

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K09038

研究課題名(和文) ストレス性痛覚過敏 - 下行性疼痛調節系の機能変化とエピジェネティクスの関与

研究課題名(英文) Stress-induced hyperalgesia : Functional changes in descending pain modulation system and involvement of epigenetics

研究代表者

井辺 弘樹 (Imbe, Hiroki)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：60326353

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)：本研究において、慢性ストレスが機械的感覚過敏を生じ、吻側延髄腹内側部GABAニューロンでアセチル化ヒストン H3 を増加することが明らかとなった。そして、吻側延髄腹内側部でGAD67発現の増加も確認された。さらに、下行性疼痛調節系を制御する内側視索前野でpCREB やアセチル化ヒストンH3 の有意な増加が認められた。内側視索前野の pCREB 陽性細胞数や、アセチル化ヒストンH3 陽性細胞数とラットの機械的感覚閾値の間に負の相関関係があることが確認された。これら実験結果より、慢性ストレスによる機械的感覚過敏に吻側延髄腹内側部や内側視索前野のエピジェネティクスが関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性ストレスに暴露することにより人や動物に痛覚過敏が生じることが知られている。しかし、そのメカニズムは現在まで明らかにされていない。本研究により、世界で初めてストレス性痛覚過敏を生じたラットにおいて、下行性疼痛調節系の脊髄への重要な出力部位である吻側延髄腹内側部とその活動を制御する内側視索前野において、ヒストンアセチル化の増加が確認された。本研究は、慢性ストレスによる痛覚過敏に下行性疼痛調節系やその活動を制御する高位中枢のエピジェネティクスが関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have found that the chronic stress produces mechanical hypersensitivity and increases acetylated histone H3 in GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla. We have also found the increase of GAD67 expression in the rostral ventromedial medulla. Furthermore, the significant increases in pCREB and acetylated histone H3 in the medial preoptic area, which regulates the descending pain modulation system, have been found. The negative correlations between the number of pCREB-positive cells or acetylated histone H3-positive cells in the medial preoptic area and the mechanical threshold in rats have been confirmed. These experimental results suggest that epigenetics in the rostral ventromedial medulla and medial preoptic area are involved in mechanical hypersensitivity induced by chronic stress.

研究分野：疼痛学

キーワード：ストレス 疼痛学 下行性疼痛調節系 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

痛みの強さは不安や恐怖などの情動、注意、予期といった種々の因子により大きく変化する。急性の心理的ストレスは鎮痛作用を引き起こし、「運動競技中や戦争中に被った損傷は、受傷直後、大きな損傷でも比較的痛みを感じない。」ということがよく知られている。一方、慢性の心理的ストレスの患者では健常者にくらべて皮膚痛覚閾値が低下しており、慢性の心理的ストレスは疼痛を増強する作用があると考えられている。このような心理的ストレスによる痛みの変化は侵害情報伝達を調節する中枢神経系の活動に由来するものである。

人や動物の脳には、痛みをコントロールする下行性疼痛調節系が存在している。大脳皮質、視床下部、扁桃体などの高位中枢からの入力の中脳中心灰白質 (PAG) を介して、吻側延髄腹内側部 (RVM)、背外側橋中脳被蓋 (DLPT) へ伝えられる。RVM の大縫線核 (NRM) はセロトニン (5HT) を、DLPT の青斑核 (LC) はノルアドレナリン (NA) を含み、ともに脊髄側索を下行して脊髄後角に至り痛みを抑制する。モルヒネによる鎮痛もこの経路が重要な役割を果たすと考えられてきた。しかし、下行性疼痛調節系からの入力が神経障害性疼痛を長期間持続させているという衝撃的な報告がなされ、生理的条件下では疼痛を抑制する下行性疼痛調節系が、種々の特に慢性化した病態下では、逆に疼痛を増強させることが知られるようになった。

強制水泳ストレスは心理・身体的ストレスとされている。申請者らは、ラットに強制水泳ストレスを3日間負荷することで生じる痛覚過敏に RVM からの下行性疼痛増強入力が関与することを他に先駆けて明らかにした (Imbe et al. Brain Res. 1329:103-12, 2010)。さらに、申請者らはこれまでに、慢性ストレス後、吻側延髄腹内側部 (RVM) セロトニン神経系で細胞内情報伝達分子 ERK が活性化すること (Imbe et al. Pain. 112:361-71, 2004) を報告している。ERK の活性化はセロトニン生合成の律速酵素である tryptophan hydroxylase (TPH) の転写を促進しセロトニン産生を増加させることが知られており、我々も慢性ストレス後、RVM で TPH の増加を確認している。RVM からの下行性セロトニン入力が脊髄において 5HT₃ 受容体を介して疼痛を増強することから、RVM でのセロトニン産生の増加が慢性ストレス後の疼痛反応の増強に関与している可能性が十分に考えられる。

