience*. 301:12-25, 2015) として掲載された。さらに、「強制水泳ストレスは吻側延髄腹内側部における pCREB や delta-FosB の発現およびヒストン H3 のアセチル化を増加する。」ということを見いだした。この結果は、論文 (Imbe et al. *Brain Res Bull.* 127:11-22, 2016) として掲載された。また、講演の依頼があり、これら研究成果を参考にして下行性疼痛調節系について招待講演 (第 7 回日本運動器疼痛学会、宇部市 : 第 45 回日本脊椎脊髄病学会、千葉市) を行った。そして、和文総説 2 編 (井辺ら、*日本運動器疼痛学会誌*. 7:7-14, 2015 ; *ペインクリニック*. 36:601-607, 2015) をまとめた。

#### 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 4 件)

Imbe H, Kimura A : Repeated forced swim stress affects the expression of pCREB and FosB and the acetylation of histone H3 in the rostral ventromedial medulla and locus coeruleus. *Brain Res Bull.* 127:11-22. 2016. doi: 10.1016/j.brainresbull.2016.08.007. 査読有り

Imbe H, Kimura A : Repeated forced swim stress prior to complete Freund's adjuvant injection enhances mechanical hyperalgesia and attenuates the expression of pCREB and FosB and the acetylation of histone H3 in the insular cortex of rat. *Neuroscience*. 301:12-25. 2015. doi:10.1016/j.neuroscience.2015.05.065. 査読有り

井辺弘樹、木村晃久 : ストレスによる下行性疼痛調節系の機能変化. *日本運動器疼痛学会誌*. 7:7-14, 2015.

査読有り

井辺弘樹、木村晃久：下行性痛覚抑制系機能に及ぼすストレスの影響．ペインクリニック．36:601-607．2015．査読なし

〔学会発表〕(計 10 件)

井辺弘樹、木村晃久：繰り返し強制水泳ストレスは炎症性感覚過敏を増強し、吻側延髄腹内側部や青斑核における最初期遺伝子の発現および histone H3 アセチル化に影響を及ぼす 第 109 回近畿生理学談話会、2016 年 11 月 5 日、大阪市

IMBE H, KIMURA A：Repeated forced swim stress enhances CFA evoked hyperalgesia and affects the expression of transcription factor and the acetylation of histone H3 in the insular cortex. 16th World congress on pain. Sep. 26-30, 2016. Yokohama. Japan

井辺弘樹、木村晃久：炎症性感覚過敏と島皮質における pCREB, acetylated histone H3, FosB の発現に対する強制水泳ストレスの影響 第 38 回日本疼痛学会、2016 年 6 月 24 日-25 日、札幌市

井辺弘樹：痛みと下行性疼痛調節系：ストレスによる可塑的变化 第 45 回日本脊椎脊髄病学会、2016 年 4 月 14 - 16 日、千葉市

井辺弘樹、木村晃久：繰り返し強制水泳ストレスは CFA 注射後の機械刺激に対する感覚過敏を増強し、吻側延髄腹内側部における delta-FosB の発現やヒストン H3 アセチル化に影響を及ぼす 第 93 回日本生理学会大会、2016 年 3 月 22-24 日、札幌市

井辺弘樹、木村晃久：繰り返し強制水泳ストレスによる炎症性感覚過敏の増強と島皮質における pCREB, delta-FosB の発現変化 第 108 回近畿生理学談話会、2015 年 10 月 24 日、東大阪市

Hiroki Imbe, Akihisa Kimura：Repeated forced swim stress enhances CFA-evoked thermal hyperalgesia and affects the expressions of pCREB and c-Fos in the insular cortex. 第 38 回日本神経科学大会、2015 年 7 月 28 日-31 日、神戸市

井辺弘樹、木村晃久：繰り返し強制水泳ストレスは CFA 注射後の機械刺激に対する感覚過敏を増強し、島皮質における pCREB や delta-FosB の発現およびヒストン H3 のアセチル化に影響を及ぼす 第 92 回日本生理学会大会、2015 年 3 月 21-23 日、神戸市

井辺弘樹：ストレスによる下行性疼痛調節系の機能変化 第 7 回日本運動器疼痛学会、2014 年 10 月 25 - 26 日、宇部市

井辺弘樹、木村晃久：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 36 回日本疼痛学会、2014 年 6 月 20-21 日、大阪市

〔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：  
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