

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390151

研究課題名(和文)陽性情動やエンリッチ環境が脳内エピジェネティクス修飾に及ぼす影響と疼痛制御

研究課題名(英文)Positive emotions and enriched environment reduce pain through the epigenetic modifications in the central nervous system

研究代表者

仙波 恵美子 (SENBA, Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：00135691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,300,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子発現の網羅的解析により、ストレス(隔離飼育)や陽性情動(Tickling刺激)が、扁桃体で多くの遺伝子やmiRNAを変動させることがわかった。ストレス応答に関わるアドレナリン受容体遺伝子やmiR-375-3pなどは個別飼育により発現が変化し、Ticklingにより適正化された。これは、陽性情動が抗ストレスに働くことを示している。運動が疼痛を緩和させるメカニズムとして、脊髄後角でのミクログリアでのH3K9のアセチル化のようなエピジェネティクス修飾が関与することを示した。さらに光遺伝学的手法により、病的な状態において脳報酬系の活動状況が疼痛閾値に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The microarray technique revealed that many genes were up- and down-regulated, especially in amygdala after 4 weeks of tickling stimulation. For example, arufa-adrenergic receptor gene and miR-375-3p were changed in the amygdala of isolated rats, while those in tickled rats were restored, indicating that positive emotions elicited by tickling can reduce stress responses. Treadmill running for 5 days after the partial sciatic nerve ligation significantly improved pain behaviors of neuropathic pain model mice. We revealed that epigenetic mechanisms such as acetylation of H3K9 in activated microglia in the dorsal horn are involved in the exercise-induced hypoalgesia. To clarify the role of VTA dopaminergic neurons on pain threshold, we performed an optogenetic assay by injecting AAV-channelrhodopsin-2 into the VTA of cre-tyrosine hydrolase mice. We found that brain reward system plays a role in the regulation of pain threshold in pathological conditions, such as neuropathic pain state.

研究分野：神経解剖学、神経科学、疼痛学

キーワード：陽性情動 マイクロアレイ 扁桃体 -受容体 神経障害性疼痛 運動療法 エピジェネティクス 睡眠障害

## 1. 研究開始当初の背景

情動とストレス、痛覚閾値についてはこれまで多くの研究があり、陰性情動により痛覚閾値が低下する。一方、陽性情動と痛覚閾値との関係についての報告は見当たらない。種々のストレスモデル動物で、痛覚閾値が低下し、疼痛行動が増強することが明らかにされており (Imbe et al., 2006) また、ストレス負荷による遺伝子発現の変化には、エピジェネティクス修飾が関与することも明らかにされている (Krishnan & Nestler, 2008)。一方、ストレスとは対極にある陽性情動が心身に良い影響を与えることを示した報告は多いが、そのメカニズムを科学的に解明した仕事は見られない。動物実験により検討するには、動物の陽性情動の検出が重要となるが、**動物の喜怒哀楽の感情は、振動数の異なる超音波で表現される**ことが最近明らかになった。すなわち、tickling 刺激や rough and tumble play により、頻繁に 50KHz の超音波を発するという (Panksepp & Burgdorf, 2003)。村上、堀らは、これまで幼若ラットに 4 週間 tickling 刺激を与えコントロール群との間で DNA チップ法により遺伝子発現の変化を検討した。視床下部では摂食調節に関わる各種ペプチド前駆体の mRNA が増加して (Hori M, Murakami K, et al., 2009.)。成田らは、神経障害性疼痛のモデルである Seltzer モデルを作製し、慢性痛による脳の過剰興奮や睡眠障害を fMRI や脳波を用いて解析した (Narita M et al., 2011; Takemura Y et al., 2011)。また、慢性疼痛時には脳報酬系 (VTA→側坐核) の活動が低下し、その基盤にエピジェネティクス修飾 (DNA methylation の促進) による遺伝子発現の変化があることを見出した (Niikura K et al., 2010)。慢性ストレスによっても、側坐核で DNA methylation の促進が見られることが報告されている (LaPlant et al., 2010)。慢性ストレスと慢性疼痛は、側坐核において同様

のエピジェネティックな変化を引き起こす。また、代表者らは、拘束ストレス負荷が海馬の BDNF mRNA を著明に減少させることを明らかにし、成田らは、エンリッチ環境でマウスを 4 週間飼育すると、海馬での BDNF mRNA の増加 (1.25 倍) が認められ、ChIP アッセイの結果、これらの変化は BDNF プロモーター領域ヒストンテイルの methylation の増加によるものであることを明らかにした (Kuzumaki N et al., 2011)。

