

令和元年6月4日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08669

研究課題名(和文) エンリッチ環境での痛み 恐怖記憶の消去促進に対する神経新生の関与

研究課題名(英文) Involvement of the environmental enrichment causing neurogenesis for the pain-related fear extinction

研究代表者

小山 なつ (Koyama, Natsu)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50135464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イグルー付きのファスト・トラック1セットの設置によるエンリッチ環境が、マウス(エンリッチ群)の恐怖記憶を減衰させるかを解析した。音刺激とフットショックとの連合学習による恐怖条件付け学習を行い、文脈テストおよび手がかりテストを施行し、記憶の保持を評価した。消去学習による恐怖の減衰には有意差が認められなかった。条件付け4ヶ月後ではエンリッチ群マウスで恐怖記憶に低下傾向が認められたが、個体差が大きかった。エンリッチ群マウスには明時に顕著な輪回し活動の亢進がみられたが、ハンギング運動能は対照群より劣っていた。対照群マウスは懸垂行動が制限されないために、恐怖記憶の減衰に差がない可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ファスト・トラックと隠れ家となるイグルーの1セット設置をエンリッチ環境の簡易版モデルとして採用した本研究から、エンリッチ環境が条件付けられた恐怖記憶の消去や減衰を促進させるという結果は得られなかった。エンリッチ環境におけるファスト・トラックは回転運動による「自発運動」を促進させる要素であるが、通常ケージで飼育した対照群マウスのほうが懸垂運動能は優れていて、エンリッチ環境の簡易版モデルを見直す必要性が確認されたことは小さな成果であろう。懸垂運動が恐怖記憶の減衰を抑制しないという結果から、ある病態に有効な運動だけでなく、さまざまな運動が恐怖記憶の過剰となる病態に有効となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Attenuation of the fear memory was analyzed on the mice with and without an environmental enrichment, by the cage with fast track and igloo. Fear was conditioned by the association learning of tone stimulus and foot shock, and fear memory retention was analyzed by contextual test and cued test. There was no significant difference in the attenuation of fear by extinction learning. four months after conditioning, the fear memory tended to decline in the enriched group, but individual differences were large. The enrichment group showed a marked increase in daytime activity, but the hanging activity was inferior to the control group. It was suggested that the attenuation in fear memory was not different because the control group mice were not restricted in their hanging behavior.

研究分野：神経科学

キーワード：エンリッチ環境 自発運動 恐怖記憶 恐怖消去学習 恐怖の忘却

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

激しい痛みを苦しんだ人のすべてが慢性痛に移行するわけではない。痛みは不快な感覚・情動体験であり、急性期においては、不快感や痛みに対する恐怖心を感じて、身体を安静にすることは治癒を促すことに結びつく。痛みに対する強い恐怖が記憶されても、通常はさまざまな体験により新たな記憶に塗り替えられ、薄れていく。しかしマイナス思考や深刻な疾患の情報により、痛みに対する恐怖が増幅されると、うつ状態になったり、身体を過剰にかばいすぎたりして、慢性痛の悪循環に陥るといったのが、痛みの慢性化を説明する「恐怖回避モデル」である。つまり、慢性痛サイクルを回す原動力の一部は、痛みに対する恐怖の記憶である可能性がある。従って痛み関連恐怖反応を軽減できれば、慢性痛に陥る可能性を軽減できる可能性がある。エンリッチな（刺激に富んだ）環境は成体脳での神経新生を促進させるだけでなく、痛みを軽減するという報告がある。

