

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10177

研究課題名（和文）パーキンソン病モデルラットの痛覚異常の解明 - 視床下部室傍核の関与 -

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of hyperalgesia in a rat model of Parkinson's disease - Involvement of the hypothalamic paraventricular nucleus

研究代表者

丹羽 均 (NIWA, Hitoshi)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30218250

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）：パーキンソン病(PD)の非運動症状として痛覚過敏のメカニズムについて検討した。PDにともなう黒質線条体系のドパミンの枯渇による視床下部室傍核(PVN)の機能低下が、オキシトシン(OXT)、バゾプレシン(AVP)、および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)を介した疼痛制御機構に影響を及ぼしているとの仮説を立てた。

内側前脳束に6-OHDAを投与し作製したPDモデルラットを用い、侵害刺激に対する免疫組織学的分析と血液生化学的検査を実施した。その結果、PDモデルラットに見られる痛覚過敏反応には、PVNにおけるOXTとCHR産生細胞の活性低下が関与していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パーキンソン病(PD)の主症状は運動障害であるが、非運動症状である痛覚過敏は患者のQOLを著しく低下させる。本研究は、PDにおける痛覚過敏のメカニズムの解明に焦点を当て、その原因として視床下部室傍核(PVN)が関与し、PVNに存在するオキシトシン(OXT)、および副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)産生細胞の機能低下が原因となる可能性を、免疫組織学的手法と酵素免疫測定法を用い明らかにした。この結果は、PD患者の示す痛覚過敏の治療法につながる有用な研究となると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of hyperalgesia as a non-motor symptom of Parkinson's disease (PD) is discussed. We hypothesized that hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) dysfunction due to dopamine depletion in the substantia nigra striata associated with PD affects pain control mechanisms mediated by oxytocin (OXT), vasopressin (AVP), and adrenocorticotropin releasing hormone (CRH). Immunohistological analysis and blood biochemical tests in response to nociceptive stimuli were performed using a PD rat model created by injecting 6-OHDA into the medial forebrain bundle. The results showed that the hyperalgesic response in PD model rats is associated with decreased activity of OXT- and CHR-producing cells in the PVN.

研究分野：神経科学

キーワード：パーキンソン病 痛覚過敏 視床下部室傍核 オキシトシン バゾプレシン 副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

パーキンソン病 (Parkinson's disease: PD) は、高齢者における主要な神経変性疾患のひとつであり、中脳の黒質細胞で産生される神経伝達物質のドパミンが減少し、運動障害を呈する。一方、近年、PD 患者における非運動症状である「痛み」が注目されている。

PD モデルラットを用いた口腔顔面領域の痛覚に関するこれまでの研究では、口腔領域の痛覚は過敏状態にあることが明らかとなっている (Maegawa H et al. Neural mechanism underlying hyperalgesic response to orofacial pain in Parkinson's disease model rats. *Neurosci Res.* 2015;96:59-68.)。さらに、その痛覚過敏には、視床下部室傍核 (paraventricular nucleus: PVN) で産生されるオキシトシン (oxytocin: OXT) による疼痛制御機構の減弱が関与している可能性が示唆された (科学研究費 基盤研究(C) 2014-2017 年度、パーキンソン病モデルラットにおける口腔領域の痛覚過敏のメカニズムの解明、研究代表者: 丹羽 均)。

PVN には OXT、バゾプレシン (arginine vasopressin: AVP) および (corticotrophin-releasing hormone: CRH) の 3 種類の神経ペプチドをそれぞれ産生する神経が分布しており、近年これらのホルモンが痛覚の受容に強く関係していることが示されている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PD モデルラットでみられた痛覚過敏のメカニズムを解明するため、黒質線条体系のドパミンの枯渇が、PVN における OXT、AVP、CRH を介した疼痛制御機構にどのような影響を及ぼしているのかを、免疫組織学的手法と酵素免疫測定法 (Enzyme-Linked immunosorbent assay: ELISA) を用いて明らかにすることである。

3. 研究の方法

(1) 片側 PD モデルラットの作製

hydroxydopamine (6-OHDA) の左側内側前脳束への注入

ラットに三種混合麻酔薬 (ミダゾラム 2.0 mg/kg、塩酸メドトミジン 0.375 mg/kg、酒石酸ブトルファノール 2.5 mg/kg) を腹腔内投与し、頭部をステレオに固定した。左側内側前脳束に 6-OHDA を注入するため、頭蓋を露出して、デンタルドリルで小穴を開け、ラムダから前方 3.0 mm、左側 1.3 mm、深さ 6.8 mm と 6.4 mm の位置にハミルトンシリンジを挿入した。6-OHDA (3 mg/ml) をマイクロシリンジポンプで用いて 1 μ l/min の速度で、2.5 μ l ずつ注入した。その後、骨ろうで小穴をふさぎ、縫合した (6-OHDA 群)。6-OHDA のかわりに生理食塩水を左側内側前脳束に注入した Sham 群も作製した。

