

平成 30 年 6 月 9 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08918

研究課題名(和文) 社会脳における精神的ストレスによる痛み修飾回路の解明

研究課題名(英文) Psychosocial stress by partner-loss enhanced pain behaviors in monogamous animal, prairie voles.

研究代表者

大迫 洋治 (Osako, Yoji)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：40335922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、雌雄間で非常に強い絆を形成するげっ歯類をパートナーと別離させると、不安がりになり、精神的ストレスにより自律神経が変調し体温が上昇した。さらに、足に炎症を惹起し痛みを起こさせると、痛み行動が増加した。痛みに興奮する脳領域のうち、前頭前野と側坐核がパートナーを失うことでその活動が低下することが明らかになった。これらは脳内ドパミン回路を構成する主要な脳領域である。本研究により、精神的ストレスによる痛みの増悪に脳内ドパミン回路の機能変調が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Partner-loss prairie vole males showed increased anxiety-like behaviors in the open field test and elevated pain behaviors in formalin test as compared to paired males. Furthermore, there was a correlation between anxiety-like behaviors and pain-related behaviors. Concerning body temperature, partner loss increased body temperature just after the breaking bonds, and the increase persisted for at least 2 weeks. Elevation of body temperature during the open field and formalin test in the partner loss group was significantly less compared with paired males. In addition, partner-loss males showed increased of Fos immunoreactivity in the spinal dorsal horn and decreased in pain-related brain regions, especially in the prefrontal cortex and nucleus accumbens. Together, partner loss elicits anxiety-like behaviors, autonomic nervous system dysfunction, and alters pain behaviors. The brain dopamine system is involved in neural processes underlying the pain modulation by social bonds.

研究分野：疼痛学

キーワード：Psychosocial stress pain

1. 研究開始当初の背景

痛みは、同じ大きさでも個人によって異なって認知される(心身反応)。手術患者において、術前に不安感が強いほど術後痛が強いこと、慢性痛の患者が家庭問題を抱えていることが多いことなどから、精神的ストレスは痛みを増悪することが示唆されている。ストレスによる痛みの修飾として、急性的な強い身体的ストレスによる『ストレス性鎮痛』がよく知られており、これまでに、その発症メカニズムとして交感神経と内因性疼痛抑制系の活性化によることが明らかになっている。しかし、臨床で問題になっているのは、慢性的な精神的ストレスによる『ストレス性痛覚過敏』であり、『ストレス性鎮痛』とは別の痛みの修飾回路が駆動すると考えられる。また、多くの慢性痛患者が精神的ストレスを抱えていることから、慢性痛の発症基盤に『ストレス性痛覚過敏』の痛みの修飾回路が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、雌雄間で非常に強い絆を形成し、高い社会性を示すプレーリーハタネズミを用いる。このプレーリーハタネズミに絆の破綻という精神的ストレス下で痛みを負荷し、痛みや不安の変化、さらには脳・脊髄における痛み伝導路の反応性を解析し、精神的ストレス性痛覚過敏の発症メカニズムを明らかにしていく。特に、プレーリーハタネズミの社会性に重要で、かつ、痛み刺激でも活性化し内因性疼痛抑制系として機能することが注目されている中脳皮質辺縁系ドーパミン回路にも注目して解析を行う。

3. 研究の方法

本研究の解析はすべて、プレーリーハタネズミの雄について行った。プレーリーハタネズミは雌雄で非常に強い絆を形成する動物であることから、絆を形成したパートナーと別離(パートナーロス)させることにより精神的ストレスを負荷した。雌雄間の絆は、標準飼育ケージ内での7日間の同居により形成させ、プリファレンステストにより絆の有無を確認した。プリファレンステストにて、パートナー雌のみに親和行動を示した雄を絆ありと判定し(絆あり群)、それ以外の雄を絆なしと判定し(絆なし群)両群について、オープンフィールドテストにより不安行動を、テレメーターによる深部体温の24時間連続測定により自律神経の活動性を、ホルマリンテストにより痛み行動を解析し、それぞれについてパートナー維持群とロス群について比較を行った。さらに、ホルマリンテスト終了後(ホルマリン注射2時間後)各被検動物から4%パラホルムアルデヒド溶液灌流後に脳と脊髄を採取し、クリオスタットで作製した凍結切片上において、神経細胞の活動を cFos 蛋白の抗体で、ドーパミン産生細胞の検出をチロシン水酸化酵素の抗体で、GABA

