

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07390

研究課題名(和文) ラモトリギンによる痛み-恐怖記憶の消去促進効果に対する神経幹細胞の関与

研究課題名(英文) The involvement of neural stem cells in promoting elimination of pain-fear memory by lamotrigine

研究代表者

小山 なつ (Koyama, Natsu)

滋賀医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50135464

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：神経幹細胞の自己複製能と恐怖記憶に対する、気分安定薬であるラモトリギンの作用を解析した。ニューロスフェアによる In vitroでの自己複製能の解析では、ラモトリギンによる用量依存性の細胞塊の増殖効果が認められた。BrdU法により In vivoでの解析においても、ラモトリギン12週間投与により上衣下帯：SEZと歯状回顆粒細胞下層：SGZに新生ニューロンを産み出すニューロンプールの増大が認められた。恐怖条件付けテストでの連合学習時の恐怖反応は増強したが、恐怖記憶の亢進は認められなかった。以上の結果から、ラモトリギンによる神経幹細胞の自己複製能の亢進は過剰な恐怖反応を防止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

慢性痛を訴える成人は、意外なことに働き盛りの世代で最も多く、慢性痛による経済的損失を減少させるために、慢性痛のメカニズムを解明する研究は重要である。「恐怖回避モデル」が背景にある慢性の痛みに対しては、痛みに対する過剰な恐怖記憶の鎮静化が治療において重要となると考えられる。気分安定薬作用のあるラモトリギンによる、神経幹細胞の事項複製能の促進作用と恐怖記憶の鎮静化作用が確認されれば、副作用の出ない用量でのラモトリギンの投与は、難治性の慢性痛に対して行われる運動療法と心理療法の効果を促進させる可能性が予想される。

研究成果の概要(英文)：The effects of lamotrigine, an anticonvulsant drug with mood stabilizing effect, on the self-renewability of neural stem cell and on the fear memory were analyzed. In vitro analysis of self-renewability by neurosphere assay of the periventricular region showed increased proliferation of cell masses in a lamotrigine dose-dependent manner. In vivo analysis by the BrdU method also showed that administration of lamotrigine for 12 weeks amplified the progenitor pool producing new neurons in the subependymal zone: SEZ and subgranular zone: SGZ of the hippocampal dentate gyrus. In the fear conditioning test, fear responsiveness during associative learning was enhanced, but no enhancement of fear memory was observed. These results suggest that the enhancement of self-renewability of neural stem cell by lamotrigine may prevent excessive fear response.

研究分野：神経生理学

キーワード：ラモトリギン 恐怖回避モデル 神経幹細胞 ニューロスフェア Brdu 恐怖記憶の消去

1. 研究開始当初の背景

痛みの慢性化を説明するメカニズムに、「恐怖回避モデル」がある（Vlaeyen et al., Pain, 2000）。痛みに対する不快感や恐怖心は、急性期においては身体を安静にすることで治癒に結びつくが、痛みに対する恐怖記憶は治癒の過程でのさまざまな体験により、新たな記憶に塗り替えられていく。しかしマイナス思考や深刻な疾患の情報により、痛みに対する恐怖が増幅されると、うつ状態になったり、過剰適応し、慢性痛の悪循環サイクルに陥るので、慢性痛サイクルを回す原動力の一部は、痛みに対する恐怖の記憶であると考えられる。恐怖記憶の形成には、扁桃体と海馬の神経回路に新生ニューロンが組み込まれることによって、記憶が定着するとされる。神経幹細胞-神経細胞新生システムのエピジェネティクス研究において、気分安定薬であるリチウム、バルプロ酸、カルマバゼピンは構造が全く異なるのに、神経幹細胞の自己複製能を亢進させることが報告されている（Higashi et al., Stem cells, 2008）。バルプロ酸とカルマバゼピンは鎮痛効果がある抗てんかん薬でもあるが、後発の気分安定作用がある抗てんかん薬であるラモトリギンも電位依存性 Na^+ チャネルの遮断効果があるので、痛みをも抑制する可能性がある。ラモトリギンにも神経新生促進作用と恐怖記憶の鎮静化作用が確認されれば、慢性痛サイクルに陥っている患者の恐怖記憶を鎮静化させる可能性と、気分安定薬のメカニズムに神経幹細胞が関与するというエビデンスを増やすことにも結びつくと考えた。

