

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 1 日現在

機関番号：32409

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K15828

研究課題名(和文) ストレスによる疼痛の制御を目指した infradian rhythm 遺伝子の探索

研究課題名(英文) Research for infradian rhythm genes under stress condition

研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60406494

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：社会的ストレスは周期的な痛みを生じさせることがあるが、何故痛みが周期的に生じるかは明らかではない。このような周期性は生物時計と関係することが知られている。生物時計のうち circadian rhythm は非常によく研究されているが、それよりも長い周期の infradian rhythm による生物時計についてはほとんど研究が行われていない。本研究では、社会的ストレスを負荷した場合に、発現の変動する遺伝子を見出した。また、社会的ストレスを与えたマウスでは、疼痛閾値が低下することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Although it is well-known that social stress induces periodic pain, the mechanism of this pain still remains unclear. This periodicity is associated with biological clock. Circadian rhythm is well-studied whereas little is known about infradian rhythm. We found a fluctuated gene and the decrease of pain threshold in mice which have been loaded a social stress.

研究分野：口腔外科学

キーワード：インフラディアン リズム ストレス 痛み

1. 研究開始当初の背景

社会的ストレスは周期的な痛みを生じさせることがあるが、何故痛みが周期的に生じるかは明らかではない。このような周期性は生物時計と関係することが知られている。生物時計のうち約24時間を刻むサーカディアンリズム(概日リズム)は非常によく研究されているが、それよりも長い周期による生物時計についてはほとんど研究が行われていない。

社会的ストレスが原因もしくは増悪因子と考えられる疾患は数多く、社会的ストレスは周期的な痛みを生じさせる。ストレスはサーカディアンリズムに影響を及ぼすことがわかっており(Tamashiro KL, Stress 2011)痛みとサーカディアンリズムについての関連も指摘されている(Junker U, J Oncol Pharm Pract 2010)。

生物に内在する生物時計はさまざまな生理現象を制御している。その周期は分単位、時間単位、日単位、月単位、あるいは年単位などのリズムがあることが知られている。このうち、およそ24時間のサーカディアンリズムに関しては研究が進んでおり、サーカディアンリズムを支配する時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が同定されている。また、これらの遺伝子の異常は癌・代謝性疾患など多くの疾患の発症や進行などに関連することが徐々に明らかになりつつある(Kelleher FC, Cancer Lett 2014; Maury E, Diabetes Metab 2014)。

一方で、日単位より長い周期のインフラディアンリズムにより起こる生理現象も存在し、月経周期はこれにあたる。最近、Zantkeらは海洋環形動物 *Platynereis dumerilii* においてサーカディアンリズム以外にインフラディアンリズムであるサーカルナーリズム(概月リズム)が存在し、サーカルナーリズムを司る遺伝子群がサーカディアンリズムとは独立のものであることを発見した(Zantke J, Cell Rep 2013)。哺乳類においてはインフラディアンリズムを制御する遺伝子群が存在するののかもわかっていない。インフラディアンリズムと疾患とのかわりについては、例えば、静脈血栓症は冬期に発症しやすいこと(Dentali F, Thromb Haemost 2011)、抑うつ状態は1 - 2週間のサイクルで生じること(Benedetti F, J Affect Disord 1996)など日単位よりも長い周期で症状が出現する疾患も存在するものの報告は少ない。このように、インフラディアンリズムに関してはほとんど研究されていないのが現状である。

口腔外科疾患においては、舌痛症・非定型顔面痛などは社会的ストレスと痛みが関連していると考えられている疾患である。有効な治療はなく、対症療法として抗不安薬の投薬も行われるが、無効な場合もある。舌痛症などの痛みは時に周期的であるが、サーカディアンリズムなど周期性との関連はあき

らかではない。

最近、慢性ストレスと痛みとの関係について細胞レベルで明らかとなり、慢性ストレスによる視床下部 - 下垂体 - 副腎軸の活性化で、神経細胞において痛み受容体であるTRPV1受容体が誘導される(Zheng G, Exp Neurol 2015)。つまり、慢性ストレスにより痛みが誘導されると考えられている。