抑制性介在ニューロンの検出を GAD の抗体で免疫組織化学的染色にて検出し、各陽性細胞の数をパートナー維持群とロス群間で比較を行った。また、脳内ドーパミンがパートナーによる痛み行動の変化に關与するのか検証する目的で、パートナーロス期間中に、体内埋め込み型マイクロインフュージョンポンプシステムにより側脳室へドーパミン受容体アンタゴニストを投与して痛み行動の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) プリファレンステストでパートナー雌のみに親和行動を示したプレーリーハタネズミ雄を、パートナー雌と同居を維持した群(維持群)と別離させた群(ロス群)に分け、ロス期間中にオープンフィールドテストを実施すると、中央エリア(不安エリア)に侵入する割合がロス群で有意に低かった(図1)。このことから、パートナーロスに伴い不安が亢進していたことが示唆された。

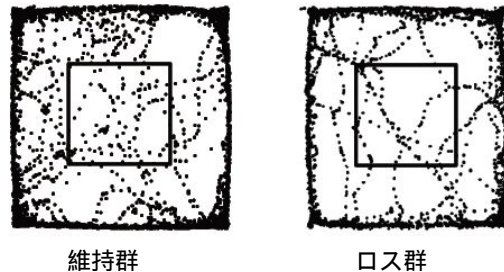


図1 オープンフィールドテストにおける歩行プロット図; 中央の四角が不安エリア
ロス群では不安エリア内での歩行が少ない

さらに、オープンフィールドテストの2日後にホルマリンテストを実施した。ホルマリンテストでは、足底皮下に2%パラホルムアルデヒド溶液を注射することで炎症性疼痛を惹起した。注射直後から60分後までの疼痛関連行動(licking: 患足をなめる、lifting: 患足を床につけない)の発現量を測定した。その結果、ロス群が維持群よりlickingが多い傾向にあり、liftingについてはロス群において維持群より有意に多く発現した(図2)。

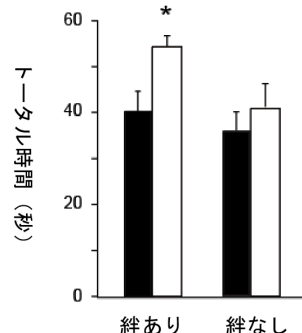


図2 ホルマリンテストで足を上げた時間
黒: 維持群 白: ロス群
絆ありロス群で維持群より足を上げていた時間が有意に長かった(*)

さらに、オープンフィールドテストにおける不安行動とホルマリンテストにおけるlicking行動に相関がみられた。さらに、雌雄ペアリング前に雄の腹腔内にテレメーターを埋め込み、ロス期間中における深部体温を24時間連続モニターすると、ロス群はパートナーロス直後から体温の上昇がみられ、その上昇はパートナーロス2週間後まで維持されていた。このことから、パートナーロスによりストレス性高体温症を発症していたものと考えられる。オープンフィールド新規環境において、維持群では深部体温が1.6 上昇したのに対し、ロス群では1.0 しか上昇せず、また、炎症性疼痛誘発時においても、維持群では1.1 上昇したがロス群では0.6 しか上昇しなかった。これらの結果から、ロス群において自律神経の反応性の低下が示唆された。ここまでの結果をまとめると、雌雄間で強い絆を形成するプレーリーハタネズミにおいて、パートナーの存在により痛み行動が修飾され、その背景に不安の増大や自律神経機能の変調があることが明らかになった。

