

令和 4 年 8 月 30 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：18K07470

研究課題名(和文)心の痛みによる身体の痛みの増強メカニズム：動物モデルによる中脳ドーパミン回路の解析

研究課題名(英文)Pain modulation through mesolimbic dopaminergic pathway by partner-loss in monogamous rodents.

研究代表者

大迫 洋治 (Osako, Yoji)

高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・准教授

研究者番号：40335922

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、一夫一婦制げっ歯類をパートナーと別離させると、炎症時の痛み行動が増悪し、疼痛関連脳領域のうち、前頭前野、側坐核、扁桃体の活動が低下すると同時にこれら脳領域と他の疼痛関連脳領域との機能的結合が変化することが明らかになった。さらに脳内ドーパミン産生ニューロンが豊富に存在する腹側被蓋野における痛み刺激に反応するサブリージョンの興奮パターンが異なることが明らかになった。本研究により、精神的ストレスによる痛みの増悪に脳内ドーパミン回路の機能変調が関与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

本研究では、ヒトと類似した社会性を示す一夫一婦制げっ歯類による痛みの心理社会的修飾モデルを用いている。このモデルは、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。今回の研究で、パートナーと同居している時に比べて、パートナーと別離すると炎症時における脳内ドーパミン回路の反応性が低下することが明らかになった。パートナーロス心理ストレスによる痛みの増悪メカニズムとして脳内ドーパミン回路の機能低下が示唆される。近年、慢性痛の患者において同様の脳内回路が変化していることが明らかになっている。本研究における成果は慢性痛の新たな治療法の確立に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： We have established an animal model of social stress-induced hyperalgesia using a socially monogamous rodent in which males separated from their female partners (loss males) became anxious and displayed exacerbated inflammatory pain behaviors compared to males with partners (paired males). During inflammatory pain, the loss males had significantly lower Fos immunoreactivity (Fos-ir) in the medial prefrontal cortex, nucleus accumbens and amygdala compared to the paired males, even though Fos-ir levels under the basal condition (without pain) were comparable between groups. Furthermore, we divided the ventral tegmental area (VTA) into five subregions: PFR, PBP, PN, VTT, and IF, and analyzed neuronal Fos expression in each area. As a result, significant differences in the Fos expression were detected in the IF and the VTT, suggesting that the excitement pattern within the VTA due to pain stimulation is different between the paired and the loss males.

研究分野：神経生物学

キーワード：痛み

1. 研究開始当初の背景

身体の痛みは同じ強さの痛み刺激でも個人によってその感じ方が違う (心身反応)。心理的要因は痛みを大きく左右し、精神的ストレスにより痛みが増悪することが知られている。ストレスによる痛みの修飾として、急性的な強い身体的ストレスによる『ストレス性鎮痛』がよく知られているが、臨床で問題になっているのは、慢性的な精神的ストレスによる『ストレス性痛覚過敏』であり、『ストレス性鎮痛』とは別の痛みの修飾回路が存在すると考えた。また、多くの慢性痛患者が精神的ストレスを抱えていることから、慢性痛の発症基盤に『ストレス性痛覚過敏』の痛みの修飾回路が関与している可能性が考えられる。申請者は、一夫一婦性げっ歯類による痛みの心理社会的修飾モデルを独自に確立し、げっ歯類においてもヒトと同様に、パートナーとの絆の破綻(パートナーロス)により不安が亢進し痛みが増悪することを報告している。この痛みの心理社会的修飾モデルは、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だと考える。

2. 研究の目的

本研究では、雌雄間で非常に強い絆を形成し、ヒトと類似した社会性を示すプレーリーハタネズミによる痛みの心理社会的修飾モデルを用いる。このモデルは、パートナーとの別離により痛み行動が増悪することから、炎症により痛みを惹起させ、その際の疼痛関連脳領域の反応性を解析することで、精神的ストレス性痛覚過敏の発症メカニズムを探索する。特に、プレーリーハタネズミの社会性の発現に重要で、かつ、痛み刺激時に内因性疼痛抑制系として機能することが示唆されている中脳ドーパミン回路に注目して解析を行う。