2. 研究の目的

生体レベルで社会的ストレスを負荷し、1ヵ月の期間で変動する遺伝子を調べること、痛みの閾値の変動を調べることが目的とした。

3. 研究の方法

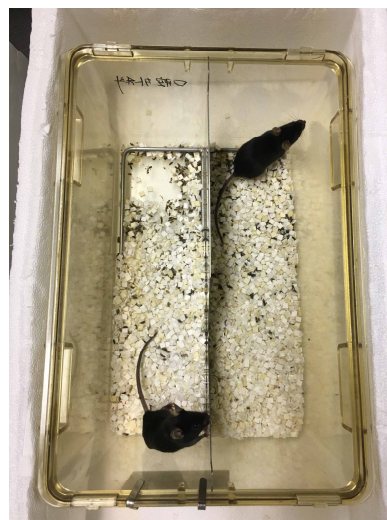
(1)社会的ストレス負荷マウスの作製

社会的ストレスをマウスに与える実験系を確立することを目指した。Unnoらによる対面飼育の方法を採用した(Unno K, Free Radic Res. 2011)。2匹のマウスを、ステンレス製の仕切り板で2つに区切ったケージ(日本クレア社製特注;写真1)に1匹ずつ入れ単独飼育を行うことで、マウスにナワバリ意識を確立させた後、仕切り板を外して2匹の対面飼育を行った。

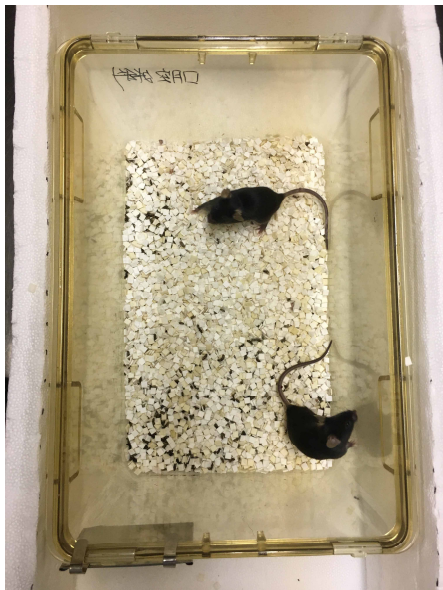
マウスは互いを侵入者とみなすが、これらマウスは2匹とも居住者でもある。仕切り板を外した直後に2匹の間では互いのニオイを嗅ぐ、追いかける、一方が他方に乗りかかる、などの行動が観察されることから、2匹の間には優劣の関係が成立している。その後2匹のマウスはどちらも外傷を負うことはなく普通に生活し、体重の減少なども認められない。この方法では、マウスの副腎は肥大しており、視床下部 - 下垂体 - 副腎軸が活性化されている。

本研究では、以下の飼育に分けた。

- # 1. 単独飼育(写真1)
- # 2. 対面飼育(写真2)
- # 3. 群飼育

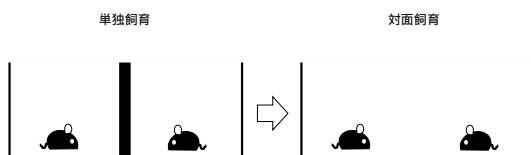


(写真1)



(写真 2)

各飼育においては、5 日間の慣らし飼育期間を設けた。慣らし飼育とは、全てのマウスを同じケージで飼育することである。マウスは野生型 4 週齢 C57BL/6J マウスを用いた。単独飼育では 2 匹のマウスを 1 か月間同じケージで飼育する。対面飼育を行う場合、2 匹のマウスを仕切り板を入れたまま 1 週間単独飼育を行う。これは、優劣関係を付けるためである。その後、仕切り板をはずし、対面飼育で 4 週間とした (図 1)。



(図 1)

群飼育は 4 匹のマウスを同じケージで 1 か月間飼育した。1 か月間の飼育期間中、1 週間ごとに、0 週目、1 週目、2 週目、3 週目、4 週目で尾静脈から採血を行った。