(2)(1)で観察された痛みの社会的修飾作用の脳内メカニズムを探索する目的で、疼痛関連脳領域の痛み刺激への反応性を解析した。最初期遺伝子c-fosのタンパク発現を指標に炎症性疼痛誘発時における神経活性化をロス群と維持群で比較した結果、解析脳領域の大部分において、維持群の方がロス群よりc-Fos発現が多かった。特に、前頭前野と側坐核において維持群とロス群間で顕著な発現差が検出された。この2つの脳領域は、中脳皮質辺縁系ドーパミン回路の構成領域であり、このドーパミン回路は絆の形成に重要であることが明らかになっている。さらに近年、この中脳ドーパミン回路が内因性疼痛抑制系として機能することが注目されている。実際に、線維筋痛症など慢性疼痛患者で中脳ドーパミン回路のドーパミン代謝の異常が検出されており、中脳ドーパミン回路を介した内因性疼痛抑制系の変調が慢性痛の発症要因である可能性が示唆されている。したがって、本研究におけるパートナーロスによる痛みの増悪メカニズムにも、中脳ドーパミン回路の変調が関与している可能性が示唆された。

(3)(2)において、パートナー維持群とロス群間で炎症性疼痛惹起時の疼痛関連脳領域においてFos発現に差が検出された。しかし、脳や脊髄におけるFos蛋白は、痛み以外の様々な刺激によってもその発現が誘導されること、疼痛関連脳領域とストレス関連脳領域に重複している部分があることから、本研究で検出された脳内Fos発現がパートナーロスという心理ストレスそのものを反映している可能性がある。そこで、痛み刺激を入れない状態(コントロール群)の疼痛関連脳領域でのFos蛋白の発現を(2)と同様に解析し、パートナー維持群とロス群それぞれにおいて、炎症性疼痛誘発時(ペイン群)におけるFos発現をコントロール群と比較して解析を行った。その結

果、どの解析脳領域においても、コントロール群における維持群 vs ロス群でFos発現に差は検出されなかった。痛み要因とパートナー要因による2要因分散分析の結果、前頭前野と側坐核殻部において、痛みとパートナーの間に交互作用が認められ、維持群/ペイン群のFos発現が有意に高かった(図3)。これらの結果は、痛み刺激による疼痛関連脳領域のFos発現がパートナーの影響を受けることを意味している。

