

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10558

研究課題名(和文) 新生児期の術後痛がもたらす神経発達異常におけるエピジェネティック制御の関与

研究課題名(英文) Effects of neonatal pain on developing neuronal networks with epigenetic control

研究代表者

野村 有紀 (Nomura, Yuki)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60643955

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)：本研究では新生児期の疼痛は成熟後に明らかな疼痛閾値や学習機能への影響は認めなかったものの、不安を伴わない多動傾向を示すことを明らかとした。脳内遺伝子群の中でも、TNF、Trombospondin-1、c-fos遺伝子の発現低下を見出し、ヒストンアセチル化に起因する遺伝子発現の変化によって神経発達期のグリア細胞および神経細胞のネットワーク機能に影響を及ぼす可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：We tried to identify the neonatal pain affects developmental brain negatively with epigenetic control. The 6-days litters were received a single intraplantar injection of CFA. In behavior analysis after growing up, we observed that the hyperactivity with no anxiety, but not cognitive dysfunction in adjuvant rats. On the other hand, pain-like behavior is not observed in adjuvant rats. Next, to clarify the mechanism of hyperactivity in adjuvant rats, we examined the gene expression of some neuromodulators. The expression of TNF α , c-fos, and TSP-1 mRNA are significantly decreasing after growing up in cerebral cortex. The changes were not observed in DNA global methylation levels. However, the global acetylation level of histone was decreased in adjuvant rats. It is possible that some factors which downregulate TSP-1 are increased followed by histone deacetylation. TSP-1 may critically influence on development of neuronal network with the histone modulation.

研究分野：麻酔科学

キーワード：新生児 疼痛 行動異常 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

近年、新生児医療の進歩に伴い、低出生体重児、早期産児であっても障害の程度が少なく存命が可能となっている。一方で手術や繰り返される処置によって痛みという侵害刺激を与える機会が増え、痛みによる神経発達、精神発達への影響が問題視されている。痛みは有害事象から生体を守る必須な感覚の一つでもあり、新生児であっても痛みを知覚することができる。新生児期に痛み刺激が繰り返されることによって、脳の機能的・構造的発達に異常を来とし、成長後に痛みに対する感受性を上昇させるだけでなく、知覚障害、注意欠陥障害などの認知的・行動的障害を引き起こすことも報告されている (Semin in Fetal Neonatal Med. 11:268, 2006)。また術後痛に代表される組織損傷性、炎症性疼痛は通常、治癒に至る自然過程で痛みが消失するが、痛みの予防や軽減によって損傷部位の治癒を早めるだけでなく、こうした神経発達障害から回避できる可能性が考えられる。一方、遺伝子の塩基配列に変異を来たすことなく、DNA メチル化、ヒストン修飾、クロマチン構造変化などによって遺伝子の活性化や不活化を来すエピジェネティクス機構が発見され、疾患との関連に注目が集まっている。特に近年、胎生期や生後 2-3 週間の短期の環境要因で DNA のメチル化状態が変化することが報告され、ヒトにおいてもうつ病や統合失調症などの精神疾患や糖尿病や肥満などの生活習慣病の発症に、胎生期、幼少時期の環境因子による DNA メチル化が関与すると考えられるようになってきた。また発達期のストレスによって脳由来神経栄養因子 (BDNF) のプロモーター領域におけるヒストンのメチル化を引き起こし、一部のスプライズバリエーションの発現増加とうつ病発症との因果関係が指摘されている (Nature Neuroscience 9:519, 2006)。BDNF は、中枢神経系における可塑的な変化に重要な役割を果たしているが、疼痛においても有意な発現変化を来すことが知られている。当研究室においてもこれまでに神経障害性痛モデル動物における一部のスプライズバリエーションの特異的な発現増加に対し、shRNA 発現ベクターによる疼痛抑制を試みている (Biochem Biophys Res Commun. 408:139, 2011)。

さらに胎生期や新生児期マウスに対して麻酔が神経変性を引き起こし、学習障害が生じ、母児同伴などの環境エンリッチメントやエリスロポエチン投与によって回避できる可能性を報告してきた (Paediatr Anaesth. 21:1209, 2011)。これらは胎生期から新生児期にかけての外的環境が神経発達異常に影響を及ぼす可能性を示唆している。

2. 研究の目的

新生児期に繰り返される痛み刺激は神経発達過程において構造および形態的な異常

をもたすだけでなく、成長後に認知、行動障害を引き起こすことが知られている。これらの現象は痛みという短期の環境要因により、後天的な遺伝子修飾 (エピジェネティクス) を引き起こし、ある種の遺伝子の発現に長期的な影響を及ぼしている可能性が考えられる。