## 2. 研究の目的

過剰なストレスが心身に与える悪影響については、これまで多くの研究が行われている。一方、ストレスと対極にある陽性情動や遊びが疼痛を緩和し、免疫系や脳機能にもよい影響を与えることが報告されているが、そのメカニズムは不明である。本研究では、その基盤にあるエピジェネティクス修飾による遺伝子発現制御機構を解明することにより、疼痛制御・治療において陽性情動を喚起する良好な環境や人間関係の重要性についての科学的根拠を提供する。疼痛治療の本質的な改善につながることを期待される。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の 3 つの実験を行った。

### 実験 1: 陽性情動により発現変化する遺伝子群の網羅的探索

陽性情動のモデルとして、Tickling 刺激を用いる。離乳後 1 週間、隔離飼育をしたラット (Fisher 系) に週 5 日 1 日 1 回 10 分間の tickling 刺激を 4 週間与える。コントロール群には、離乳後 1 週間の隔離飼育をし、通常の触刺激を与える。超広帯域音響解析装置を用いて、Tickling 刺激時のラットの音声を収録し、50KHz 音声を快感情の指標とする。4 週間後、これらの動物を断頭し、海馬、側坐核、視床下部を取り出す。Total RNA を調整し、マイクロアレイならびに miRNA アレイを行う。その後、Gene Ontology 解析、GenMAPP による Pathway 解析を行う。

## 実験2：運動により疼痛が軽減するメカニズム

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスの作製：Seltzer らの方法に従い坐骨神経部分損傷(PSL)により作製した。

(2) 実験群とトレッドミル走：1) Naive 群、2) Sham-Sedentary 群、3) Sham-Runner 群、4) PSL-Sedentary 群、5) PSL-Runner 群の5群を設け、PSL/Sham 手術後2日目から Runner 群は、7 m/min で60分間の走運動を5日間行った。

(3) 疼痛行動の評価：機械的アロディニア、熱痛覚過敏は、それぞれ von Frey テストと plantar テストにより測定した。

(4) 免疫組織化学染色：次の1次抗体を用いて免疫染色を行った；抗マウス NeuN 抗体、抗ラット CD11b 抗体、抗ラット GFAP 抗体、抗ウサギ HDAC1 抗体、抗ウサギ acetylated histone H3K9 (acH3K9) 抗体。脊髄後角 I/II 層における免疫陽性細胞数は、Clark らの方法に従って定量した。

## 実験3：脳報酬系の活動と疼痛閾値

腹側被蓋野から側坐核へ投射するドパミン神経の活動を制御した際の疼痛閾値について検討を行った。神経障害性疼痛モデルマウスの作製および疼痛行動の評価については、実験2と同じ。ドパミン神経特異的に光活性化イオンチャネル ChR2 や eNpHR を発現するトランスジェニックマウス、ならびにドパミン神経特異的に Cre 組み換え酵素を発現する TH-Cre マウスと ChR2 を組み込んだ AAV ベクターを用い、光遺伝学的手法により中脳辺縁ドパミン神経の活動を制御した際の疼痛閾値を検討した。

## 4. 研究成果

**実験1** . Fisher 系仔ラットを離乳後(21日齢)から集団飼育群(G)(3匹/ケージ)、隔離飼育群(S)、Tickling 刺激群(T)(快情動喚起/隔離飼育群)に分け、脳組織(扁桃体・側坐核・海馬・前頭前野)から RNA を抽出し、社会隔離ストレスや快情動により発現変化する遺

伝子や miRNA の解析を実施した。その結果、扁桃体で多くの遺伝子や miRNA が変動し、個別飼育群と Tickling 刺激群では、Monoamine GPCRs など異なった Pathway が抽出された。また、ストレス応答に関わるアドレナリン 受容体遺伝子や miR-375-3p などは個別飼育による発現変化が起こるが、Tickling 刺激によって適正化されることが分かった。これまでの研究成果から幼若期の快情動を喚起する経験が、ストレス耐性の獲得や恐怖記憶の消去に重要な役割を果たすことを見出したが、その脳基盤として扁桃体の微少環境の変容を引き起こす可能性を見出し、幼若期の報酬系の形成が扁桃体を基盤とするストレス応答能力の獲得に重要な役割を果たす可能性を見出した。