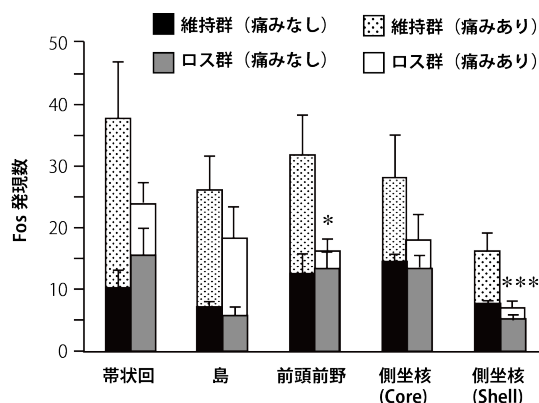


図3 炎症性疼痛時の前脳各領域におけるFos発現 ロス群の前頭前野と側坐核において活性が著しく低い*。

(4)中枢への最初の痛み信号の入口となる脊髄後角におけるFos発現について解析を行った。脊髄後角を10層に分類し、侵害刺激が入力するI-II層(浅層)とV-VI層(深層)において解析を行った。その結果、浅層・深層ともに炎症側で著しいFos発現がみられ、炎症側におけるFos発現細胞数に、維持群vsロス群で有意差は検出されなかった。しかし、炎症側/非炎症側値を算出すると、浅層・深層ともロス群が維持群より有意に高かった(図4)。脊髄後角におけるFos発現ニューロンには、脳幹からの下行性疼痛抑制系により活性化する抑制性介在ニューロンのFos発現も混在していると思われる。そこで、さらに、GABA産生酵素GAD67の抗体による免疫組織化学的染色法により抑制性介在ニューロンを検出し、それらニューロンのFos発現を維持群・ロス群間で比較解析を行った。その結果、維持群・ロス群ともに炎症側の脊髄後角において、Fos発現ニューロンの約40%がGAD陽性ニューロンであり、両群間に有意な差は検出されなかった。脊髄後角には、投射ニューロンの他に、多くの介在ニューロンが存在し、これらすべてのニューロンが痛み刺激に反応しFos蛋白を発現すると考えられる。下行性疼痛抑制系は脊髄後角内の痛み情報処理を両側性に修飾することが知られていることから、非炎症側のFos発現は下行性疼痛抑制系による介在ニューロンの活性化で誘導されていると思われる。今回の研究で、炎症側/非炎症側値で差が検出されたことを考え合わせると、ロス群の方が

維持群より下行性疼痛抑制系による脊髄後角内の介在ニューロンの活性が弱く、痛み情報がより伝わりやすくなっていると推測される。

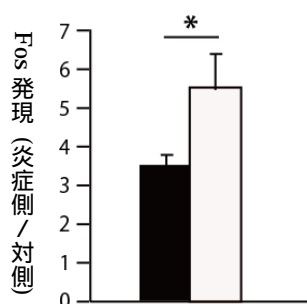


図4 脊髄後角におけるFos発現

黒：維持群 白：ロス群

ロス群の脊髄後角におけるFos発現の炎症側/対側比が維持群より有意に高かった(*)

(5)(3)でロス群の中脳ドパミン回路を介した内因性疼痛抑制系の痛み刺激に対する反応性の低下が示唆されたので(図3)、腹側被蓋野のドパミン産生ニューロンの痛み刺激に対する反応性をFos蛋白を指標に解析した。その結果、維持群、ロス群ともにFos発現しているチロシン水酸化酵素陽性ニューロンはほとんど検出されず、ドパミンニューロンの痛み刺激に対する反応性を評価することができなかった。腹側被蓋野ドパミンニューロンの活動は、腹側被蓋野内のGABA抑制性介在ニューロンにより調節されることが知られている。そこで、痛み刺激入力時の腹側被蓋野内のGABA抑制性介在ニューロンのFos発現を指標に、痛み刺激に対するドパミンニューロンの反応性を間接的に評価し、維持群とロス群で比較解析を試みた。その結果、維持群・ロス群ともに、Fos発現を示すGAD陽性ニューロンはほとんど検出されず、ドパミンニューロンの活性度を評価するにいたらなかった。今回の研究では、腹側被蓋野のドパミンニューロンの痛み刺激に対する反応性を直接的にも間接的にも評価することができなかった。Fos発現は神経細胞の活動の評価としてよく用いられるが、刺激やニューロンの種類によっては誘導されないことも示唆されている。痛み刺激に対する腹側被蓋野のドパミンニューロンの活動では、Fos以外の他の最初期遺伝子が誘導される可能性がある。そこで、パートナーロスに伴う痛み行動の増悪に脳内ドパミンが関与しているのか検証する目的で、パートナーロス期間中に、体内埋め込み型マイクロインフュージョンポンプを使用して、人口脳脊髄液(200nl)、人口脳脊髄液+ドパミン受容体D2アゴニストquinpirole(1ng/200nl)のいずれかを流速0.5μl/hrで側坐核へ投与し、各グループの炎症性疼痛時の痛み行動を解析した。その結果、人口脳脊髄液のみを投与したパートナーロス群に比べて、人口脳脊髄液+quinpirole投与群では痛み行動が少ない傾向がみられ、パートナー維持群との差が