2. 研究の目的

われわれの研究室では、神経幹細胞-神経細胞新生システムのエビジェネティクス研究において、気分障害などの精神疾患の病態を解明する研究を行っている。胎生期にニューロンやグリアを大量に産生する神経幹細胞は、成体脳でも海馬歯状回や嗅球に新たな神経細胞を供給し続けている。逆に副作用として重篤なうつ症状を引き起こすインターフェロン（C型肝炎治療薬）の投与は、マウスの脳室下層や海馬歯状回の神経幹細胞や神経細胞新生を減少させる。また、エンリッチな（刺激に富んだ）環境は、海馬だけでなく、扁桃体での神経細胞の新生が促進させるので、海馬や扁桃体が関係する恐怖条件付けテストで恐怖記憶の解析し、エンリッチな環境が恐怖記憶に対してどのような影響を及ぼすかを解析しようとした。「成体脳での神経新生の促進や痛みの軽減を引き起こすエンリッチな環境は、痛み関連恐怖記憶の消去や軽減を促進する」という仮説を立て、恐怖や慢性痛に関連する病態の緩和法などに結びつく成果を得ることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

研究はすべて C57BL/6 オスマウスを対象とした。エンリッチな（刺激の豊かな）環境として、さまざまな玩具や輪回し車を設置できる巨大なケージでの研究は困難なため、エンリッチな環境が神経障害性疼痛を緩和することを実証した研究（Vachon et al., Behav Brain Funct 2013）で用いられていたファスト・トラックと隠れ家となるイグルーが一体となる装置を入れたケージを、簡易版エンリッチ環境として採用した。対照群マウスは標準ケージに、エンリッチ群マウスはエンリッチケージに、それぞれ4匹ずつ入れて飼育した。

痛み関連恐怖記憶の評価のために、恐怖条件付け実験を行った。「恐怖条件付け」はパブロフの条件反射を応用した連合学習であり、動物に場所（context：文脈）や音刺激（cue：手がかり）など、それ自体では恐怖反応を誘導しない条件刺激と、痛みを含む嫌悪刺激（フットショック）のように恐怖反応を誘発する非条件刺激をペアにして、繰り返し提示すると、動物は両者の関連を学習し、条件刺激のみで恐怖反応を示すようになる。本研究ではマウスに痛み-恐怖条件付けを学習させた後、2種類のテスト：「contextual test」と「cued test」を行い、恐怖記憶の程度はフリージング（すくみ行動）時間で評価した。エンリッチ環境での飼育期間や恐怖記憶の評価をさまざまな組み合わせで解析したが、最終的にはエンリッチケージに4週間飼育した後に恐怖条件付けトレーニングを行い、恐怖条件付けの1日後に近時記憶を、1週間および、4週間および4ヶ月後に遠隔記憶の保持の程度を評価することを基本とした。恐怖記憶の消去のためには、近時記憶/遠隔記憶を評価した後に消去学習を行い、恐怖記憶の消去の程度

を評価した。また条件付け 4 ヶ月後の遠隔記憶の保持は、恐怖記憶の減衰（消去学習なしの忘却）として評価した。cued test は非海馬依存性テストであり、contextual test は海馬依存性の恐怖記憶のテストであり、海馬依存性の空間記憶を評価するバーンズ迷路テストも行った。自発運動量の評価は、ファスト・トラックに接続した簡易的カウンターやハンギングワイヤー試験で行った。

4 . 研究成果

恐怖条件付け記憶に対するエンリッチ環境の効果

恐怖条件付け 1 日後に行った近時記憶は、エンリッチ群で記憶の保持が高い傾向があったが、contextual test および cued test 共に、エンリッチ群と対照群の間に統計学的な有意差はみられなかった。また条件付け 1 週間、4 週間に行った遠隔記憶の保持に関しても、統計学的な有意差は認められなかった。

消去学習に対するエンリッチ環境の効果

消去学習により、エンリッチ群、対照群共に恐怖記憶は消去された。

恐怖記憶忘却に対するエンリッチ環境の効果

恐怖条件付け 4 ヶ月後に行った超遠隔記憶の保持は、エンリッチ群で記憶の保持が低い傾向があったが、個体差は大きく、エンリッチ群と対照群の間で有意差は認められなかった。