3. 研究の方法

プレーリーハタネズミは一夫一婦制を営むことから、雄を自分のパートナー雌と別離させると (パートナーロス) 精神的ストレスを受け、痛み行動が増悪する (痛みの心理社会的修飾モデル)。本研究での解析はすべて、このプレーリーハタネズミによる痛みの心理社会的修飾モデルを用いた。標準飼育ケージ内で雌雄ペアを7日間同居させることで雌雄間の絆を形成させ、絆の有無をプリファレンステストにより確認した。プリファレンステストにて、自分のパートナー雌のみに親和行動を示した雄のみを絆ありと判定し、その後の実験に用いた。絆を形成した雄を、プリファレンステスト終了直後に、パートナー雌を別離させる群 (ロス群) と、そのまま同居を継続する群 (維持群) の2群に分け、その6-7日後に、両群とも後肢足底部に5%ホルマリン溶液を皮下注入し、注入2時間後に各被検動物から4%パラホルムアルデヒド溶液灌流後に脳を採取した。後日クリオスタットで採取脳より凍結切片を作製し、疼痛関連脳領域において、神経細胞の活動を Fos 蛋白の抗体で、ドーパミンニューロンの検出をチロシン水酸化酵素の抗体で、GABA 抑制性介在ニューロンの検出を GAD の抗体でそれぞれ免疫組織化学的染色にて検出した。また、中脳ドーパミン回路の機能を評価する目的で、後肢足底部皮下へのホルマリン溶液の注入1時間後に、被検動物から脳を採取し、中脳ドーパミン回路構成脳領域をパンチアウトし、液体窒素で凍結し-80℃で保存した。後日、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 法によりドーパミンおよびドーパミン代謝産物の定量分析をおこなった。

すべての解析において、パートナー維持群とロス群間で比較を行った。

4. 研究成果

(1) 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のパートナー雌に対する嗜好性をプリファレンステストで行動学的に評価した。その結果、維持群・ロス群ともに、ストレンジャーよりパートナーに対して有意に高い嗜好性を示し、痛みなし・あり群においてパートナー雌に対する嗜好性の程度に違いはなかった (図1)。

(2) プリファレンステスト直後から、6-7日間パートナーと同居継続（維持群）もしくは別離状態にして（ロス群）、足底皮下に炎症を惹起すると（痛みあり群）、維持群・ロス群ともに、解析した疼痛関連脳領域すべてにおいて、神経活性化マーカーであるFosタンパクが、炎症を惹起しない状態（痛みなし）より有意に多く発現した。これらのことから、ヒトにおいて機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いて報告されている疼痛関連脳領域が、プレーリーハタネズミにおいても炎症性疼痛時に活性化されることが明らかになった。さらに、各疼痛関連脳領域におけるFosの発現量について維持群とロス群間で比較解析をおこなうと、前頭前野と側坐核において、維持群では痛みなしに比べて有意な発現量の増加がみられたのに対し、ロス群では疼痛時の発現量が維持群より有意に少なく、痛みの有無による発現量の変化がみられなかった（図2）。さらに、解析した疼痛関連脳領域の2領域間におけるFos発現量の相関係数を算出しヒートマップを作成し、そのマッピングパターンを維持群とロス群で比較した。その結果、痛みなし時には、維持群の島皮質のFos発現がその他の大部分の解析領域における発現と負の相関にあった。特に、側坐核のFos発現と強い負の相関が検出された。島皮質は不快情動に関連する脳領域であることから、維持群ではパートナーと同居を継続していることにより、側坐核の活動を通して島皮質の活動が抑えられ、ひいては不快情動が抑えられていることが示唆された。また、痛み惹起時においては、維持群の扁桃体中心核のFos発現が、他の大部分の解析領域における発現と負の相関にあった。中でも、前頭前野と側坐核と強い負の相関であった。扁桃体中心核は、扁桃体重核間で処理される情報の最終出力部位であり、さらに侵害刺激特異的に反応することが知られている。これらのことから、維持群では前頭前野と側坐核の活動を通して扁桃体からの侵害刺激の出力を抑制している可能性が示唆された。