エピジェネティクスとは環境変化が遺伝子発現を長期的に調節するメカニズムであり、ゲノムに書かれた遺伝情報が変更されることなく、遺伝子が働いたり働かなかったりすることを可能にしている。予備実験において、強制水泳ストレス後、吻側延髄腹内側部および島皮質でヒストン H3 アセチル化の増加が確認された。慢性ストレスによる下行性疼痛調節系での遺伝子発現の変化にこのような細胞修飾は重要な意味を持つと思われる。これらの流れを踏まえて申請者らは、「慢性ストレスにより引き起こされる痛覚過敏の発現・維持に下行性疼痛調節系の可塑的变化が関与している。」という仮説を立てるに至った。

これまで、寒冷環境、拘束ストレス、強制水泳などに繰り返し暴露することにより、動物に痛覚過敏が生じることが報告されている (Imbe et al. Front Biosci. 11:2179-92, 2006, Review)。しかし、慢性ストレスが痛覚過敏を起こすメカニズムは現在まで明らかにされていない。

2. 研究の目的

慢性ストレス後、セロトニン神経系を含む下行性疼痛調節系にどのような変化が生じ疼痛反応に影響を与えるのか、そのメカニズムを明らかにしたい。

- (1) 慢性ストレス後の痛覚過敏における下行性疼痛調節系セロトニン入力の影響
- (2) 慢性ストレス後の下行性疼痛調節系におけるグリアを含む組織構築の変化
- (3) 慢性ストレス後の下行性疼痛調節系を構成する神経細胞の活動変化
- (4) 慢性ストレス後の痛覚過敏における下行性疼痛調節系でのエピジェネティクスの関与

3. 研究の方法

雄性ラット 150-300g を実験に使用した。

- (1) 実験 1

Naïve 群

強制水泳ストレスおよび complete Freund ' s adjuvant (CFA) 注射は行われていない。

CFA 群 足底に CFA 注射を行った。

FS+CFA 群

プラスチックシリンダー (幅 30cm、高さ 50cm) に 24-26 の水を 20cm の高さまで入れ、ラットに強制水泳ストレス (第 1 日 10min, 第 2-3 日 20min) を負荷した後、足底に CFA 注射を行った。

上記、動物群において、下行性疼痛調節系の活動を制御する大脳皮質 (島皮質、前帯状皮質) で、p-CERB、Egr-1 の発現を免疫組織学的に調査した。

(2) 実験 2

control 群

ラットに拘束ストレスは負荷されていない。

Repeated restraint 群 ラットに 1 日 6 時間の拘束ストレスを 3 週間負荷した。

上記、動物群において、吻側延髄腹内側部 (RVM) と青斑核 (LC) でアセチル化 histone H3 の発現を免疫組織学的に調査した。また、アセチル化 histone H3 と 5HT もしくは GAD67 の蛍光二重染色を行なった。さらに、吻側延髄腹内側部 (RVM) を摘出し、Western blot を用い、GAD67 の量を測定した。

(3) 実験 3

control 群

ラットに拘束ストレスは負荷されていない。

Repeated restraint 群 ラットに 1 日 6 時間の拘束ストレスを 3 週間負荷した。

上記、動物群において、下行性疼痛調節系の活動を制御する大脳皮質 (島皮質、前帯状皮質) および皮質下領域 (内側視索前野、視床下部背内側核、扁桃体) で、アセチル化 histone H3、p-CERB の発現を免疫組織学的に調査した。

4 . 研究成果

(1) 実験 1

強制水泳ストレス負荷により、CFA 注射による疼痛反応の有意な増加が確認された。さらに、CFA 注射により島皮質および前帯状皮質において、pCREB、Egr-1 の増加が確認されたが、CFA 注射より前に、強制水泳ストレスを負荷すると、CFA 注射による島皮質および前帯状皮質における pCREB、Egr-1 の増加が減弱することが明らかとなった。これら結果は、論文 (Imbe and Kimura. Brain Res Bull. 134:253-261, 2017) として掲載され第 95 回日本生理学会大会 (2018)、第 41 回日本神経科学大会 (2018) などにおいて発表した。

(2) 実験 2

ラットに 3 週間の慢性拘束ストレスを負荷するとラット後肢に有意な機械的感覚過敏が生じた。また、吻側延髄腹内側部でアセチル化ヒストン H3 陽性細胞の有意な増加が認められた。そして、吻側延髄腹内側部アセチル化ヒストン H3 陽性細胞数とラット後肢の機械的感覚閾値の間に負の相関関係があることが確認された。5HT ニューロンではアセチル化ヒストン H3 の増加は見られなかったが、GABA ニューロンではアセチル化ヒストン H3 の有意な増加が認められた。また GAD67 発現の増加も確認された。これら結果は、論文 (Imbe and Kimura. Brain Res Bull. 142:394-402, 2018) として掲載され、第 2 回日本心身医学関連学会合同集会 (2019)、第 42 回日本神経科学大会 (2019) などにおいて発表した。

