

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08854

研究課題名(和文) 新生児期疼痛による行動異常に対する神経活動マッピングとネットワーク機能変化の解明

研究課題名(英文) Effects of neonatal pain on developing neuronal networks

研究代表者

野村 有紀 (Nomura, Yuki)

神戸大学・医学研究科・助教

研究者番号：60643955

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)：本研究では幼児期に与えられた疼痛刺激によって、成長後に多動性行動が生じる可能性が示唆された。また成熟後脳におけるc-Fos発現の解析から、梨状皮質領域の神経細胞の活性化を認め、幼児期疼痛刺激を受けることで、ストレス応答への変化が生じている可能性が示唆された。一方、活性化の認められた脳領域からのグリア細胞の分離が困難であり、本研究ではより広範囲の大脳皮質および脊髄から分離精製したミクログリアにおいて、活性化マーカーやサイトカインの遺伝子発現を解析したが、コントロール群と疼痛刺激群において明らかな遺伝子発現の差は認めなかった。今後は局所組織からの分離および網羅的な遺伝子解析が必要と考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

幼児期の疼痛刺激およびストレスは、神経発達や精神発達において有害事象を伴うことが明らかにされているが、その分子機構については不明な点が多い。本研究によって若年期の疼痛刺激が成熟期に多動性行動を示す可能性が示唆された。また、分子メカニズムの特定には至らなかったものの、梨状皮質をはじめとした、ストレス応答に關する脳領域の神経活動の変化が認められたことから、ストレス耐性の脆弱化による行動変化が生じていた可能性が示唆される。今後は、神経活動の動態変化を含めた解析を加えることで、若年期の疼痛刺激による長期的な影響の分子メカニズムを解明する一助となる。

研究成果の概要(英文)：This study suggests that painful stimuli given in childhood induces hyperactive behavior later in life. Immunohistochemical analysis of c-Fos expression in the mature brain revealed neural activation in the cerebral cortex and piriform cortex. It suggests that neuronal activation in the amygdala-piriform cortex transition region might be associated with stress hormone responses (Nature 532;103, 2016), and that childhood pain stimulation might induce the changes to the stress response. Since it was difficult to isolate glial cells from small brain regions where c-Fos expression was observed, we analyzed gene expression of markers of activation, cytokines, and chemokines in microglia isolated from a wider range of cerebral cortex or spinal cord. There was not significant difference in gene expression between the control and pain-stimulated groups. Isolation from local tissues and comprehensive gene analysis will be necessary in the future.

研究分野：麻酔

キーワード：若年期疼痛 ミクログリア c-Fos

## 1. 研究開始当初の背景

小児医療現場において治療に必要な処置である一方で、繰り返される痛み刺激は一日 10 回以上に及ぶとされている。こうした痛みに対して、予防や緩和方法の探索は医療従事者に課せられた重要な責務となっている。近年、幼若期の疼痛刺激が成熟後の疼痛閾値の低下をもたらすことが報告され、脊髄における分子レベルの変化が指摘された (Pain 154:1129, 2013)。また幼若期の発育環境が発達過程における不安様行動や社会性行動などの情動形成に大きく影響することも報告されている (Nat Rev Neurosci. 10:434, 2009)。しかし、長期的な疼痛閾値の低下や行動異常がどのように生じるか詳細なメカニズムは未だ明らかではなく、最適な予防方法、治療方法も定かではない。これまで我々はラット新生児期に腹部切開による術後痛モデルを作製し、成熟期の行動解析において、オープンフィールド試験を用いた自発行動解析においては多動性の行動パターンが現れることを明らかとしてきた。

こうした多動性行動の中心的役割を担うと考えられているのが脳の腹側被蓋野から側坐核および前頭前野などに投射されている脳領域が関与する報酬系の神経回路である (J Am Acad Child Adolesc Psychiatry. 54:394, 2015)。また、幼児期のストレスは視床下部室傍核 (PVH) からの制御によって視床下部 - 下垂体 - 副腎系 (HPA axis) に影響を及ぼす (Sci Rep. 6:39159, 2016)。本研究では幼児期の疼痛刺激によって、グリア細胞群の機能変化に伴う神経細胞の発火異常が生じ、神経回路網のネットワーク形成不全による長期的な機能性変化をもたらすかという問いについて検討する。

## 2. 研究の目的

幼児期の疼痛刺激およびストレスは、神経発達や精神発達において有害事象を伴うことが報告されているが、その分子機構については未だ明らかではない。本研究では幼児期の疼痛刺激が行動異常を来す原因となる神経基盤領域を明らかにし、発育過程におけるいくつかのタイムポイントにおけるグリア細胞群のポピュレーションの変化に着目する。中枢を構成する細胞群の機能変化について、集団毎に分離採取し機能解析することによって脳内の機能変化を明らかにすることを目的とする。