2. 研究の目的

痛みに伴われる不安・恐怖は防御反応を補う働きをするが、過剰な恐怖記憶が持続すれば、痛みも慢性化する。「恐怖回避モデル」が背景にある慢性の痛みに対しては、痛みに対する過剰な恐怖記憶の鎮静化が治療となると考えられる。しかし「恐怖回避モデル」のメカニズムが明らかでないこともあり、「恐怖の鎮静化による痛みの緩和」を主眼とする研究は見当たらない。本研究の目的は、ラモトリギン慢性投与マウスにも、神経新生の促進と恐怖記憶の鎮静化が生じるかを解析することである。それが確認されれば、神経幹細胞の活性化が気分安定薬と慢性の痛みの緩和に共通するメカニズムというエビデンスとなる。新規の慢性痛治療薬の開発には時間がかかるが、ラモトリギンは本邦では抗てんかん薬及び気分安定薬として承認されているので、慢性の痛みに対しても適応が拡大されれば、慢性の痛みにも苦しむ患者のQOLを高めることに繋がる。薬物療法が奏功しない難治性の慢性痛に対しては、運動療法と心理療法が行われるが、副作用の出ない用量でラモトリギンを投与すれば、運動療法と心理療法の効果をさらに促進する可能性が予想される。

3. 研究の方法

実験はすべて C57BL6 系雄マウスを対象とした。

① in vitro での神経幹細胞の自己複製に対する効果の解析法

新規抗てんかん薬として、ラモトリギン、レベセラチタム、トピラマート、ガバペンチンが承認されているが、気分安定作用はラモトリギンのみに認められている。この4剤による神経幹細胞/神経前駆細胞の自己複製能を neurosphere 法で評価した。成体マウスから取り出した脳

室周囲領域の組織を、上皮増殖因子 (EGF) と線維芽細胞増殖因子-2 (FGF-2) を含む無血清培地に、これらの薬剤を加えて浮遊培養すると、その薬剤に神経幹細胞の自己複製能の促進効果があれば、未分化な神経系細胞のコロニーである球形の細胞塊 (1次ニューロスフェア) が形成され、この細胞塊を単一細胞に分散して継代すると、再度ニューロスフェア (2次ニューロスフェア) が形成される。

② in vivo での神経新生の解析法

ラモトリギン (10 mg/kg) を C57BL/6 系雄マウスに 1、4、8、12 週間連日腹腔内投与し、PBS を投与したマウスを対照群とした。プロモデオキシウリジン (BrdU) はチミジンのアナログであり、細胞周期の S 期において新たに合成される DNA に取り込まれるので、増殖した細胞数を評価できる。16 週齢あるいは 20 週齢時に BrdU (Sigma; 50 mg/kg, 5 回/日) を腹腔内投与し、最終投与の 3 時間後に灌流固定した。後日凍結連続標本を作製し、免疫組織化学的手法により、BrdU でラベルされた細胞をカウントした。側脳室の外側壁に面した上衣下帯 (subependymal zone ; SEZ)、および海馬歯状回顆粒細胞下層 (subgranular zone of DG : SGZ) には、神経幹細胞は成体でも局在することが知られているので、SEZ および SGZ を主な解析領域とした。

③ 情動および、情動記憶に関する行動解析法

恐怖条件付けテスト (16 週齢) で恐怖記憶を解析した。マウスに場所 (文脈) や音 (手がかり) による条件刺激と、電気ショック (無条件刺激) を組み合わせて与えて、恐怖条件づけによる連合学習をさせる。条件付けられた恐怖記憶はフリージング時間を指標として、条件づけ学習の翌日 (近接記憶) および、4 週間後 (遠隔記憶) に、文脈テストと手がかりテストで評価した。恐怖条件付けテストの他、オープンフィールドテスト (10 週齢)、プレパルスインヒビションテスト (12 週齢)、ソーシャルインターアクションテスト (14 週齢) も行った。

4. 研究成果

ラモトリギンの神経幹細胞の自己複製に対する効果の in vitro での解析

ラモトリギンはバルプロ酸やカルバマゼピンと同様に、用量依存性に 1 次ニューロスフェアおよび、2 次ニューロスフェアの増殖を亢進させた。しかも毒性効果がある高用量では亢進が抑制された。またレベセラチタム、トピラマート、ガバペンチンでは、ニューロスフェア形成の促進効果は認められなかった。以上の結果から気分安定作用をもつラモトリギンのみが成体脳において神経幹細胞の自己複製能を促進させる作用があることが確認された。

ラモトリギンの神経新生に対する効果の in vivo での解析

1週間、4週間、8週間投与でのSEZおよびSGZにおいて、BrdUでラベルされた細胞数はラモトリギン投与群と対照群の間に有意差は認められなかったが、ラモトリギン8週間投与群においては陽性細胞数は多い傾向がみられた。ラモトリギン12週間投与群では、SEZおよびSGZ共に、BrdU陽性細胞の有意な増加が認められた。SEZにはゆっくりとした分裂により自己複製する神経幹細胞（Type B cell）だけではなく、増殖の速い一過性増殖細胞（Type C cell）や新生ニューロン（Type A cell）も局在する。今回行ったBrdUのshort-term解析で、ラモトリギンが新生ニューロンを産み出す神経幹細胞/神経前駆細胞のプールサイズを増大させたと示唆されるが、新生されたニューロンが神経回路で機能したかどうかは不明である。ラモトリギンは脂溶性であるため、注射液の調整には工夫が必要であるが、注射液の調整法の開発、3月にわたるラモトリギンの投与、組織作成および解析のほとんどの過程は、滋賀医科大学学部学生の中路景太が行った。

