

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893009

研究課題名(和文) μ オピオイド受容体欠損による脳形態異常ならびにその背後にある機序の解析

研究課題名(英文) Immunohistochemical analysis in the periaqueductal gray matter under the deletion of mu-opioid receptor

研究代表者

佐々木 一益 (Sasaki, Kazumasu)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80738948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：痛覚過敏様の行動変容を認める μ オピオイド受容体欠損(以下、MOP-KO)マウスの中脳中心灰白質(以下、PAG)の脳形態異常に寄与する細胞構成要素を明らかにする研究に着手した。結果として、PAGの形態異常が惹起された背景として、アストロサイト、マイクログリア、そしてニューロンの数が野生型マウスに比較して多い事が明らかにされた。MOP受容体が欠損することにより下行性疼痛抑制系の起始核であり脳内疼痛関連部位であるPAGにおいてグリア細胞と神経細胞の異常が確認された事実は、痛覚過敏の病態形成の機序の解明に寄与する結果であると考えられる。

研究成果の概要(英文)： μ -opioid receptor knockout (MOP-KO) mice displayed baseline hyperalgesia like behavior and brain volume abnormalities in the periaqueductal gray matter (PAG). Brains of several strains of mutant mice have been shown to exhibit structural changes, when examined carefully, in ways that can display correlations with behavioural consequences of genetic modifications. Immunohistochemistry to detect the differences in number of microglia, astrocyte and neuron in the PAG with specific markers, Iba-1, GFAP, and NeuN, respectively between genotypes. Large numbers of microglia, astrocyte, and neuron was observed in the organization into four parallel longitudinal columns in the PAG under the deletion of μ -opioid (MOP) receptor. This analysis may contribute to further understanding of the relationships between pathological degeneration in the PAG, behavioural alterations caused by MOP receptor deletion, and the effects of opiate agonists and antagonists on specific developmental processes.

研究分野：麻酔学/疼痛学

キーワード：オピオイド 痛覚過敏 中脳中心灰白質 グリア 下行性疼痛抑制系

1. 研究開始当初の背景

μ オピオイド受容体 (MOP) は生体の恒常性の維持に寄与することが広く知られており、侵害刺激の遮断、依存、耐性、体温調節、消化管運動の調節、摂食調節、呼吸運動の調節、ストレス応答の制御、発達段階の脳形態の形成の制御などに関与していることが知られている。

遺伝子改変技術により、MOP遺伝子が欠損した μ オピオイド受容体欠損 (MOP-KO) マウスが作製され、行動薬理的な解析が行われて来た。その結果、MOP-KOマウスでは、野生型 (WT) マウスに比較して痛覚閾値の低下と痛覚過敏様行動、ストレス誘発性鎮痛効果の減弱、ストレス (拘束、強制水泳) 負荷時におけるステロイドホルモンの分泌の減少、心理社会的ストレス負荷モデルにおけるストレス耐性様行動などが報告されて来た。先行研究において、行動学的な変容を有する複数の遺伝子改変マウスでは、行動変容と関連性が高いと考えられる脳部位に脳形態の異常が報告されている。そこで、申請者は、MOP 遺伝子の欠損による脳形態異常の有無をMRI 画像解析 (Voxel-based morphometry: 以下、VBM 法) にてMOP-KO マウスの脳形態を網羅的に解析したところ、MOP-KO マウスの嗅球、視床下部、中脳中心灰白質 (PAG)、そして小脳に脳形態の異常 (体積の増加) が確認された (Sasaki et al. 2015, British Journal of Pharmacology)。

また、申請者は、脳形態異常が確認された領域において、HE 染色、ならびにKB 染色を実施し、スクリーニング的に脳形態異常部位の組織学的な形態観察、ならびに形態異常部位の定量的な細胞数の測定を実施したところ、脳形態異常が確認された各領域において細胞数の増加や細胞層の厚みの増加が確認され、MRI 画像解析の結果と相関が得られた。即ち、嗅球においては、顆粒細胞層の肥厚、PAG においては腹外側領域に細胞数増加、小脳においては分子層と顆粒細胞層の肥厚が確認され

ている。脳形態異常が確認された領域のうち、特にPAGは下行性疼痛抑制系の起始核となる脳部位であり、MOP-KO マウスにて確認されている痛覚過敏様の行動変容との関連性が疑われる領域である。さて、PAG は下行性疼痛抑制系の起始核として知られている。一般にPAGは解剖学的に背側正中、背外側、外側、腹外側領域に区分され、その中でも腹外側領域から下行性に脊髄後角に投射する侵害刺激を抑制する神経回路網が備わっている。