## 【GO 解析および Pathway 解析の結果】

GO 解析では、扁桃体で多くの GO term が抽出された。集団飼育対隔離飼育(G vs S)、集団飼育対 Tickling 刺激(G vs T)については、up,down とも、cell-cell signaling および synaptic transmission が抽出された。Tickling 刺激対隔離飼育(T vs S)では、regulation of cell adhesion, biological adhesion, など細胞接着に関連するもの、response to hormone, response to stress, など細胞応答に関連するものなど、多数の GO term が抽出された。Pathway 解析では、扁桃体で UP するものは、T vs S のみで有意差に違いのある Pathway として、inflammatory Response Pathway, などが抽出され、個別飼育で差が出る Pathway としては、Calcium Regulation IL-3 Signalling Pathway などが抽出された。特に、Adra1b(adrenergic receptor 1b)は、G vs S で5倍の増加を示した。扁桃体で DOWN するものは、T vs S のみで有意差に違いのある Pathway として、Adipogenesis (Ppar は、G vs S で3倍に増加)が抽出され、個別飼育で差が出るものとして Hedgehog

Signaling Pathway, GRCRs が抽出された。

## 実験 2.

### (1) 走運動に対する疼痛行動の変化

PSL 手術は、PSL-Sedentary 群における逃避反応閾値および潜時を急激に低下させた。一方、PSL-Runner 群における von Frey テストの逃避反応閾値および Plantar テストの逃避反応潜時は PSL-Sedentary 群と比較して、PSL 後 5 日目と 6 日目に有意に上昇した。

### (2) 走運動に対する HDAC1 および acH3K9 陽性ミクログリアの変化(図 1)

Naive マウスの脊髄後角表層部には HDAC1 陽性、あるいは陰性の CD11b 陽性ミクログリアが観察された。PSL 術後には HDAC1 陽性 CD11b 陽性ミクログリア数が有意に増加したが、トレッドミル走はこれらを著しく減少させた。CD11b 陽性ミクログリアにおける acH3K9 発現は、PSL-Sedentary マウスでは低値を示したが、トレッドミル走は acH3K9 陽性 CD11b 陽性ミクログリア数を有意に増加させた ( 図 1 )

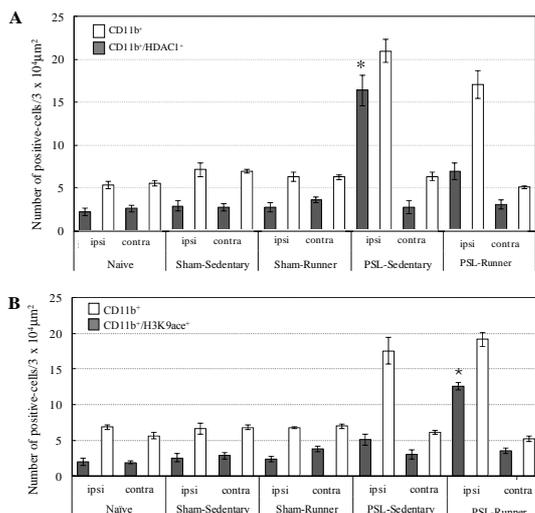


図 1 走運動に対する HDAC1 陽性(A)とアセチル化ヒストン H3K9 陽性(B)ミクログリアの変化

## 実験 3 . 正常時においては中脳辺縁ドーパミン

神経の活性化ならびに抑制により疼痛閾値の変化は認められなかった。一方、神経障害性疼痛下で中脳辺縁ドーパミン神経を活性化した際の疼痛閾値を検討したところ、疼痛閾値の一過性の回復が認められた。さらに、モ

ルヒネの鎮痛効果に対する中脳辺縁ドーパミン神経を抑制した際の影響を検討したところ、鎮痛効果の減弱が認められた。以上の結果から、正常の状態と比較し、特に疼痛閾値が変動している場合の痛覚制御において、上位中枢である中脳辺縁ドーパミン神経が重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、神経障害性疼痛に伴って睡眠障害や不安が起こるメカニズムの解明にも取り組んだ。睡眠障害については、PSL マウスにおいて optogenetic な手法を用いて検討したところ、前帯状回における astrocyte の活性化および青斑核のノルアドレナリンニューロンが関与することがわかった。さらに PSL マウスの扁桃体における遺伝子発現を網羅的に解析し、疼痛により惹起される不安に関連する蛋白を同定した。

## 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 13 件 )

1.Saisu H, Igarashi K, Narita M(8 人中 8 番目).