本研究では、(1) 新生児期の疼痛が成長後に神経発達異常をもたすか否か、具体的には疼痛閾値、学習機能および情動形成においてどのような影響をもたすかを明らかにする。(2) 神経発達に關与するニューロモジュレーター の発現変化を解析し、DNA メチル化およびヒストン修飾をはじめとしたエピジェネティック制御の關与を明らかにし、新生児における疼痛刺激が後天的にもたらす有害性についての明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新生児疼痛モデル動物の作製

足底注入モデル作製：生後 6 日以内の新生児ラットに対して、CFA (Complete Freund's Adjuvant) を足底へ注入する。

(2) 成熟後の行動解析

新生児疼痛モデルを用いて、成熟後 5 - 6 週齢にて各種行動評価を行う。

短期学習記憶評価：Y 字迷路

活動量、自発性、不安評価：オープンフィールド試験、明暗ボックス、高架式十字迷路

痛覚感受性評価：ホットプレート試験、von Frey 試験

(3) 神経発達関連遺伝子の発現解析

新生児疼痛モデルを用いて、成熟後 5 - 6 週齢の脳、海馬、脊髄における遺伝子発現の変化をリアルタイム PCR により解析する。

(4) DNA メチル化、ヒストンアセチル化グローバル解析

新生児疼痛モデルを用いて、成熟後 5 - 6 週齢の脳、海馬、脊髄から DNA を抽出、あるいはヒストンを抽出し、それぞれ ELISA により解析を行う。

(5) 神経発達関連遺伝子のメチル化解析

プロモーター領域における DNA メチル化解析 これまでに疼痛やストレス下で遺伝子発現量の変化が報告されている疼痛関連遺伝子について、プロモーター領域の DNA メチル化解析をバイサルファイトシークエンス法により行う。

4. 研究成果

(1) 新生児期疼痛モデルの成熟後における行動変化

これまでの報告によると、幼若期の疼痛刺激によって、成熟後疼痛閾値の低下をもたらす、疼痛感受性が高くなる可能性が指摘されてきたが、本研究では明確な疼痛閾値の変化を認めなかった (図 1)。

また学習機能評価として本研究で行った Y

字迷路を施行したが、明らかな変化を認めなかった。

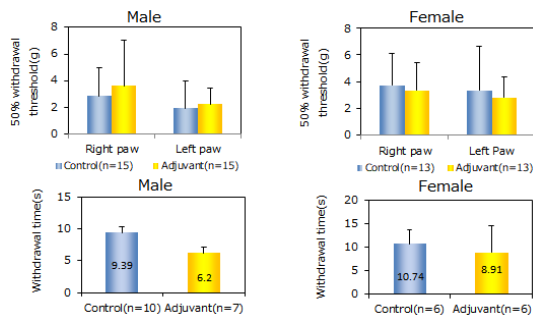


図1 von Frey 試験, Hot Plate 試験による疼痛閾値評価

一方、活動量、自発性、不安評価として行った明暗ボックス試験においては、明らかな行動変化は認めなかったものの、オープンフィールド試験においては、疼痛刺激を受けたラットにおいて、多動行動を伴うことが明らかとなった(図2)。

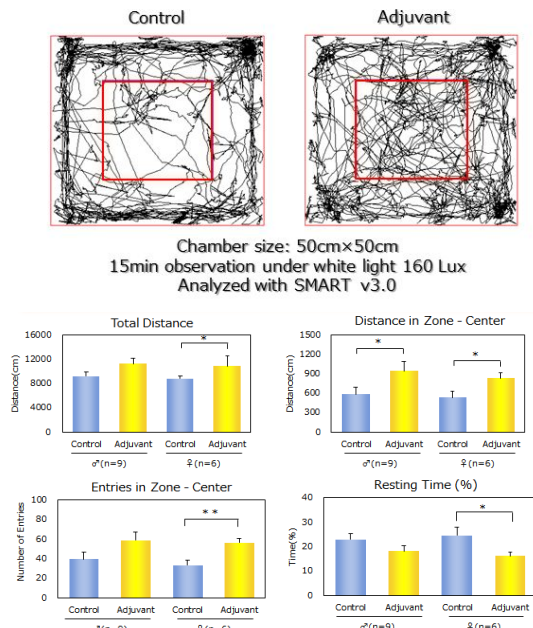


図2 オープンフィールド試験における行動評価

また、高架式十字迷路においては雄で有意な不安抑制行動が認められ、不安を伴わない多動が生じる可能性が示唆された。こうした疼痛による成長後の行動変化には雌雄差がある可能性も考えられた(図3)。