具体的には疼痛刺激によってどの脳領域で神経活動変化を認めるかについて、神経活動マーカー c-Fos を用いた免疫組織化学的手法によって明らかにする。一方、ミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞は、脳組織の構築や恒常性の維持などに関わるだけでなく、シナプス伝達の調節により神経活動に対して多彩な影響を与え、脳機能発現に積極的に関与することから、脳内の分子レベルの変化として、大脳皮質および周辺領域において、神経活動の指標となる c-fos 発現変化およびミクログリアから産生される脳内炎症性メディエーター (TNF $\alpha$ ) や神経活性化に関与するグリア細胞由来因子について、発現変化を解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) 炎症性疼痛モデル動物の作製

足底注入モデル作製：生後 7 日以内の雌雄ラットに対して、それぞれ 30 $\mu$ L CFA (Complete Freund's Adjuvant) を足底へ注入する。それぞれ無処置である同胞をコントロールとした。一方、成熟期における炎症性疼痛をもたらす大脳皮質での神経活動変化を見るために成熟マウスの足底に CFA を注入したモデルを作製した。

### (2) 成熟後の行動解析

炎症性疼痛モデルを用いて、6-10 週齢にて各種行動評価を行う。

活動量、自発性、不安評価：オープンフィールド試験、高架式十字迷路

痛覚感受性評価：von Frey 試験、ホットプレート試験

### (3) 疼痛刺激により神経活動が変化する脳および脊髄領域のマッピング解析

発育過程における各タイムポイント (疼痛刺激後：日齢 8-12、成熟期：6-10 週齢) で、神経活動マーカーである c-Fos を用いた免疫組織化学的解析により神経活動マッピングを行い、疼痛刺激の有無によって神経活動に変化を認める各脳領域を経時的に解析した。

### (4) 疼痛刺激による中枢細胞群における遺伝子発現変化およびポピュレーション変化の解析

炎症性疼痛モデルおよびコントロールを用いて、大脳皮質体性感覚野領域および大脳皮質前頭前野および神経活動に変化を認めた脳組織を分離採取する。

ミクログリアは Percoll を用いた分離精製および、マーカー抗原 (CD45, CD11b) に対する特異抗体によるフローサイトメトリーによる分離採取を行い、成熟および活性化の指標となる各種マーカーの遺伝子発現を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 炎症性疼痛モデルの成熟後における行動変化

炎症性疼痛モデルラットでは、投与直後および若年期の疼痛評価は困難であった。行動評価は成熟後 6 週齢以降に行い、コントロールと処置群で機械刺激および熱刺激において明らかな疼痛閾値の差を認めなかった（図 1）。また、高架式十字迷路においては雄で有意な不安抑制行動が認められ、不安を伴わない多動が生じる可能性が示唆された。こうした疼痛による成長後の行動変化には雌雄差がある可能性も考えられた。