減少した。パートナーロスに伴う痛み行動の増悪が、脳内へのドパミン受容体アゴニスト投与により緩和されたことから、痛みの心理社会的修飾メカニズムに脳内ドパミンが関与することが示唆された。

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2件)

Osako Y, Nobuhara R, Arai Y-CP, Tanaka K, Young LJ, Nishihara M, Mitsui S, Yuri K; Partner loss in monogamous rodents: Modulation of pain and emotional behavior in male prairie voles; Psychosomatic Medicine, 査読有, 80, 2018, 62-68 DOI: 10.1097/PSY.0000000000000524

Aki Arai, Yu Hirota, Naoki Miyase, Shiori Miyata, Larry J. Young, Yoji Osako, Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui; A single prolonged stress paradigm produces enduring impairments in social bonding in monogamous prairie voles; Behavioural Brain Research, 査読有, 315, 2016, 83-93 DOI: 10.1016/j.bbr.2016.08.022

[学会発表](計8件)

Yoji Osako, Reiko Nobuhara, Takahiro Okuda, Young-Chang P Arai, Takahiro Ushida, Kazunari Yuri; Neuropathic pain impairs pair-bonding in Monogamous rodent; 第39回日本疼痛学会、2017

Takahiro Okuda, Yoji Osako, Kou Takahashi, Koji Takimoto, Takao Okabe, Kenjiro Tanaka, Makoto Nishihara, Kazunari Yuri; Modulation of nociception by social bonds in monogamous rodents: c-Fos expression in the spinal cord and the brain "pain matrix" under conditions of inflammatory pain; 第39回日本疼痛学会、2017

奥田 教宏、大迫 洋治、竹林 秀晃、滝本 幸治、宮本 謙三、宅間 豊、井上 佳和、宮本 祥子、岡部 孝生、由利 和也; 痛みの社会的修飾メカニズムの一考 : 一夫一婦制げっ歯類を用いた基礎的研究; 第52回日本理学療学会、2017

Yoji Osako, Reiko Nobuhara, Kenjiro Tanaka, Kou Takahashi, Larry J. Young, Takahiro Ushida, Makoto Nishihara, Kazunari Yuri; Modulation of nociception by social bonds in monogamous animal, prairie voles; 16th World Congress on Pain, 2016

Takahiro Okuda, Yoji Osako, Young-Chang P Arai, Shoko Miyamoto, Hideaki Takebayashi, Larry J Young, Takahiro Ushida, Kazunari Yuri; Modulation of nociception by social bonds in monogamous

prairie voles: Fos expression in the spinal cord and the brain “pain matrix” under conditions of inflammatory pain; 16th World Congress on Pain, 2016

奥田 教宏、大迫 洋治、竹林 秀晃、滝本 幸治、井上 佳和、岡部 孝生、宮本 祥子、宅間 豊、宮本 謙三、由利 和也；心理社会的要因による痛み関連脳領域 の変化：高社会性げっ歯類を用いた基礎研究；第45回四国理学療法士学会、2016

大迫 洋治、西原 真理、信原 玲子、内田 有希、牛田 享宏、三井 真一、Larry J Young、由利 和也；一夫一婦制げっ歯類におけるパートナーロスによる痛みの修飾；第38回日本神経科学大会、2015

新井 亜紀、廣田 湧、吉澤 萌香、石澤 美衣、佐藤 葵、民部 由莉、Larry J. Young、大迫 洋治、由利 和也、三井 真一；パロキセチンはSingle prolonged stressによって阻害されたプレーリーハタネズミのつがい形成を復元する；第38回日本神経科学大会、2015

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大迫 洋治 (OSAKO, Yoji)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授
研究者番号：40335922

(2) 研究分担者

由利 和也 (YURI, Kazunari)
高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授
研究者番号：10220534

(3) 連携研究者

西原 真理 (NISHIHARA, Makoto)
愛知医科大学・医学部・教授(特任)
研究者番号：60380325

(4) 研究協力者

()