(2) DNA マイクロアレイ

血液に存在する白血球から RNA を抽出する方法がある。これには RiboPure™-Blood Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いた。RNA を抽出することによって発現する遺伝子の網羅的解析を DNA マイクロアレイにより行うことが可能である。DNA マイクロアレイは検体の遺伝子発現量の変化を解析するために、多数の DNA 断片を樹脂やガラス等の基板上に高密度に配置したチップを用いる方法である。RNA を抽出した後、GeneChip™ Mouse Transcriptome Array 1.0 (Thermo Fisher Scientific)、GeneChip™ Hybridization, Wash, and Stain Kit (Thermo Fisher Scientific) および GeneChip WT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA マイクロアレイを行った。

(3) コルチコステロン濃度測定

1 か月後、対面飼育のマウスについて、優劣関係が成立しているかどうかを調べるために、血液中のコルチコステロン濃度を Corticosterone ELISA kit (ENZ-ADI900097-96WELL; Enzo Life Sciences) を用いて測定した。

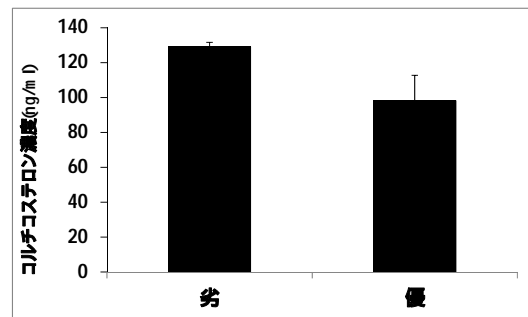
(4) 皮膚への機械刺激および熱刺激に対する逃避閾値の測定

成人期の社会心理的ストレスにより発症する異常疼痛発症メカニズムを解明する目的で、顔面皮膚領域の痛覚閾値の変化を調べた。口髭部皮膚への機械刺激および熱刺激に対する逃避閾値を単独飼育開始前から飼育終了後まで経日的に計測した。

4. 研究成果

(1) 社会的ストレス負荷マウスの確立

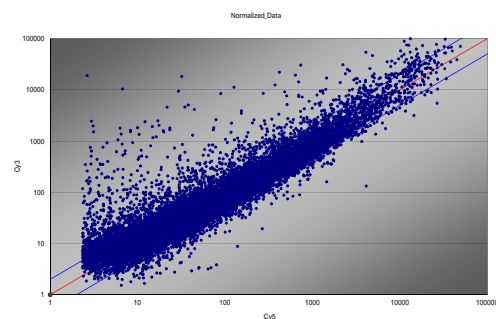
対面飼育のマウスでは 2 匹の間では互いのニオイを嗅ぐ、追いかける、一方が他方に乗りかかる、などの行動が観察されたことから、2 匹の間には優劣の関係が成立していた。血液中のコルチコステロン濃度の測定においても、劣マウスは優マウスよりも有意に高かった (図 2)。



(図 2)

(2) 変動遺伝子の探索

次に DNA マイクロアレイにて 1 週間ごとに変動する遺伝子を調べた (図 3)。0, 1, 2, 3, 4 週で経時的に上昇して低下する遺伝子は見いだせなかった。しかしながら 0 週から 2 週で発現が 2 倍以上、上昇し、4 週まで発現が 0.5 倍以下に低下する遺伝子 Xrs12 (仮名称) を見出した。



(図 3)

(3) 皮膚への機械刺激および熱刺激に対する逃避

次に口髭部皮膚への機械刺激および熱刺激に対する逃避閾値を測定した。実験群で経時的に逃避閾値が減少し、24日目で最も低い値を示した(表1)。

日	Head withdrawal threshold (g)			
	mouse 1	mouse 2	mouse 3	mouse 4
0	60	50	30	30
1	60	50	60	60
4	30	40	60	60
7	60	30	50	60
10	40	50	40	50
13	40	60	50	50
16	15	40	8	30
19	26	40	10	15
22	15	30	8	26
25	10	30	8	15
27	15	15	15	26
30	26	26	30	26

(表1)

今後は in vitro 実験で遺伝子 Xrs12 がインフラディアンリズムに関係するかどうかを検討していきたい。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 毅 (SATO, Tsuyoshi)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 60406494

(2) 研究分担者

水野 洋介 (MIZUNO, Yosuke)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 30406532