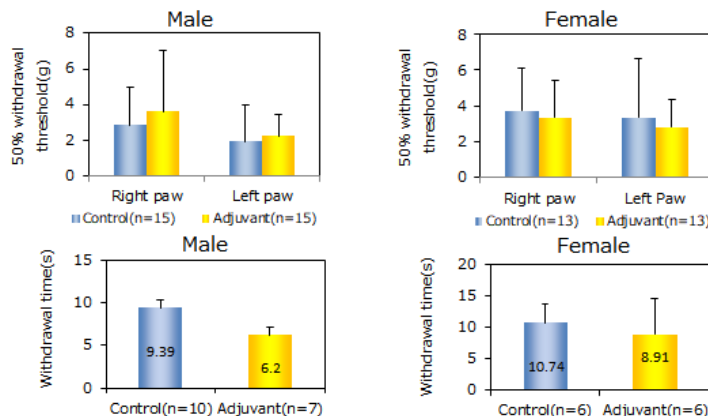


図 1 von Frey 試験、Hot Plate 試験による疼痛閾値評価

一方、活動量、自発性、不安評価として行ったオープンフィールド試験においては、疼痛刺激を受けた群において、成熟期に多動行動を伴うことが明らかとなった（図 2）。

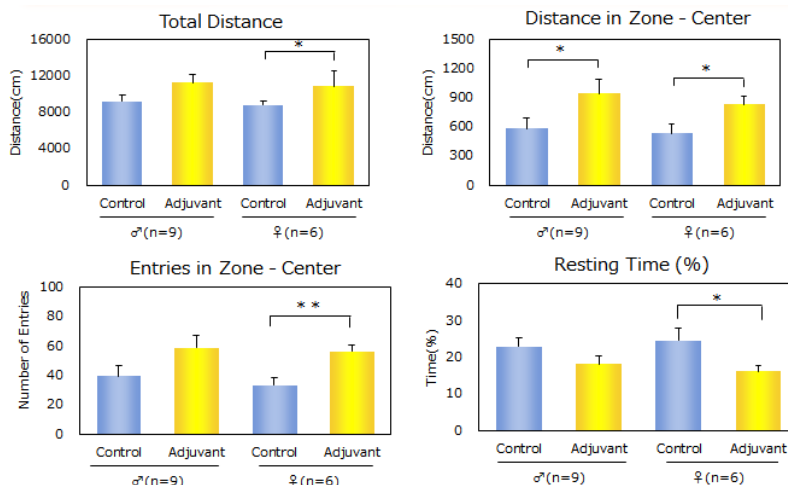


図 2 オープンフィールド試験における行動評価

(2) 疼痛刺激により神経活動が変化する脳および脊髄領域のマッピング解析

2 週齢および 6 - 10 週齢の脳および脊髄組織に対して c-Fos の発現を解析した。疼痛処置後の 2 週齢では脊髄後角および大脳皮質体性感野領域の c-Fos 発現の増加を認めたが、成熟期には脊髄レベルでの明らかな発現変化は認めなかった。しかし、一部の個体では大脳皮質体性感野および梨状皮質領域で、c-Fos が発現増加していることが明らかとなった（図 3）。

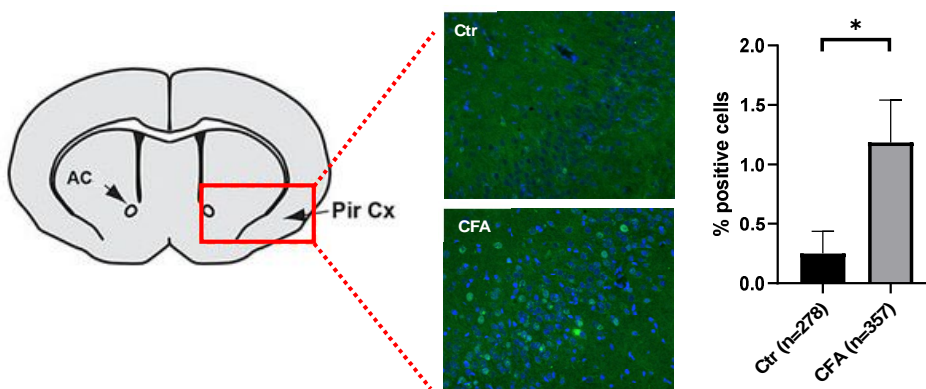


図 3 c-Fos に対する免疫組織染色 (piriform cortex)

### (3) 疼痛刺激によるグリア細胞群のポピュレーションおよび遺伝子発現変化の解析

疼痛処置後の脳および脊髄からのミクログリアの単離採取を試みた。単離の方法として、FACSを用いて抗 CD45 抗体および CD11b 抗体による分離精製を行ったが、単離率、生存率が低く、脳組織局所から切離した組織分離した細胞をその後の解析に使用することはできなかった。そこで、大脳皮質および脊髄組織全体の組織回収後に細胞を分散処理し、遠心操作によるデブリの除去を行なった上でミクログリアの単離精製を行った。

分離精製した細胞群における遺伝子発現を qPCR にて解析した結果、ミクログリアについては、TNF, IL1b, IL6, CX3CL1, CX3Cr1, CXCL1, CXCL5, CXCL2, IL18, P2X4, TLR4, CSF1, Sirt2 の遺伝子発現を比較したがコントロール群と疼痛処置群で有意な差は認めなかった。

本研究では幼児期に与えられた疼痛刺激によって、成長後に不安を伴わない多動性行動が生じる可能性が示唆された。また成熟後脳における c-Fos 発現の解析から、大脳皮質および梨状皮質において、活性化が認められた。扁桃体梨状皮質移行領域の神経細胞の活性化は、ストレスホルモンの応答と関連する可能性が指摘されており (Nature 532;103, 2016)、幼児期疼痛刺激を受けることで、ストレス応答への変化が生じている可能性が示唆された。

一方、活性化の認められた脳領域からのグリア細胞の分離が困難であったことから、本研究ではより広範囲の大脳皮質および脊髄から分離したミクログリアにおいて、活性化の指標となるマーカーやサイトカイン、ケモカインの遺伝子発現を解析した。しかしコントロール群と疼痛刺激群において明らかな遺伝子発現の差は認めなかった。今後は局所組織からの分離および網羅的な遺伝子解析が必要と考えられる。

また同時に行った成熟マウスに対する CFA 注入による疼痛モデルにおいては、急性期に大脳皮質体性感覚野における神経細胞のカルシウムチャンネル 1 (Cav2.1, Cav2.2) の発現が増加しており、神経細胞間の同調性が増加していることが明らかとなったことから (Sci Adv. 7(12):eabd8261, 2021)、若年期の疼痛刺激が慢性期にも同様の神経活動変化を来すかについても検討する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okada T, Kato D, Nomura Y, Obata N, Quan X, Morinaga A, Yano H, Guo Z, Aoyama Y, Tachibana Y, Moorhouse AJ, Matoba O, Takiguchi T, Mizobuchi S, Wake H	4. 巻 7
2. 論文標題 Pain induces stable, active microcircuits in the somatosensory cortex that provide a therapeutic target.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eabd8261
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.abd8261	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------