(3) (1)・(2)において、解析脳領域の大部分において、維持群の方がロス群より炎症性疼痛時におけるFos発現が多く、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と側坐核において維持群とロス群間で顕著な発現差が検出された。さらに、痛みを惹起していない状態においても、これらの脳領域と他の脳領域間での活動相関が、維持群とロス群で異なっていた。中脳ドーパミン回路は、プレーリーハタネズミの絆の形成に重要であることが明らかになっており、さらに近年、中脳ドーパミン回路が内因性疼痛抑制系として機能することが注目されている。したがって、本研究で用いている痛みの心理社会的修飾モデルで観察される痛みの増悪メカニズムとして、パートナーロスストレスによる中脳ドーパミン回路の機能変調が関与している可能性が示唆された。そこで、中脳ドーパミン回路における主要なドーパミン供給源領域である腹側被蓋野（VTA）の炎症性疼痛時の活動をFosタンパクの発現を指標に解析した。VTAには中脳ドーパミン産生ニューロンが豊富に存在しているが、解剖学的、神経化学的、電気生理学的に不均一な集団を構成していることを考慮し、VTAを前部と後部に区別し、さらに、前部をPFR、後部をPN、PBP、VTT、IFのサブリージョンに区別し、各サブリージョンにおいてFos発現ニューロン数を解析した。その結果、維持群・ロス群ともに、すべてのVTAサブリージョンにおいて、痛み刺激によりFos発現が増加した。維持群においては、IF、PBP、VTTにおいてFos発現が著しく増加し、ロス群においてはIF、PFR、PBPにおいてFos発現が著しく増加した。IFとVTTにおいては、維持群とロス群間でFos発現に有意な差が検出された（図3）。また、Fos発現しているニューロンを同定する目的で、VTAにおけるチロシン水酸化酵素（TH：ドーパミン産生ニューロンマーカー）、グルタミン酸デカルボキシラーゼ（GAD67：GABA作動性ニューロンマーカー）とFosタンパクの抗体を用いた免疫組織化学的二重染色法により、炎症疼痛時に活性化する中脳ドーパミン産生ニューロン数およびGABA作動性ニューロン数を、維持群とロス群で比較解析した。その結果、TH/Fosの共発現およびGAD67/Fosとの共発現ニューロンは非常に少数しか検出されず、維持群ロス群間

での違いを検出できなかつた。これらの結果より、パートナーロスによる心理ストレスにより、痛み刺激に反応するVTAサブリージョンの興奮パターンが異なることが示唆された。

(4) 心理的ストレスによる痛みの増悪メカニズムとして、脳内ドーパミン回路による疼痛抑制機能の機能変調が示唆されるが、(3)においてVTAドーパミンニューロンのFos発現が非常に少なく、ドーパミンニューロン自体の痛み刺激に対する反応性を評価することができなかつた。そこで、痛み刺激に伴うVTAドーパミンニューロンのドーパミン放出能を評価する目的で、ドーパミンニューロン投射領域である側坐核と前頭前野において、ドーパミンの定量分析を液体クロマトグラフィー質量分析(LC/MS)法により行った。その結果、炎症性疼痛時の脳内において、両脳領域とも維持群に比べてロス群においてドーパミン量が著しく少なかつた。さらに、中脳ドーパミン回路の代謝速度を解析するために、ドーパミン代謝産物(DOPAC、HVA、3-MT)の検出・定量も試みた。その結果、ドーパミンは検出できたが、DOPACの検量線の直線性が低く、ドーパミン代謝産物の正確な検出に至らず、ドーパミンの代謝回転率を算出することができなかつた。前処理条件や分析条件を再検討する必要があると考える。また、パートナーロス心理ストレス下における定常状態の脳内ドーパミン産生状態をチロシン水酸化酵素の免疫染色強度を測定することにより評価した。その結果、パートナーロス群の腹側被蓋野において、有意差の検出には至らなかつたものの、蛍光強度が低い傾向にあつた。チロシン水酸化酵素の免疫染色強度の増減はドーパミン産生量を反映していることから、パートナーロスストレスにより中脳ドーパミンの産生能が低下し、脳内ドーパミン回路による疼痛制御機能が低下する可能性を示唆しているものとする。

