

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K07370

研究課題名(和文)高社会性げっ歯類心理ストレスモデルで変調する疼痛制御回路の解析

研究課題名(英文)Analysis of brain circuits for pain in a psychological stress model in a highly social rodent.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：一夫一婦制げっ歯類をパートナーロスにすると、不安行動と炎症時の疼痛行動が増悪する。この心理ストレスモデルに炎症痛を惹起すると、視床下部室傍核でパートナー維持群よりcFosが多く発現した。痛みのない状態での視床下部室傍核では、維持群よりロス群でFosBが有意に多く発現し、バゾプレッシンとコルチコステロン放出因子の免疫反応性が高かった。さらに、疼痛関連脳領域の1つである扁桃体でもコルチコステロン放出因子の免疫反応性が高かった。これらの結果より、パートナーロスストレス下では、視床下部室傍核でのコルチコステロン放出因子ニューロンの慢性的な活性化を通して脳内痛み情報処理が変調する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

社会的な一夫一婦制げっ歯類において絆を形成したパートナーと別離すると不安がりになり、炎症時の痛みが悪化する。本研究で、この心理社会的ストレスモデルに炎症痛を惹起させると、パートナーと同居している状態に比べて、視床下部室傍核ニューロンが強く反応した。痛みを惹起しない状態でも、パートナーとの別離期間に視床下部室傍核ニューロンが活性化し、ストレス反応に關与するバゾプレッシンとコルチコトロピン放出因子ニューロンの免疫活性が高くなっていた。近年、慢性痛の発症に心理社会的ストレスが關与している可能性が示唆されており、本研究における成果は慢性痛の発症メカニズムの解明に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)： We have reported an animal model of psychological stress-induced hyperalgesia in a monogamous rodent, males separated from their female partners (loss males) became anxious and displayed exacerbated inflammatory pain behaviors. During inflammatory pain, the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) in the loss males had significantly higher cFos-immunoreactivity (ir) compared to the paired males. Under no pain condition, the PVN in the loss males showed higher FosB-ir, vasopressin-ir and corticotropin releasing factor (CRF)-ir than the loss males. The amygdala is one of the pain-related brain regions where cFos expression differed between the paired and loss males during inflammatory pain, and also exhibited higher CRF-ir in the loss males in the present study. The present results suggest the possibility that neurochemical alterations in the PVN during the period of psychosocial stress exacerbate pain behaviors.

研究分野：神経解剖学

キーワード：心理ストレス

1. 研究開始当初の背景

個人の痛みの感じ方は、個人が抱える心理的要因に大きく影響される。特に心理的ストレスにより痛みが増悪することが知られている。これまで、ストレスによる痛みの修飾として『ストレス性鎮痛』がよく知られていたが、これは急性的な強い身体的ストレスによるものである。しかし、臨床で問題になっている慢性痛患者の多くが心理的ストレスを抱えていることから、慢性的な心理的ストレスは、『ストレス性鎮痛』とは別の痛みの修飾回路である『ストレス性痛覚過敏』を引き起こし、慢性痛の発症基盤として関与している可能性がある。これまで、種々のストレス動物モデルによる痛みの解析が報告されてきたが、『ストレス性鎮痛』と『ストレス性痛覚過敏』を示すものが混在しており、ストレスの質(強度や種類)により駆動される痛みの修飾回路が異なることが考えられる。そこで、申請者は、一夫一婦性げっ歯類を用いて痛みの心理ストレス修飾モデルを独自に確立した。このモデルは、絆を形成しているパートナーを失うと(パートナーロス)、新規環境における不安行動が増加し、さらに炎症時における痛み関連行動が増悪し、慢性痛患者と同様の症状を示す。この高社会性げっ歯類による痛みの心理ストレス修飾モデルは、ストレス性痛覚過敏の発症メカニズムを探索するための有用な動物モデルと考える。

2. 研究の目的

本研究で用いる痛みの心理ストレス修飾モデルにおいて、炎症時において疼痛関連脳領域の活性パターンが、パートナーと同居を継続するもの(パートナー維持群)と異なるパターンを示すことが明らかになっている。このパートナーの有無の影響を受ける疼痛関連脳領域の一部が、一夫一婦制げっ歯類の絆形成に重要な脳内回路の構成領域とオーバーラップする。さらに、絆形成に重要であるいくつかの分子(オキシトシン、コルチコトロピン放出因子、ドーパミンなど)が、疼痛関連脳領域で内因性疼痛制御系として作用することが近年明らかになってきている。そこで、一夫一婦制げっ歯類による痛みの心理ストレス修飾モデルにおける、これらの絆と疼痛関連共通分子の動態を神経化学的、行動薬理的に解析する。