③ 情動および、情動記憶に関する行動実験

オープンフィールドテストにおいて、不安の程度の指標となる中央区画での滞在時間や総行動距離などには有意差は認められなかったが、ラモトリギン群において立ち上がり時間に有意な延長が認められ、探索行動の亢進傾向が確認された。prepulse inhibition test および、ソーシャルインターラクションテストでは、ラモトリギン群と対照群間に有意差は認められなかった。恐怖条件付けテストでは、ラモトリギン群における連合学習時のフリージング時間は、対照群と比較して有意な延長が認められた。翌日（近接記憶）および、4週間後（遠隔記憶）に評価する文脈テスト/手がかりテストにおけるフリージング時間は、連合学習時の非条件刺激に対する反応に見合った延長が予想されたが、対照群との間に有意差は認められなかった。

以上の結果から、ラモトリギンによって自己複製が促進された神経幹細胞は、恐怖記憶を過剰に増強させないように、消去方向に作用する可能性が示唆された。恐怖記憶の消去に関連する内側前頭前野の機能の解析などは今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 小山なつ | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 脊髄の上行性伝導路と局所回路 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Clinical Neuroscience | 6. 最初と最後の頁 650-652 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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 小山なつ | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 痛みの基礎知識 | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 臨床化学 | 6. 最初と最後の頁 197-202 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 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 Daun KA, Fuchigami T, Koyama N, Maruta N, Ikenaka K, Hitoshi S | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Early maternal and social deprivation expands neural stem cell population size and reduces hippocampus/amygdala-dependent fear memory | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Front Neurosci | 6. 最初と最後の頁 22 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2020.00022 | 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 小山なつ | 4. 巻 48 |
| 2. 論文標題 急性痛と慢性痛の基礎知識 | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 理療 | 6. 最初と最後の頁 21-25 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし | 査読の有無 無 |
| 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8件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 小山なつ、中路景太、Kenny Daun、等誠司 |
| 2. 発表標題 恐怖記憶と消去促進に対する刺激豊かな環境の効果 |
| 3. 学会等名 第40回日本疼痛学会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Natsu Koyama, Keita Kitagawa, Hiroaki Kitagawa, Kenny Daun, Seiji Hitoshi |
| 2. 発表標題 The effects of environmental enrichment on the fear memory extinction |
| 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 Kitagawa H, Nakaji K, Daun K, Kuroda A, Koyama N, Hitoshi S |
| 2. 発表標題 Effects of voluntary wheel running on conditioned fear learning and extinction learning |
| 3. 学会等名 第97回 日本生理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---------------------------------------|
| 1. 発表者名 小山なつ |
| 2. 発表標題 行性疼痛抑制を再考する |
| 3. 学会等名 日本ペインクリニック学会第54回学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 小山なつ |
| 2. 発表標題 条件付け恐怖の消去学習とWEBによる痛み関連学習に関する話題 |
| 3. 学会等名 生理学研究所痛み研究会. 2020 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Keita Nakaji, Natsu Koyama, Takahiro Fuchigami, Seiji Hitoshi |
| 2. 発表標題 MOOD STABILIZING DRUGS ACTIVATE ADULT NEURAL STEM CELLS-NEUROGENESIS SYSTEM |
| 3. 学会等名 The International Society for Neurochemistry (ISN) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-------------------------------------|
| 1. 発表者名 小山なつ |
| 2. 発表標題 基礎からみた感覚障害 |
| 3. 学会等名 第24回日本口腔顔面痛学会学術集会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Keita Nakaji, Natsu Koyama, Fuchigami, Seiji Hitoshi |
| 2. 発表標題 Mood stabilizing drugs activate adult neural stem cell-neurogenesis system |
| 3. 学会等名 第9回アジア・オセアニア生理学会連合大会 (FAOPS2019) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 小山なつ(分担執筆) | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 医学書院 | 5. 総ページ数 382 |
| 3. 書名 疼痛医学 | |

| | |
|----------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 小山なつ(分担執筆) | 4. 発行年 2020年 |
| 2. 出版社 真興交易 | 5. 総ページ数 374 |
| 3. 書名 痛みのバイオマーカーとしての機能的脳画像診断法 | |

〔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 | 中西 美保 (Nakanishi Miho) (40382048) | 滋賀医科大学・医学部・助教 (14202) | |

| | 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 協力者 | 中路 景太 (Nakaji Keita) | | |
| 連携 研究者 | 等 誠司 (Hitoshi Seiji) (70300895) | 滋賀医科大学・医学部・教授 (14202) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|