Neuropathic pain-like stimuli change the expression of ribosomal proteins in the amygdala: genome-wide search for a “pain-associated anxiety-related factor”. **Jpn. J. Pharm. Palliat. Care Sci**, in press (2015) 査読有

2.田口 聖, 上 勝也, 田島文博, 仙波恵美子, 走運動による損傷坐骨神経でのM2マクロファージの増加は神経障害性疼痛の緩和に關与する. **Pain Research** 30(3), 2015(印刷中) 査読有

3.Descalzi G, Ikegami D, Ushijima T, Nestler EJ, Zachariou V, Narita M. Epigenetic mechanisms of chronic pain. **Trends Neurosci**. 2015 Apr;38(4): 237-246. doi: 10.1016/j.tins.2015.02.001. 査読有

4.Senba E. A key to dissect the triad of insomnia, chronic pain, and depression. **Neurosci Lett**. 2015 Mar 4;589:197-9. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.012.

5.Koh K, Hamada A, Narita M(13 人中 13 番目). Possible involvement of activated locus

coeruleus-noradrenergic neurons in pain-related sleep disorders. **Neurosci Lett**. 2015 Mar 4;589:200-6. doi: 10.1016/j.neulet.2014.12.002. 査読有

6. 上 勝也, 田口 聖, 田島文博, 仙波恵美子, 脊髄後角 GABA 作動性ニューロンは運動による疼痛の緩和に關与する. 日本運動器疼痛学会誌 7: 15-26, 2015 査読有

7. Yamashita A, Hamada A, Suhara Y, Kawabe R, Yanase M, Kuzumaki N, Narita M, Matsui R, Okano H, Narita M. Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain. **Synapse**. 2014 Jun;68(6):235-47. doi: 10.1002/syn.21733. 査読有

8. Hori M, Murakami K(7人中6番目), Ichitani Y., Tickling during adolescence alters fear-related and cognitive behaviors in rats after prolonged isolation. **Physiol Behav**. 2014, 131:62-7. doi: 10.1016/j.physbeh.2014.04.008. 査読有

9. 上 勝也, 仙波恵美子, 神経障害性疼痛に対する運動療法の効果とそのメカニズム. **ペインクリニック** 35: 1007-17, 2014, 査読無

10. Ito H, Yanase M, Narita M(11人中11番目). Analysis of sleep disorders under pain using an optogenetic tool: possible involvement of the activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neurons. **Mol Brain**. 2013 Dec 26;6:59. doi: 10.1186/1756-6606-6-59. 査読有

11. Hori M, Murakami K(8人中7番目), Kurosawa M. Tickling increases dopamine release in the nucleus accumbens and 50kHz ultrasonic vocalizations in adolescent rats. **Neuroreport**. 2013 Mar 27;24(5):241-5. doi: 10.1097/WNR.0b013e32835edbf. 査読有

12. Hori M, Murakami K(8人中7番目), Ichitani Y. Effects of repeated tickling on conditioned fear and hormonal responses in socially isolated rats. **Neurosci Lett**. 2013 Mar 1;536:85-9. doi: 10.1016/j.neulet.2012.12.054. 査読有

13. Yamamuro T, Hori M(11人中2番目), Murakami K(11人中10番目), Urayama O. Tickling stimulation causes the up-regulation of the kallikrein family in the submandibular gland of the rat. **Behav Brain Res**. 2013 Jan 1;236(1):236-43. doi:10.1016/j.bbr.2012.09.001. 査読有

〔学会発表〕(計20件)

1. 成田 年, 難治性疼痛発現機序探索のための“痛みネットワーク”解析に連動した複合型オミクス解析: ケミカルジェネティクスシステムやゲノムワイド解析の応用. 第88回日本薬理学会年会, 名古屋, 3月18-20日, 2015年

2. 堀 美代, 離乳後の快情動形成の役割 - ラット遊びモデルでの検証. 堀美代. 第216回つくばブレインサイエンス(TBSA)セミナー(講演), 筑波大学, つくば市, 12月9日, 2014年

3. Hori M, Yamada K, Ohnishi J, Furuie H, Murakami K, Ichitani Y., Tickling alters fear-related and cognitive behaviors in rats isolated during adolescence. Society for Neuroscience, Washington, U.S.A., Nov.15~19, 2014,

4. 成田 年, エピジェネティクス修飾異常に伴う“痛み”の細胞記憶”の形成. 第9回臨床ストレス応答学会大会, 11月1-2日, 岡山, 2014年

5. 上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子 Exercise-induced hypoalgesia に対する脊髄後角 GABA 作動性ニューロンの関与. 第7回日本運動器疼痛学会, 山口, 10月25~26日, 2014年.