3. 研究の方法

本研究での解析はすべて、すでに確立している一夫一婦制げっ歯類による痛みの心理ストレス修飾モデルを用いた。一夫一婦制げっ歯類の雌雄に1週間の同居により絆を形成させた。絆の評価は、パートナープリファレンステストによりパートナーへの選択的嗜好性を確認することにより行った。その後の実験には、絆の確認されたペアのみを用いた。プリファレンステスト終了直後に、各ペアの雄を、パートナーと同居を継続する群(維持群)とパートナーを失う群(ロス群)に分け、さらにその1週間後に両群とも後肢足底皮下に5%ホルマリンを注入することで炎症性疼痛を惹起させた。炎症誘発2時間後に4%ホルムアルデヒド溶液で経心臓灌流固定し被験雄から脳を採取した。後日、クリオスタットで採取脳から凍結切片を作製し、標的分子の抗体を用いて免疫組織化学染色を行い、その染色像を撮影し、解析ソフトImageJを用いて免疫反応性(陽性細胞数、陽性神経終末の分布密度、蛍光強度)を解析した。標的分子は、絆形成と疼痛制御の関連共通分子であるオキシトシン、バズプレッシンおよびコルチコトロピン放出因子、神経細胞活性化マーカーである最初期遺伝子群c-FosとFosBとした。解析領域は、オキシトシン、バズプレッシン、コルチコトロピン放出因子の産生ニューロンが存在する視床下部室傍核、それらの投射領域である前頭前野、側坐核および扁桃体中心核とした。維持群・ロス群ともに、すべての解析において、炎症を惹起しない状態(痛みなし群)と炎症を惹起した状態(痛みあり群)で比較を行った。

4. 研究成果

(1) 1週間の同居後にパートナー雌との間に形成された絆を評価する目的で、痛みなし群と痛みあり群それぞれにおける維持群とロス群の雄において、パートナー雌に対する親和行動(寄り添う、相手の毛繕いをするなど)の発現量をプリファレンステストで行動学的に解析した。その結果、痛みなし・ありのどちらの状態においても、維持群・ロス群ともに、ストレンジャー(馴染みのない雌)よりパートナーに対して有意に多く親和行動を示し、すべての群においてパートナー雌に対する嗜好性が形成され、その程度に違いはなかった(図1)。

(2) プリファレンステスト終了後、パートナーと同居を継続する群(維持群)もしくはパートナーを失う群(ロス群)に分け、その6日後に後肢足底皮下にホルマリンを投与し炎症を惹起させると(痛みあり群)、維持群・ロス群ともに、視床下部室傍核において、神経活性化マーカーであるc-Fosタンパクの発現が検出された。炎症を惹起しなかった状態(痛みなし群)の発現量と比較すると、維持群においてはより多く発現する傾向にあったものの有意差は検出されなかった。それに対して、ロス群においては、痛みなし群より有意に多く発現しており、維持

群の発現量との間にも有意差が検出された（図2A）。これらのことから、一夫一婦制げっ歯類において、炎症性疼痛に視床下部室傍核ニューロンが活性化すること、さらに、痛み刺激を加えた場合にのみ維持群とロス群間においてc-Fos発現量に有意差が検出されたことから、視床下部室傍核ニューロンの痛み刺激に対する反応性がパートナーの有無により異なることが示唆された。さらに、c-Fosと同じ最初期遺伝子群に含まれるFosBについて、視床下部室傍核における発現を免疫組織化学的に解析した。その結果、維持群・ロス群ともに、痛みなしより痛みありで有意に多くのFosBが発現した。さらに、痛みなしの状態におけるFosBの発現量が、維持群よりロス群において有意に多かった（図2B）。これらの結果は、同じ条件下において、痛みの心理ストレス修飾モデルにおける視床下部室傍核ニューロンでのc-FosとFosBの発現が異なることを示している。これらの発現差は、c-Fos遺伝子は急性刺激入力時においてその発現が誘導されるのに対し、FosB遺伝子は主に慢性刺激に反応し発現が誘導されることによるものと考えられる。ただし、今回の解析では、維持群・ロス群ともに、痛みなしの状態より痛み刺激入力時にFosBの発現が有意に増加した。このことに対して、FosBの発現を検出するために用いた抗体の特異性が影響しており、c-Fosの一部にも抗体が反応したためと考えられる。これらの結果から、痛みのない状態における維持群・ロス群間にみられたFosB発現差は、パートナーロスによる慢性的心理ストレスを反映しており、視床下部室傍核ニューロンが心理ストレスにより慢性的に活性化している可能性が示唆された。さらに、その慢性的な活性化により、視床下部室傍核ニューロンの痛み刺激に対する反応性が増大し、慢性的心理ストレス下において疼痛行動が増悪する可能性がある。