片側 PD モデルラット作製の可否の確認

6-OHDA 注入の 14 日後、ラットにメタンフェタミン (3 mg/kg) を腹腔内投与し、反時計回転運動を 60 分間観察した。回転数が平均 5 回/分以上を示したラットを片側 PD モデルラットとして実験に使用した。Sham 群にも同様にメタンフェタミンの腹腔内投与を行った。さらに、免疫組織学的に黒質線条体系を含む切片を用いて、抗 tyrosine hydroxylase (TH) 抗体による免疫染色を行い、ドパミン産生細胞の免疫反応性を確認した。

(2) 炎症性疼痛の誘発 (Formalin injection 群の作製)

モデル作製から 21 日後に、ペントバルビタール深麻酔下 (120 mg/kg、腹腔内投与) に左側上口唇に 4%ホルマリン 0.05 mL を皮下注射し、炎症性疼痛を誘発した。コントロールとして、皮下注射を実施しない群 (No injection 群) も作製した。

(3) 血清ホルモン濃度の測定

ホルマリン皮下注射の 5 分後、深麻酔下に開胸して心臓から血液を採取した。血液サンプル採取後、遠心分離 (4、1600 g、15 分) し、上澄み液を採取して血清サンプルを作製し、-80 で保存した。ELISA Kit を用いて血中の OXT、AVP、CRH 濃度を測定した。No injection 群についても血液サンプルを採取した。

(4) 実験ラットの割り付け

6-OHDA 群 12 匹、sham 群 12 匹、合計 24 匹のラットを作製した。さらに、それぞれの群を Formalin injection 群 6 匹、No injection 群 6 匹に分けた。

(5) 免疫組織学的検討

採血直後に脳の灌流固定を行い、脳を取り出して連続横断凍結切片を作製した。

三叉神経脊髄路核尾側亜核 (trigeminal spinal subnucleus caudalis: Vc) を含む切片を用いて、抗 p-ERK 抗体による免疫染色を行い、抗 p-ERK 抗体陽性細胞数を計数した。

PVN を含む切片を用いて、OXT、AVP、CRH それぞれの神経ペプチドに対する抗体と抗 p-ERK 抗体との蛍光二重染色を行い、PVN における共発現細胞数を計数した。さらに、PVN における各神経ペプチド (OXT、AVP、CRH) に対する抗体の陽性細胞数を計数し、抗 p-ERK 抗体陽性細胞との共発現率 (%) を検討した。共発現率 (%) は、抗 p-ERK 抗体と各神経ペプチド (OXT、AVP、CRH) に対する抗体の共発現細胞数/神経ペプチド (OXT、AVP、CRH) に対する抗体陽性細胞数 \times 100 とした。

4. 研究成果

(1) 片側 PD モデルラット作製の可否の検証

線条体と中脳黒質緻密部において、Sham 群では両側でドパミン産生細胞の免疫反応が認められたのに対し (Fig.1 A、B) 6-OHDA 群では左側 (6-OHDA 注入側) におけるドパミン産生細胞の免疫反応性の低下が認められた (Fig.1 C、D)。

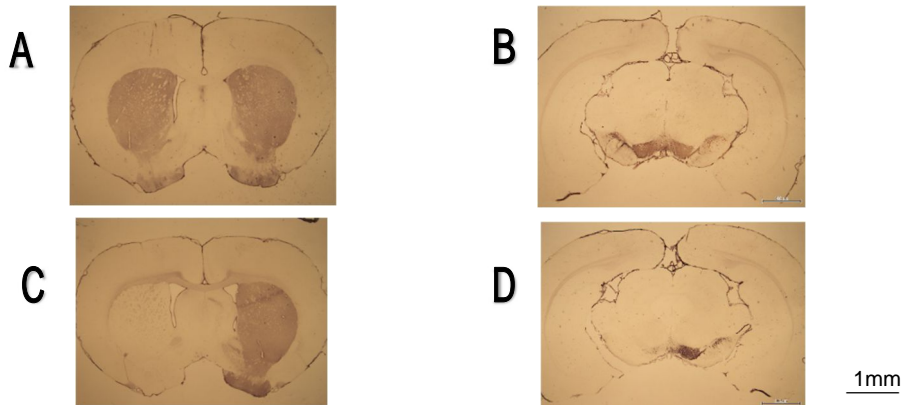


Fig.1 線条体と中脳黒質緻密部における抗 TH 抗体による免疫染色の顕微鏡写真
A : Sham 群線条体、B : Sham 群黒質緻密部、C : 6-OHDA 群線条体、D : 6-OHDA 群黒質緻密部