空間記憶に対するエンリッチ環境の効果

バーンズ迷路で解析した空間記憶に関しても、エンリッチ群と対照群の間で有意差は認められなかった。

ファスト・トラックによる自発運動の解析

恐怖記憶の減衰と運動量には相関があるかを確認するために、ファスト・トラックに簡易的カウンターを設置し、マウスを 1 匹ずつ単独飼育して、ファスト・トラックの回転回数を解析した。マウスは夜行性動物であるので、回転数は夜間のほうが多い。エンリッチ群の夜間（消灯中、20 時～8 時）の回転数は対照群と比較して多いと予想したが、統計学的な有意差は認められなかった。ところが、エンリッチ群の運動量は明時（点灯中、8 時～20 時）に亢進がみられ、日中の回転数は、対照群と比較して有意に多いことが確認された。回転数の個体差も大きい。日中の回転数が多いほど、記憶減衰の程度が低い傾向があった。

ハンギングワイヤー試験による自発運動の解析

マウスの運動学習能を測定する試験として、ハンギングワイヤー試験がある。マウスを金網の上に乗せ、その金網をひっくり返して、マウスが金網から落下するまでの潜時を測定した。運動量が多いエンリッチ群の潜時のほうが対照群の潜時よりも長いと予想したが、予想外にエンリッチ群の潜時は顕著に短かく、有意差が認められた。自然環境で生活している動物に比べると実験動物の行動は制限されているが、標準ケージで飼育している対照群も、自発運動が制限されているわけではなく、ケージの金網につる下がりながら動き回るといった行動が頻繁に観察される。ファスト・トラック設置は快楽的で報酬系が活性化するという報告もあり、エンリッチ群は日中も頻繁にファスト・トラックを回転させたが、懸垂行動は観察されていない。一

般に運動量はファスト・トラックの回転数から計算される走行距離などで評価されるが、走行距離だけの解析では充分でないとい唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

Kuroda A, Fuchigami T, Fuke S, Koyama N, Ikenaka K, Hitoshi S : Minocycline Directly Enhances the Self-Renewal of Adult Neural Precursor Cells. *Neurochemical research*. 43(1) 219-226, 2018.

小山なつ : 急性痛と慢性痛の基礎知識 *理療* 48, 21~25, 2018.

小山なつ : 実験動物と痛み *関西実験動物研究会会報* 39 巻, 62~66, 2017.

小山なつ、等誠司: 慢性の痛みはどのように考えられてきたのか? : 慢性の痛み - 何によって生み出されているのか? *加藤総夫先生監修 医学のあゆみ* 260 巻 2 号, 131~134, 2017.

小山なつ、等誠司: (Think about Pain) 連載 第 3 回 痛みと鎮痛の歴史閑話 3 - フロイトと局所麻酔薬と催眠 - *Practice of Pain Management* 7(1). 30~37, 2016.5

小山なつ、等誠司: (Think about Pain) 連載 第 2 回 痛みと鎮痛の歴史閑話 2 電気を使った痛みの治療の歴史 - シビレイとマラー、そしてマラーから. *Practice of Pain Management* 6(4). 30~35, 2016.

小山なつ、等誠司: 痛みの伝導路 - 歴史から学ぶ - *脊髄外科* 29(3). 32-37, 2015.

小山なつ、等誠司: (Think about Pain) 連載 第 1 回 痛みと鎮痛の歴史閑話 1 聖アントニウスの火 - St. Anthony's fire - *Practice of Pain Management* 6(3). 32-37, 2015.

小山なつ、等誠司: 痛みの Clinical neuroscience (2) 痛みの概念を歴史から振り返る最新 *医学* 70 巻 8 号. 1690~1693, 2015.