6. 田口 聖, 上 勝也, 仙波恵美子, 走運動による神経障害性疼痛の緩和に対する損傷坐骨神経でのM2a マクロファージの関与. 第7回日本運動器疼痛学会, 山口, 10月25~26日, 2014年.

7. Minoru Narita: Pain-induced epigenetic cell modification and significance of primary pain-control. **(Plenary Lecture)** IASP 15th World Congress on Pain, Buenos Aires, Argentina, October 6-11, 2014

8. Senba E, Taguchi E, Kami K., Running exercise attenuates neuropathic pain through epigenetic regulation in spinal microglia. IASP 15th World

Congress on Pain, Buenos Aires, Argentina, October 6-11, 2014

9. 仙波恵美子, 上 勝也, 慢性痛に対する運動療法の奏功のメカニズムと創薬. 第 36 回線維筋痛症学会シンポジウム, 長野, 9月13~14日, 2014年,

10. Kami K, Taguchi S, Senba E.: Running exercise attenuates neuropathic pain through epigenetic regulation in spinal microglia. 第 37 日本神経科学会, 横浜, 9月11~13日, 2014年.

11. 成田 年, 疼痛分子神経科学領域の次世代型研究の提案, 第 36 回日本疼痛学会シンポジウム, 大阪, 6月20-21日, 2014年

12. 上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子, 神経障害性疼痛に対する走運動の効果 - 脊髄後角ミクログリアにおけるヒストンアセチル化の関与 -. 第 36 回日本疼痛学会シンポジウム, 大阪, 6月20~21日, 2014年

13. 田口 聖, 上 勝也, 仙波恵美子, 走運動による損傷坐骨神経での M2 マクロファージの増加は神経障害性疼痛の緩和に関与する. 第 36 回 日本疼痛学会, 大阪, 6月20~21日, 2014年

14. 渡邊 萌, 濱田祐輔, 山下 哲, 成田道子, 池上大悟, 葛巻直子, 山中章弘, 成田 年, 光遺伝学的手法を用いた疼痛閾値に対する中脳辺縁ドパミン神経の機能解析. 第 36 回 日本疼痛学会, 大阪, 6月20~21日, 2014年

15. 上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子, 走運動による神経障害性疼痛の緩和には脊髄後角ミクログリアにおけるヒストン脱アセチル化酵素 1 発現の抑制が関与する. 第 49 回 日本理学療法学会大会, 神奈川, 5月30日~6月1日, 2014年.

16. Kami K, Taguchi S, Senba E., Running exercise attenuates neuropathic pain through epigenetic regulation in spinal microglia. The 17<sup>th</sup> The study group for nerve and spine, Tokyo, March, 2014.

17. Senba E, Taguchi S, Kami K., Exercise training

attenuates neuropathic pain by modulating microglial activation. The 5th Asian Pain Symposium, Okazaki, December, 2013.

18. 上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子, 運動強度は神経障害性疼痛の緩和に影響を及ぼす」第 6 回日本運動器疼痛学会大会, 神戸, 12月, 2013年

19. 上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子, 走運動による神経障害性疼痛の緩和には脊髄後角ミクログリアにおける Histone deacetylase 1 発現の抑制が関与する. 第 18 回グリア研究会. 宮城, 10月26日, 2013年

20. 上 勝也, 仙波恵美子, 運動が神経障害性疼痛モデルマウスに及ぼす影響 - 脊髄後角ミクログリアにおける変化 -. 第 35 回日本疼痛学会, 埼玉, 7月12~13日, 2013年.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

仙波 恵美子 (SENBA Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号 : 00135691

### (2) 研究分担者

成田 年 (NARITA Minoru)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号 : 40318613

### (3) 研究分担者

村上 和雄 (MURAKAMI Kazuo)

公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・その他

研究者番号 ; 70110517

### (4) 研究分担者

堀 美代 (HORI Miyo)

公益財団法人国際科学振興財団・その他部局等・研究員

研究者番号 ; 90399329

### (5) 連携研究者

上 勝也 (KAMI Kstsuya)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号 : 20204612