(2) 炎症性疼痛に対する Vc の反応性の評価

Vc における抗 p-ERK 抗体陽性細胞の発現を計数した結果、Sham 群と 6-OHDA 群のいずれにおいても、No injection 群に比べて、Formalin injection 群で抗 p-ERK 抗体陽性細胞数が有意に増加した。さらに、Formalin injection 群で、Sham 群と 6-OHDA 群の抗 p-ERK 抗体陽性細胞数を比較したところ、6-OHDA 群で有意に多くの抗 p-ERK 抗体陽性細胞数が認められた。これらの結果から、6-OHDA 群のラットでは、口腔顔面領域の痛覚過敏状態にあることが示唆された (Fig.2)。

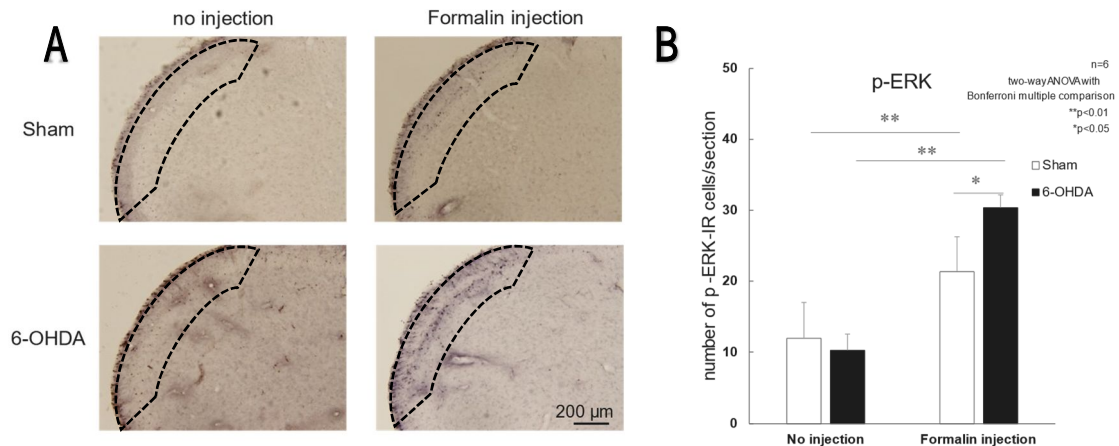


Fig.2 A: Vc における抗 p-ERK 抗体による免疫染色の顕微鏡写真
B: p-ERK 陽性細胞数の比較 (平均値 ± 標準誤差)

(3) 各神経ペプチドの血中濃度の ELISA Kit を用いた評価

OXT 血中濃度の評価

Sham 群のラットでは、No injection 群に比べて Formalin injection 群で OXT 血中濃度が有意に増加した。一方、6-OHDA 群では、No injection 群と Formalin injection 群の間に有意な変化は認められなかった。さらに、Formalin injection 群の Sham 群と 6-OHDA 群を比較したところ、Sham 群に比べて 6-OHDA 群の OXT 血中濃度は有意に低かった (Fig.3)。これらの結果から、通常、ホルマリン注射によって疼痛刺激が加えられた場合、OXT の血中濃度は増加するが、6-OHDA を注入されたラットでは、この増加は抑制されることが示された。

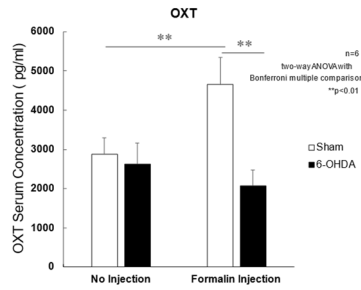


Fig.3 OXT 血中濃度の比較 (平均値 ± 標準誤差)

CRH 血中濃度の評価

Sham 群では No injection 群に比べて Formalin injection 群で、CRH 血中濃度が有意に増加した。一方、6-OHDA 群では No injection 群と Formalin injection 群の間に著名な変化は認められなかった。さらに、Formalin injection 群の Sham 群と 6-OHDA 群を比較したところ、6-OHDA 群の CRH 血中濃度は、Sham 群に比べて有意に低かった (Fig.4)。これらの結果から、ホルマリン注射による疼痛刺激によって、通常、CRH の血中濃度は増加するが、6-OHDA 注入によって、この増加は抑制されることが示された。