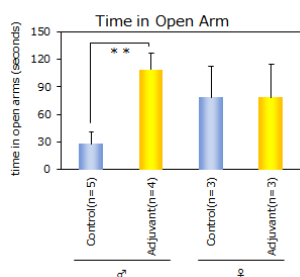


図3 高架式十字迷路における行動評価

(2) 神経発達関連因子の遺伝子発現解析

これまでに神経発達に関連する因子として報告があった各種遺伝子について発現解析を行った。その結果、新生児期の疼痛によって、成長後のラット大脳皮質前頭野周辺組織において BDNF、Glucocorticoid Receptor、Glutamate decarboxylase、methyl-CpG binding protein 2 などには明らかな発現の差を認めなかった。

一方、ミクログリアから産生される脳内炎症性メディエーター(TNF)や、発達期の神経細胞形成に重要な役割を持つアストロサイト由来の Trombospondin-1 (TSP-1) 神経活動の指標となる c-fos 遺伝子の発現低下が明らかとなった(図4)。

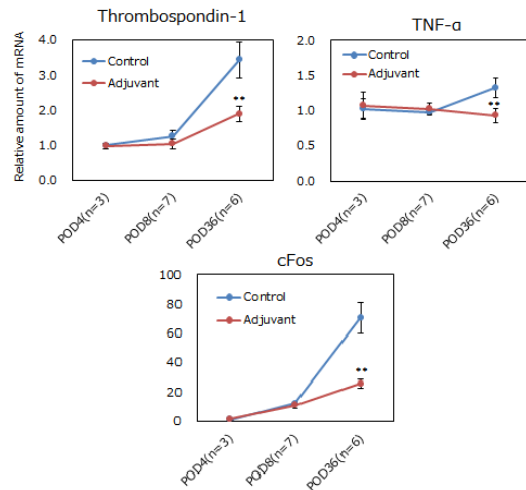


図4 神経発達関連因子の発現変化

こうした遺伝子発現変化の分子基盤の一つとして、エピジェネティック制御の関与が考えられたが、大脳組織より抽出した DNA についてグローバルな DNA メチル化状態の比較解析を行ったところ、有意な差を認めなかった。さらに、個々の遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態をバイサルファイトシークエンス法によって配列解析したところ、やはり明らかな差は認めなかった。一方、ヒストンアセチル化については全体的なヒストンアセチル化レベルが低下していることが明らかとなった(図5)。

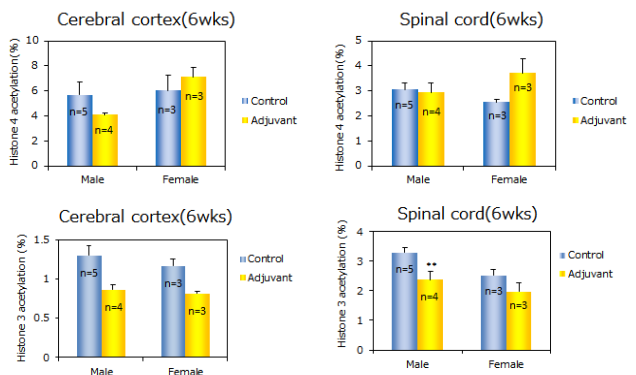


図5 大脳および脊髄におけるヒストンアセチル化解析

ヒストンアセチル化状態が抑制されることによって、神経発達関連因子に対して抑制的な役割を持つ何らかの遺伝子発現が促進され、神経発達過程に影響を及ぼす可能性が考えられる。具体的にどういった遺伝子発現に影響を及ぼしているかについては、現在解析中である。

以上より、本研究では新生児期に与えられた疼痛刺激によって、成長後に不安を伴わない多動性行動を示すことが明らかとなった。また、その原因の一つとして遺伝子発現解析結果より、グリア細胞の機能の可能性が考えられた。アストロサイト、ミクログリアやオリゴデンドロサイトといったグリア細胞は、脳組織の構築や恒常性の維持などに関わるだけでなく、シナプス伝達の調節により神経活動に対して多彩な影響を与え、脳機能発現に積極的に関与する。新生児期の疼痛刺激によって、グリア細胞群の機能変化に伴う神経細胞の発火異常が生じ、神経回路網のネットワーク形成不全による長期的な機能性変化をもたらす可能性が考えられた(図6)。また遺伝子発現変化をもたらす機構として、ヒストンアセチル化などのエピジェネティック制御の関与が示唆された。

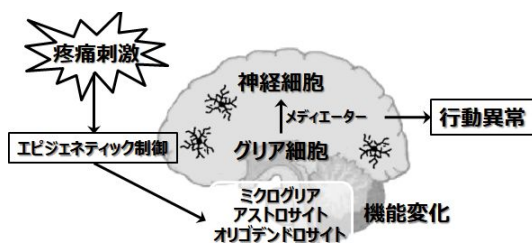


図6 新生児期の疼痛刺激は行動異常をもたらす

5. 主な発表論文等

6. 研究組織

野村 有紀 (NOMURA YUKI)

神戸大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60643955