(3) (2)において、パートナーロスにより、視床下部室傍核ニューロンが慢性的に活性化することが示唆された。そのためには、パートナーと別離している間もパートナーのことを記憶しており、パートナーに対する嗜好性が維持されている必要がある。そこで、パートナーと別離する前と6日間の別離期間終了後の2回パートナープリファレンステストを実施し、被験雄のパートナー雌に対する親和行動量を比較した。その結果、別離期間終了後においても、別離前と同等の親和行動をパートナーに対して選択的に示した（図3）。この結果より、一夫一婦制げっ歯類は、身体的接触がまったくなくても、パートナーを記憶しており、愛着が維持されることが明らかになった。(2)と考え合わせると、一夫一婦制げっ歯類は、ひとたび絆を形成したパートナーとは、同居していなくてもその絆が維持され、そのことにより、別離期間中を通して視床下部室傍核ニューロンが慢性的に活性化されることが示唆される。

(4) (2)・(3)より、パートナーロス心理ストレスにより、慢性的に視床下部室傍核ニューロンが活性化され、そのことが痛み行動の増悪を引き起こす可能性が示唆された。そこで、視床下部室傍核に存在して、かつ、一夫一婦制げっ歯類の絆の形成と内因性疼痛制御の関連共通分子であるコルチコトロピン放出因子、オキシトシンおよびバゾプレッシンについて、パートナーロス期間中にどのように変化するか免疫組織化学的に解析した。その結果、コルチコトロピン放出因子とバゾプレッシンについては、ロス群で維持群より有意に免疫反応性が高くなっていた。オキシトシンについては維持群・ロス群間で差は検出されなかった（図4）。これらの結果より、視床下部室傍核に存在する絆形成に重要な分子であるコルチコトロピン放出因子とバゾプレッシンニューロンの発現が、パートナーロスに伴う慢性的な心理ストレスにより変化することが分かった。これら分子は、近年、内因性疼痛制御系として機能することが報告されていることから、パートナーロスに伴うこれらの神経科学的变化が、疼痛関連行動の変化を引き起こすことが示唆された。

(5) (4)において、パートナーロスにより、視床下部室傍核のコルチコトロピン放出因子の発現が変化することが分かった。本研究の心理ストレスモデルにおいて、炎症時の疼痛関連脳領域の活性パターンが維持群と異なることが明らかになっている。特に、中脳ドーパミン回路の主要構成領域である前頭前野、側坐核と扁桃体中心核において、その活性が維持群よりロス群で有意に低かった。さらに、これらの領域にはコルチコトロピン放出因子ニューロンが投射していることから、前頭前野、側坐核と扁桃体中心核におけるコルチコトロピン放出因子ニューロン神経終末の免疫反応性を解析した。その結果、ロス群の扁桃体中心核における免疫反応性が、維持群より高い傾向にあった。コルチコトロピン放出因子を脳室投与されたラットにおいて、その疼痛行動が増悪したとの報告があることから、本研究の心理ストレスモデルにみられる痛み行動の増悪メカニズムに、扁桃体におけるコルチコトロピン放出因子の発現変化が関与している可能性が示唆された。

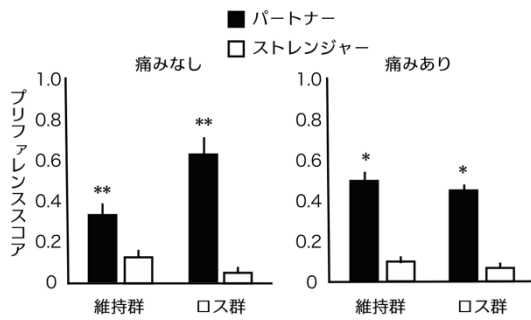


図1 プリファレンステストにおける親和行動発現量(プリファレンススコア)；すべての群において、パートナーに対する嗜好性が検出された。

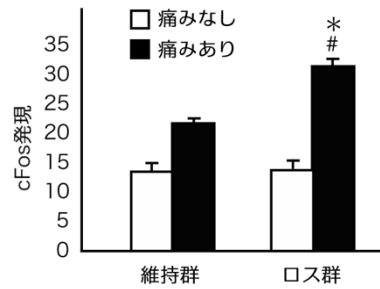


図2A 視床下部室傍核におけるc-Fos発現
痛みなしの状態では維持群・ロス群のc-Fos発現に差はなかった。痛み刺激を加えると、ロス群のみ痛みなしに比べて有意に多く発現し(#)、その発現は維持群より有意に多かった(*)。