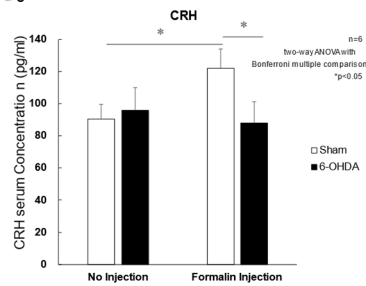


Fig.4 CRH 血中濃度の比較 (平均値 ± 標準誤差)

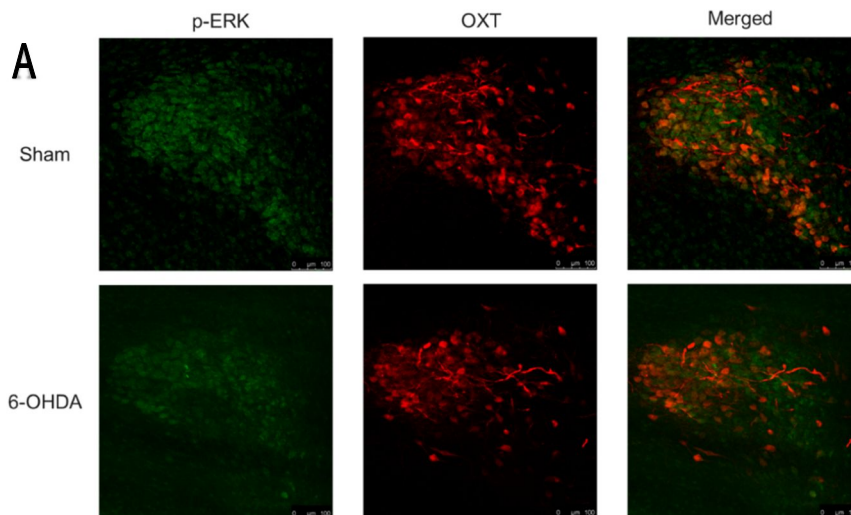
AVP 血中濃度の評価

AVP 血中濃度には、各群で有意な変化は認められなかった。

(4) 抗 p-ERK 抗体と各神経ペプチドに対する抗体の蛍光二重染色の結果

抗 OXT 抗体と抗 p-ERK 抗体の共発現率の評価

Sham 群では、No injection 群に比べて Formalin injection 群で共発現率が有意に増加した。一方、6-OHDA 群では、No injection 群と Formalin injection 群間に有意な共発現率の変化は認められなかった。さらに、Formalin injection 群の Sham 群と 6-OHDA 群を比較したところ、Sham 群に比べて 6-OHDA 群の共発現率は有意に低かった (Fig.5B)。これらの結果から、ホルマリン刺激によって、通常、OXT 産生細胞の神経活動性は亢進するが、この神経活動性の亢進は 6-OHDA 注入によって抑制されることが示された。



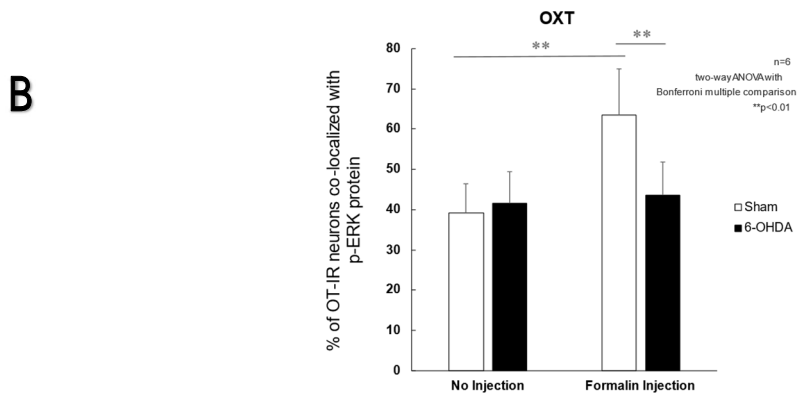


Fig.5 PVNにおける抗 p-ERK 抗体と抗 OXT 抗体による蛍光二重染色
 A : 抗 OXT 抗体と抗 p ERK 抗体による蛍光二重染色の顕微鏡写真
 B : OXT 陽性細胞と p ERK 陽性細胞の共存率 (平均値 ± 標準誤差)