(3) 実験 3

ラットに 3 週間の慢性拘束ストレスを負荷するとラット後肢に有意な機械的感覚過敏が生じた。そして、内側視索前野で pCREB 陽性細胞の有意な増加と内側視索前野、扁桃体基底外側核、島

皮質でアセチル化ヒストン H3 陽性細胞の有意な増加が認められた。さらに、内側視索前野の pCREB 陽性細胞数や、アセチル化ヒストン H3 陽性細胞数とラットの機械的感覚閾値の間に負の相関関係があることが確認された。これら結果は、論文 (Imbe and Kimura. Brain Res. 10.1016/j.brainres. 2020.146758. 2020) として掲載され、第 43 回日本神経科学大会 (2020) などにおいて発表した。

これら研究成果を参考にして下行性疼痛調節系とエピジェネティクスについて原稿依頼があり、英文著書の分担執筆 (Epigenetics of Chronic Pain” (Eds.) Bai G, Ren K. pp69-83, Academic Press publications, 2018) を行なった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imbe H, Kimura A	4. 巻 1735
2. 論文標題 Significance of medial preoptic area among the subcortical and cortical areas that are related to pain regulation in the rats with stress-induced hyperalgesia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 146758
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainres.2020.146758.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imbe H, Kimura A	4. 巻 142
2. 論文標題 Increase of histone acetylation in the GABAergic neurons in the rostral ventromedial medulla associated with mechanical hypersensitivity after repeated restraint stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Brain Res Bull.	6. 最初と最後の頁 394-402
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2018.09.004.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imbe H, Kimura A	4. 巻 134
2. 論文標題 Attenuation of pCREB and Egr1 expression in the insular and anterior cingulate cortices associated with enhancement of CFA-evoked mechanical hypersensitivity after repeated forced swim stress.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Brain Res Bull.	6. 最初と最後の頁 253-261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.brainresbull.2017.08.013.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Imbe, Akihisa Kimura
2. 発表標題 Significance of medial preoptic area among the subcortical and cortical areas that are related to pain regulation in the rats with stress-induced hyperalgesia
3. 学会等名 第43回日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroki Imbe, Akihisa Kimura
2. 発表標題 Increase of histone acetylation in the RVM GABAergic neurons associated with mechanical hypersensitivity after repeated restraint stress
3. 学会等名 第42回日本神経科学大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井辺弘樹、木村晃久
2. 発表標題 慢性ストレス後の機械的痛覚過敏に関連したRVM GABA ニューロンにおけるヒストンアセチル化の増加
3. 学会等名 第2回 日本心身医学関連学会合同集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Imbe, Akihisa Kimura
2. 発表標題 Increase of histone acetylation in the RVM in the rat with stress-induced hyperalgesia
3. 学会等名 9th FAOPS congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hiroki Imbe, Akihisa Kimura
2. 発表標題 Enhancement of inflammatory hyperalgesia and attenuation of transcription factor expression in the insular and anterior cingulate cortices after repeated forced swim stress
3. 学会等名 第41回日本神経科学大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井辺弘樹、木村晃久
2. 発表標題 慢性拘束ストレスによる吻側延髄腹内側部におけるヒストン H3 アセチル化の増加
3. 学会等名 第 111 回 近畿生理学談話会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroki Imbe, Akihisa Kimura
2. 発表標題 Enhancement of inflammatory hyperalgesia and changes of neuroplasticity in descending pain modulation system after repeated forced swim stress
3. 学会等名 第40回日本神経科学大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井辺弘樹、木村晃久
2. 発表標題 繰り返し強制水泳ストレスによる炎症性感覚過敏の増強と島皮質および前帯状皮質における pCREB、Egr-1の発現変化
3. 学会等名 第 110 回 近畿生理学談話会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井辺弘樹、木村晃久
2. 発表標題 繰り返し強制水泳ストレス後の CFA による機械的感覚過敏の増強に関連した島および前帯状皮質における pCREB と Egr-1 発現の減弱
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Imbe H	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Academic Press publication	5. 総ページ数 234
3. 書名 Emphasizing histone-related chromatin remodeling in the central nervous system of animal models of chronic pain. In “Epigenetics of Chronic Pain”	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>https://www.wakayama-med.ac.jp/med/physiology1/index.html</p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	木村 晃久 (Kimura Akihisa) (20225022)	和歌山県立医科大学・医学部・准教授 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------