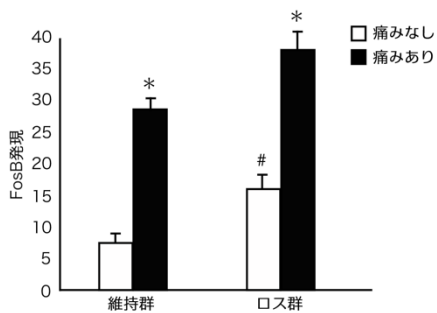


図2B 視床下部室傍核におけるFosB発現
維持群・ロス群ともに、痛み刺激によりFosBが有意に多く発現した(*)。痛みを加えていない状態では、維持群よりロス群で有意に多く発現していた(#)。

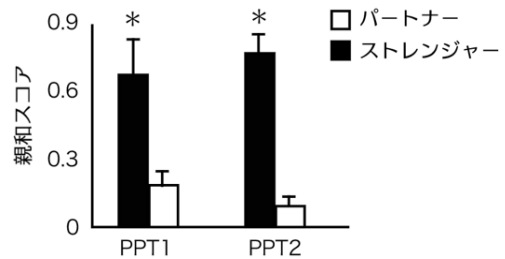


図3 別離前と別離後におけるパートナープリファレンステスト
パートナーと別離6日後(PPT2)においても別離する前(PPT1)と同様に、パートナーに対してストレンジャーより有意に多くの親和行動を示した(*)。

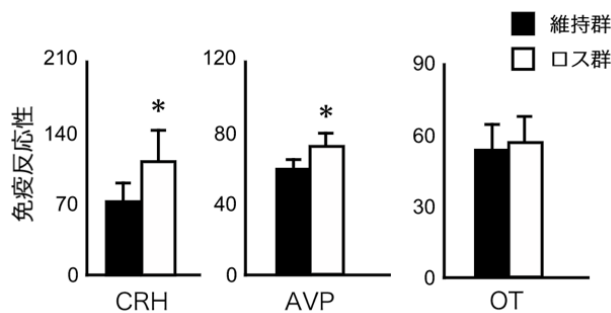


図4 パートナーとの別離後における視床下部室傍核の神経化学的変化
コルチコトロピン放出因子(CRF)とバゾプレッシン(AVP)において、ロス群で維持群より免疫反応が有意に高く(*)、オキシトシン(OT)では変化がみられなかった。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kenjiro Tanaka, Yoji Osako, Kou Takahashi, Chiharu Hidaka, Koichi Tomita, Kazunari Yuri	4. 巻 5
2. 論文標題 Effects of Post-Weaning Social Isolation on Social Behaviors and Oxytocinergic Activity in Male and Female Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e01646
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2019.e01646.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yu Hirota, Aki Arai, Larry J Young, Yoji Osako, Kazunari Yuri, Shinichi Mitsui	4. 巻 120
2. 論文標題 Oxytocin Receptor Antagonist Reverses the Blunting Effect of Pair Bonding on Fear Learning in Monogamous Prairie Voles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Hormones and Behavior	6. 最初と最後の頁 104685
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.yhbeh.2020.104685.	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 該当する

1. 著者名 Takahiro Okuda, Yoji Osako, Chiharu Hidaka, Makoto Nishihara, Larry J Young, Shinichi Mitsui, Kazunari Yuri	4. 巻 418
2. 論文標題 Separation from a bonded partner alters neural response to inflammatory pain in monogamous rodents	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Behavioural Brain Research	6. 最初と最後の頁 113650
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbr.2021.113650	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yoji Osako, Reiko Nobuhara, Takahiro Okuda, Chiharu Hidaka, Young-Chang P Arai, Makoto Nishihara, Larry J. Young, Kazunari Yuri
2. 発表標題 Chronic pain impairs pair-bond maintenance in monogamous rodents, prairie voles
3. 学会等名 IBRO2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takahiro Okuda, Yoji Osako, Kou Takahashi, Kenjiro Tanaka, Takao Okabe, Hideaki Takebayashi, Larry J. Young, Takahiro Ushida, Kazunari Yuri
2. 発表標題 Modulation of nociception by social bonds in the monogamous rodent: c-Fos expression in the brain "pain matrix" under conditions of inflammatory pain
3. 学会等名 IBRO2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田 教宏、大迫 洋治、高橋 弘、田中 健二郎、日高千春、井上 佳和、竹林 秀晃、由利 和也
2. 発表標題 心理社会的ストレス下における侵害刺激による疼痛関連脳領域のc-Fos発現について
3. 学会等名 第124回日本解剖学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	大迫 洋治 (Osako Yoji) (40335922)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授 (16401)	

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		
米国	Emory University School of Medicine		