〔学会発表〕(計 17 件)

Natsu Koyama, Keita Kitagawa, Hiroaki Kitagawa, Kenny Daun, Seiji Hitoshi. The effects of environmental enrichment on the fear memory extinction. 第 41 回日本神経科学大会 2018 年 7 月 26 日~29 日 名古屋

小山なつ、中路景太、Kenny Daun、等誠司. 恐怖記憶と消去促進に対する刺激豊かな環境の効果. 第 40 回日本疼痛学会. 2018 年 6 月 15 日~16 日 長崎

小山なつ. 痛みの神経科学. 第 19 回健康支援学会年次学術大会. (招待講演) 2018 年 3 月 9 日~10 日 京都

小山なつ、Kenny Daun、等誠司. 侵害刺激による恐怖情動記憶と消去学習に対する母子分離社会ストレスの効果. 第 39 回日本疼痛学会. 2017 年 6 月 16 日~17 日 神戸

小山なつ. 疼痛学事始め. 第 39 回日本疼痛学会. (招待講演) 2017 年 6 月 16 日~17 日 神戸

小山なつ. 実験動物と痛み. 第 134 回関西実験動物研究会. (招待講演) 2017 年 6 月 9 日 滋賀

小山なつ. 急性痛と慢性痛の基礎知識. 第 66 回日本理学療法学会. (招待講演) 2017 年 5 月 19 日~21 日 大阪

小山なつ. 痛みと鎮痛の基礎知識 一再考. 第 66 回日本理学療法学会. (招待講演) 2017 年 4 月 23 日 大阪

小山なつ. 教育のために効果的な WEB 発信. 第 94 回日本理生学会. (招待講演) 2017 年 3 月 28 日~30 日 浜松

Keita Nakaji, Kenny Anak Daun, Natsu Koyama, and Seiji Hitoshi. Mood stabilizing drugs activate adult neural stem cell-neurogenesis system. 第 94 回日本理生学会. 2017 年 3 月 28 日~30 日 浜松

Natsu Koyama, Kenny Anak Daun, and Seiji Hitoshi. Maternal social separation during the stress hyporesponsive period attenuated the fear-related behavior. IASP2016. 2016 年 9 月 26 日~30 日 横浜

小山なつ. 急性痛と慢性痛の基礎知識. FTEXInstitute1 第 9 回全体集会.(招待講演) 2016 年 7 月 23 日~24 日 京都

Kenny Daun, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi. Effects of maternal separation on the corticosterone level and fear-related behavior in the adult mice. 第 39 回日本神経科学大会. 2016 年 7 月 20 日~22 日 横浜

Natsu Koyama, Kenny Daun, Yukako Yamashita, Takahiro Fuchigami, Seiji Hitoshi. The effects of maternal separation during or after SHRP on the fear-related behavior in the adult mice. 第 93 回日本生理学会大会. 2016 年 3 月 22 日~24 日 札幌

Harumitsu Suzuki, Hongyu Li, Aoi Tanaka, Natsu Koyama, Seiji Hitoshi. Maternal separated mice show the anxiety- and fear related behavior and change neurogenesis in the limbic system. 第 93 回日本生理学会大会. 2015 年 9 月 11 日~13 日 大宮

小山なつ・李洪宇・等誠司. 恐怖関連行動に対する幼若期ストレスの効果. 第 37 回日本疼痛. 2015 年 7 月 3 日~4 日 熊本

(17)小山なつ. リウマチ医に知ってほしい痛みの基礎知識. 第 59 回日本リウマチ学会総会・学術大会. 2015 年 4 月 25 日 名古屋

〔図書〕(計 4 件)

小山なつ. 痛みと鎮痛の基礎知識 増補改訂新版. (技術評論社) P.1~430, 2016.

小山なつ, 等誠司. 第 3 章 痛みの解剖生理学. 痛みの集学的診療: 痛みの教育コアカリキュラム. (真興交易(株)医書出版部「日本疼痛学会痛みの教育コアカリキュラム編集委員会」編集) P.24~42, 2016.

小山なつ, 等誠司. 第 1 章 痛みの生理学. ガイドライン準拠 NICU に入院している新生児の痛みのケア実践テキスト.(メディカ出版「NICU に入院している新生児の痛みのケアガイドライン」委員会 監修) P.168-173, 2016.

小山なつ・等誠司. 痛みの発生メカニズム. メカニズムから読み解く痛みの臨床テキスト (南江堂 小川節郎編集). P.56~69, 2015.

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.shiga-med.ac.jp/~koyama/>

6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。