抗 AVP 抗体と抗 p ERK 抗体の共発現率の評価

No injection 群と Formalin injection 群のいずれにおいても、Sham 群に比べて 6-OHDA 群の共発現率が有意に低かった。また、Sham 群と 6-OHDA 群のいずれにおいても、No injection 群と Formalin injection 群の間に有意な変化は認められなかった (Fig.6B)。これらの結果から、AVP 産生細胞の神経活動性は、6-OHDA 注入によって抑制されるが、ホルマリンによる炎症性疼痛刺激に対しては、影響されないことが明らかとなった。

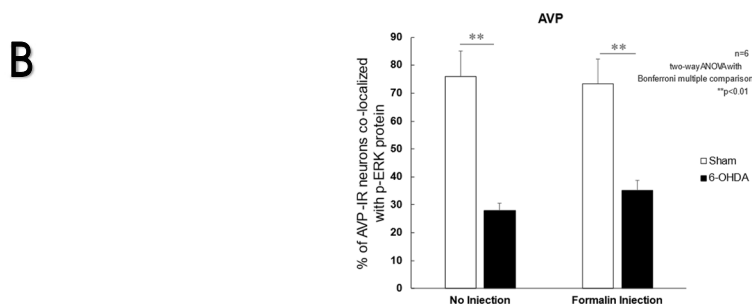
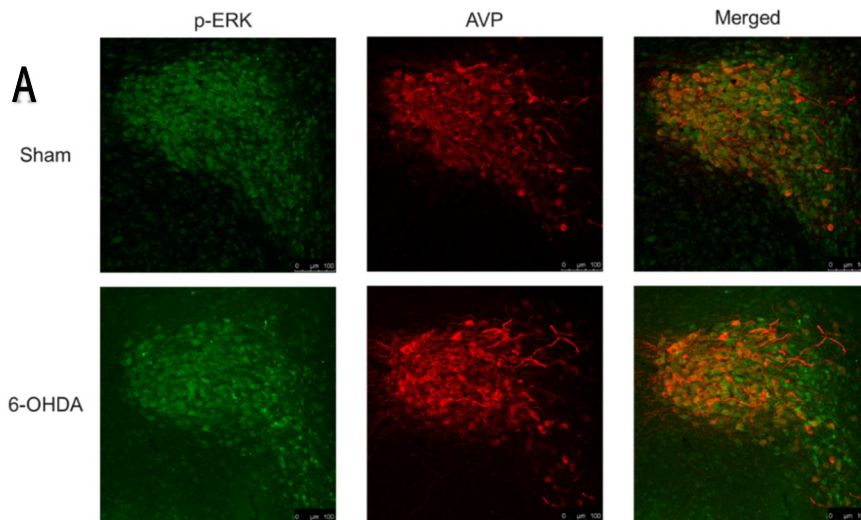


Fig.6 PVNにおける抗 p-ERK 抗体と抗 AVP 抗体による蛍光二重染色
 A : 抗 AVP と抗 p ERK 抗体による蛍光二重染色の顕微鏡写真
 B : AVP 陽性細胞と p ERK 陽性細胞の共存率 (平均値 ± 標準誤差)

以上の結果から、PD モデルラットに生じる痛覚過敏には、6-OHDA 投与に伴い PVN に存在する OXT 産生細胞と CRH 産生細胞の疼痛刺激に対する活性の低下が関与していることが示唆された。OXT と CRH は痛覚の制御に関与していることが知られており、PD においては、PVN における OXT と CRH 産生細胞の活性低下が痛覚過敏を誘発していると推測される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yang Shengsen, Usami Nayuka, Maegawa Hiroharu, Toyama Midori, Shigemasa Hiroaki, Ueda Mayuka, Kudo Chiho, Niwa Hitoshi
2. 発表標題 Hormonal mechanisms of the paraventricular nuclei in the hyperalgesia in the Parkinson's disease model rats
3. 学会等名 The 14th Annual Meeting of the Federation of Asian Dental Anesthesiology Societies (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yang Shengsen, Usami Nayuka, Maegawa Hiroharu, Toyama Midori, Shigemasa Hiroaki, Ueda Mayuka, Kudo Chiho, Niwa Hitoshi
2. 発表標題 Hormonal mechanisms of the paraventricular nuclei in the hyperalgesia in the Parkinson's disease model rats
3. 学会等名 Oral Neuroscience 2023 (国際学会)
4. 発表年 2024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	前川 博治 (Maegawa Hiroharu) (10711012)	大阪大学・歯学部附属病院・講師 (14401)	

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