(5) (4)で、痛み刺激による中脳ドーパミン回路のドーパミン代謝回転速度の算出をLC/MS法を用いて試みたが、正確な算出ができず評価できなかつた。そこで、ドーパミンニューロン興奮薬であるニコチンを急性皮下投与し、その際に発現するFos発現を免疫組織化学的手法により検出・解析することで、腹側被蓋野ドーパミンニューロンの機能評価を行った。その結果、パートナー維持群・ロス群ともに生理食塩水投与下ではドーパミンニューロン(チロシン水酸化酵素陽性ニューロン)のFos発現はみられず、ニコチン投与によりその発現が増加した。その増加率を比較すると、維持群がロス群より多い傾向にあつた。腹側被蓋野ドーパミンニューロンの活動は、脚間核に豊富に存在するGABA抑制性介在ニューロンにより調節されることが知られている。そこで、脚間核におけるFosとGABAニューロンマーカーであるGAD67の共発現を指標に、痛み刺激に対するドーパミンニューロンの反応性を維持群とロス群で間接的に評価した。その結果、維持群がロス群よりFos/GAD67共発現ニューロン数が多かつた。これらの結果より、パートナーロスストレスにより中脳ドーパミンニューロンの機能が低下し、その低下に脚間核に豊富に存在するGABAニューロンの活性化が関与している可能性が示唆された。さらに、本研究の心理社会的痛み修飾モデルの痛み行動の増悪に脳内ドーパミンが関与しているのか検証する目的で、パートナーロス期間中に、人口脳脊髄液(200nl)もしくは人口脳脊髄液+ドーパミン受容体D2アゴニストquinpirole(1ng/200nl)を流速 $0.5\mu\text{l/hr}$ で側脳室へ浸透圧ポンプを用いて投与して、ロス群の炎症性疼痛時の痛み行動を解析した。その結果、人口脳脊髄液のみを投与したパートナーロス群に比して、人口脳脊髄液+quinpirole投与群の痛み行動が少ない傾向がみられた。パートナーロスに伴う痛み行動の増悪が、ドーパミン受容体アゴニストの脳内投与により緩和されたことから、本研究における痛みの心理社会的修飾モデルの痛みの増悪メカニズムに脳内ドーパミンが関与する可能性が示唆された。

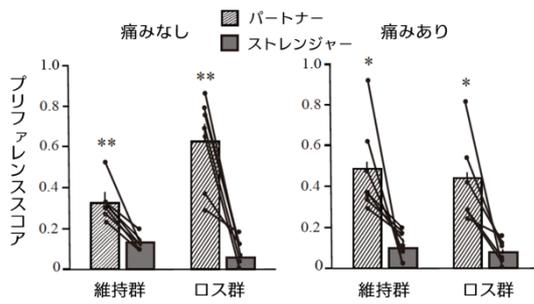


図1 プリファレンステストにおける親和行動スコア；すべての群において、パートナーに対する嗜好性が形成された。

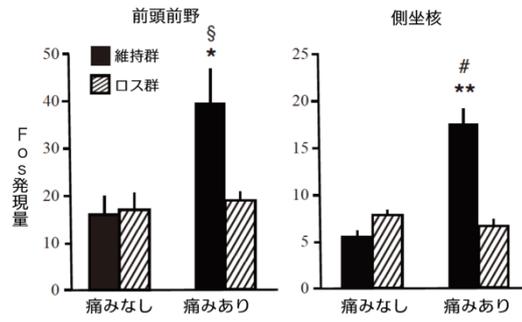


図2 維持群とロス群でFos発現が異なった脳領域
維持群では痛みにより有意にFos発現が増加したが、ロス群では増加しなかった(*)

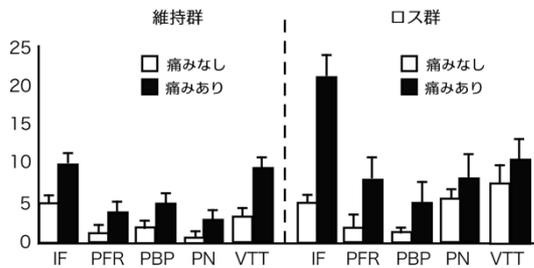


図3 腹側被蓋野の各サブリージョンにおけるFos発現 炎症性疼痛時におけるVTAサブリージョンの興奮パターンが異なった。

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yu Hirota, Aki Araia, 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 Behaviors	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 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 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	由利 和也 (Yuri Kazunari) (10220534)	高知大学・教育研究部医療学系基礎医学部門・教授 (16401)	

	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	西原 真理 (Nishihara Makoto) (60380325)	愛知医科大学・学際的痛みセンター・教授 (33920)	

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			