ここまでの段階において、過去に明らかにされていなかったMOP 遺伝子の欠損による脳形態異常が網羅的なMRI 画像解析と組織学的解析により明らかにされた。即ち、これまでの行動薬理的な研究結果を解釈する一助となる可能性を示唆する知見が得られ、オピオイド研究の新たな扉を開いたと考えられる。MOP-KOマウスの脳形態異常が明らかにされたことで、さらなる研究課題が浮き彫りとなった。一般に、痛覚過敏は痛覚情報を処理する中枢神経系での様々な可塑的变化やサイトカインの分泌が原因の1つとして考えられている。痛覚過敏モデル動物では、脊髄後角内のグリア細胞の増殖や、肥大化などの可塑的变化が確認されており、病態形成に寄与することが明らかにされている。しかしながら、痛覚過敏状態において、 μ オピオイドが制御する疼痛抑制系に関わる脳内の関連部位におけるグリア細胞の可塑性についての報告は行われていない。

先行研究において、MOP-KOマウスで確認されている痛覚過敏様の行動変容と関連性が疑われる脳部位の形態異常が確認されたことから、以下の2つの課題に着目する。MOP-KO マウスで確認されている痛覚過敏様の行動変容との関連性が疑われる脳形態異常 (体積増加) 領域であるMOP-KOマウスのPAGの体積増加に寄与する可能性のある細胞の種類の同定 (神経細胞、神経膠細胞 (アストロサイト、ミクログリア)、血管内皮細胞) と 12週齢

のMOP-KOマウスで確認されている脳形態の異常が発達段階において惹起されたものであるかどうかを明確にするための脳形態の解析（生後8週齢でのVBM法による解析と脳形態異常が確認された場合は組織解析の実施）。

2. 研究の目的

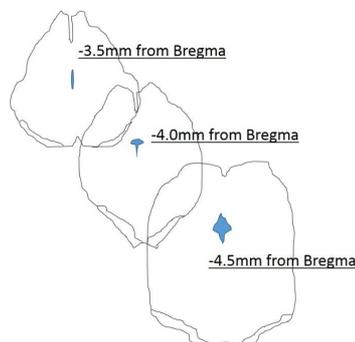
本研究の目的は痛覚過敏様の行動変容を認める μ オピオイド受容体欠損（以下、MOP-KO）マウスの中脳中心灰白質（以下、PAG）の脳形態異常に寄与する細胞構成要素ならびに脳形態異常形成が発生段階のどの時期に惹起されるかを明らかにすることである。PAGを対象に、抗GFAP抗体、抗Iba1抗体、抗CD31抗体、抗NeuN抗体を用いてPAGの可塑性に寄与する細胞種類の同定に着手する。また、PAGの形態異常が生得的なものであるかを検証する目的から、発生段階における脳形態をMRI-voxel based morphometry（以下、VBM法）と組織染色により解析する。本研究成果により、 μ オピオイド受容体（以下、MOP）が欠損することにより痛覚過敏様の行動変容を認めるMOP-KOマウスの脳形態異常の背後に存在する機序を明らかにすることが可能である。

3. 研究の方法

「免疫組織化学染色法ならびに陽性細胞数の定量化方法」（実験1）

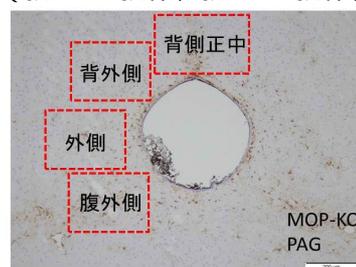
免疫組織化学染色には12週齢の雄性MOP-KOマウスと野生型マウスを各群において7匹を使用する。MOP-KOマウスと野生型マウスは致死量のペントバルビタールの腹腔内投与と皮膚切皮部位へのキシロカインによる浸潤麻酔により、侵害刺激に対する体動の有無を確認しながら、腹腔から胸腔へアプローチし、肋軟骨を切開することで胸腔内の心臓を露出する。脳組織はinfusion pumpを用いた経心的な灌流固定にて採材し、4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィン包埋後にマイクロトームにてPAGの全領域を3 μ m

の厚みで薄切を行い、組織切片を作成する。



染色はPAGがカラム状の構造を呈していることから、マウスの脳アトラスを規範とした3点

を設け（Bregma-3.5 mm、Bregma-4.0 mm、Bregma-4.5 mm）、各々の3点において各抗体（抗GFAP抗体、抗Iba1抗体、抗CD31抗体、



抗NeuN抗体）を用いた免疫染色に用いる組織切片を3枚ずつ作成

する。また、陽性細胞数の測定はPAGの背側正中、背外側、外側、腹外側領域に任意の計測領域を設け、Keyence社の顕微鏡BZ9000（Keyence, Japan）を用いて設定領域内の陽性細胞数を測定する。測定した細胞数をMOP-KOマウスと野生型マウスの各遺伝子型間において2標本t検定にて統計解析を行い、遺伝子型間による陽性細胞数の比較検討を実施する。

「8週齢のMOP-KOマウスにおけるMRI-voxel-based morphometry（VBM法）による脳形態画像解析」（実験2）

VBM法には8週齢の雄性MOP-KOマウスならびに野生型マウスを各遺伝子型間において各々42匹用いる（12週齢で解析した際にも同様の匹数を実験に用いた）。申請者の所属研究室では既に齧歯類を対象としたVBM法による脳形態画像解析の系が確立されている。各遺伝子型間におけるマウスを酸素と窒素の混合ガスならびにイソフルラン吸入麻酔下にて鎮静

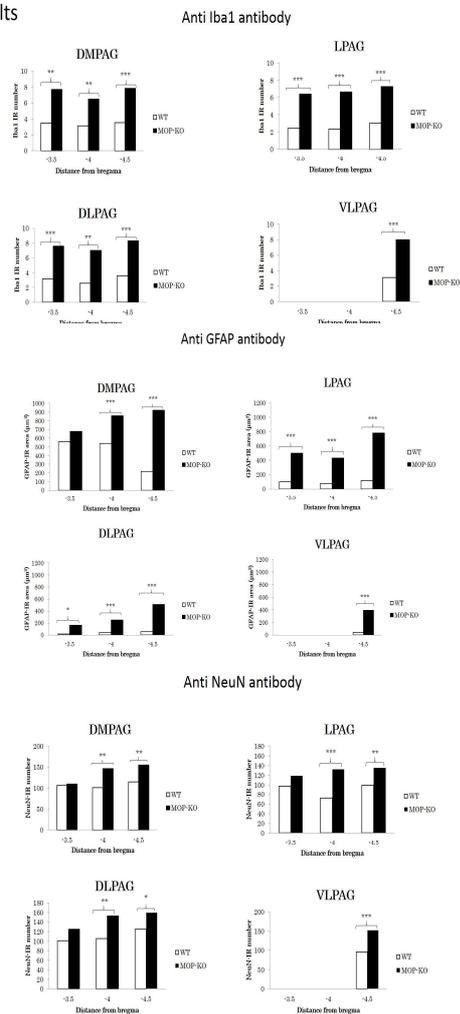
状態を確保し、自発呼吸下にて脳画像の撮像を実施する。撮像時は37 以上に体温を維持し、生体モニターにて心拍数ならびに呼吸数を測定する。MRI 画像の撮像はBruker社製の7.0-T Bruker PharmaScan system(Bruker Biospi, Ettlingen, Germany)にてT2 強調画像を各遺伝子型間で約60 分間撮像する。その後、MOP-KO マウスならびに野生型マウスの画像データをSawiak らが作製した標準脳テンプレートを用いて標準脳座標軸上に変換かつ灰白質、白質、脳脊髄液に分割化する作業を行う。その後、分割化画像を用いて、画像解析に使用したマウスに特異的な標準脳を作製する。その後、標準化、平滑化作業を実施し、作製した被検体特異的な標準脳にMOP-KO マウスと野生型マウスの各々の脳画像を標準化、平滑化を行う。最終的にはStatistical Parametric Mapping 8 (SPM8)を用いた2 標本 t 検定を実施し、8 週齢のマウスにおける遺伝子型間の脳形態異常を解析する。8 週齢での脳形態画像解析結果に基づき、実験 1 で実施した手法と同じ方法にてPAG を主体に脳形態異常部位の組織解析を実施し、12 週齢で得られた所見と比較検討を行い、12 週齢にて確認された脳形態異常部位と組織学的変化が発生段階により惹起されたものであるかの考察を実施する。

4 . 研究成果

(実験 1)

免疫染色、ならびに細胞測定結果として、いずれの解剖学的領域においても、アストロサイト、マイクログリア、そして神経細胞の数が野生型マウスに比較して多い事が明らかにされた。即ち、MOP受容体が欠損することにより、下行性疼痛抑制系の起始核であるPAGの形態異常が惹起された背景として、少なくとも上記3種類の細胞の関与が証明された。

Results



(実験 2)

現在も継続して着手している。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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
該当事項なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 一益 (Sasaki, Kazumasu)

東北大学・加齢医学研究所・助教

研究者番号：80738948

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：