

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670093

研究課題名(和文) 慢性的なストレス負荷による新たなミクログリア作動原理の解明

研究課題名(英文) a mechanism underlying microglial activation by chronic stress

研究代表者

木山 博資 (Kiyama, Hiroshi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00192021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疲労症候群(CFS)や線維筋痛症(FM)などのモデル動物を用いて、病的疼痛の分子メカニズム、特にミクログリアの関与を明らかにすることをめざした。これらの慢性ストレスモデルでは末梢組織の明らかな炎症や損傷は見られないが、中枢の脊髄後角においてミクログリアの増殖と活性化が認められた。CFSモデルにおいてミクログリアの活性化を抑制すると病的な疼痛は抑制された。脊髄後角のミクログリア活性化の領域は固有感覚の入力部位に一致していること、抗重力筋や脊髄神経節の検索から、固有感覚の慢性的な過剰刺激がこれらの疾患の引金になっている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Patients with fibromyalgia (FM) and chronic fatigue syndrome (CFS) suffer from chronic pain and severe fatigue. To analyze molecular mechanisms underlying the pain, we employed CFS and FM animal models. We found significant accumulation and activation of microglia in the lumbar level of dorsal horn of spinal cord, although no inflammatory and injurious incidents were observed in peripheral tissues and peripheral blood. Minocycline treatment suppressed both microglial activation and pain behavior in CFS animal model. Further analysis on dorsal root ganglia and anti-gravity muscle suggests that a chronic hyper-activation of proprioceptor may activate microglia in the dorsal horn, and the locally activated microglia may be associated with the abnormal pain.

研究分野：神経解剖学

キーワード：ミクログリア 疼痛 慢性疲労 線維筋痛症

1. 研究開始当初の背景

慢性疲労症候群(CFS)や線維筋痛症(FM)など機能性身体症候群は慢性的な過度の疲労感や睡眠障害、疼痛・炎症など様々な症状を呈する疾患であり、器質的異常がみられず、その原因が不明の疾患である。原因の一端は最近の複雑な社会的環境的ストレスによると考えられている。慢性的かつ複合的なストレスは、個体を防御し健康を維持する仕組み(内分泌系や免疫系・神経系による恒常性の維持機構)を破綻させ、その結果複雑な症候を呈すると考えられている。これらの疾患の共通な症状のうち特に問題となる疼痛や発熱・炎症等は一般生活での活動性を極度に低下させるため、その治療法の開発が喫緊の課題となっている。

これらの疾患の病態解明のためには、少なくとも一部類似の症状を呈するモデル動物が必須である。我々は以前よりこれら疾患のモデル動物の確立を試みていた。そのなかで、単一でなく複合的なストレスを慢性的に負荷することにより、CFSに見られるいくつかの症状を呈するラットモデルが得られた。我々は以前の研究において、このラットの視床下部や内分泌系臓器の一部に著しい分子発現の変化や細胞死が生じていることを発表した(Ogawa et al,2005,2009,2012, Konishi et al,2010,2011)。さらにこのモデル動物で得られた血漿中の MSH の増加が、罹患5年以内の CFS 患者血漿中でも有意に上昇していることを明らかにし、このモデル動物の妥当性を示唆した(Shishioh-Ikejima et al,2010)。一方、FMモデルとしては、水村和枝教授(名古屋大学名誉教授;現中部大教授)らのグループが行っているRCS(repeated cold stress)モデルがFM様の痛覚過敏を呈するモデルとして知られている(RCSモデルでは5日間の寒冷温暖交互刺激で筋痛やアロディニアがみられる)

(Nasu et al, Eur J Pain, 2010)。この他、レゼルピンの数回投与動物においてもFM様の筋痛が見られることが知られている(Nagakura et al, Pain 2009)。

最近、CFSモデル動物において、ヒトの場合と同様に筋痛などの知覚異常が生じていることを我々は新たに発見し、興味深いことにFMモデルでもCFSモデルでも脊髄後角の限局した部位にミクログリアが活性化していることに気づいた。これらのミクログリアの動態は神経損傷時や末梢炎症時に見られるグリア応答とはかなり異なっている。異なる複数のモデルで共通の現象が脊髄に生じており、ここに二つの疾患の共通症状を説明する鍵があり、本研究がミクログリアを介した新たな病態を理解する端緒となると考え、本研究を提案した。

2. 研究の目的

現在まで科学的な立証が難しいが、その解明が社会から強く望まれている線維筋痛症(FM)や慢性疲労症候群(CFS)等に焦点をあて、それら疾患で見られる病的疼痛の原因が中枢のミクログリアにある可能性を検証し、複合的な慢性ストレスによるミクログリア活性化のメカニズムを明らかにする。そのため、最近開発され再現性の高いCFSやFMのモデル動物を用い、骨格筋・知覚神経・運動神経など末梢での炎症・傷害・分子動態、さらに中枢におけるミクログリアの動態やその基盤となる分子発現を明らかにする。これによりCFSやFMにみられる疼痛や他の症状の原因の一端の解明が期待される。

3. 研究の方法

(1)モデル動物

本研究ではラットを用い、慢性疲労症候群モデルとしてLow Water Level Stage (LWS)動物モデル(Ogawa et al, J Neurochem 2009, J Neuroendocrinol 2012)、線維筋痛症モデルとして知られる

Repetitive Cold Stress (RCS)動物モデル (Nasu et al, Eur J Pain, 2010)、レゼルピンによる線維筋痛症(RFM)動物モデル (Nagakura et al, Pain 2009)、の3モデルを用いて研究した。一部の研究は本学他研究科や他機関の研究者との共同研究としておこなった。本研究のうち本学で行なった動物実験については機関内での承認を得ている。

LWSモデルでは、1.5cmの高さに水を入れたケージ内でラットを飼育することにより、部分的断眠(レム睡眠の欠乏、ノンレム睡眠の半減)・生体リズム障害(昼夜に関わらず自発行動量が増加する)・水に対するストレス(コルチコステロンの一時的増加)など複合的なストレス負荷を安定的にかけることができる。一方、このモデルではラットは拘束ストレスのように消化管に潰瘍ができない。また、ACTHやCRHの著明な増加は見られない。また摂食量には大きな変化は見られない。5日の慢性ストレス後にストレス負荷を除くと、活動リズムや睡眠量は約2日で正常に戻る。一方、線維筋痛症(FM)モデルでは通常のラットケージを用い、ケージ内の温度を30分ごとに室温と4℃に変え夜間は低温にするモデルである。本モデルでは筋痛が生じることが知られている(Nasu et al, Eur J Pain, 2010)。レゼルピンは3日間に渡り投与することにより持続性の筋痛とアロディニアが生じることが知られている(Nagakura et al, Pain 2009)。

(2)疼痛の計測

足底でのアロディニアの計測には von Frey テストをおこなった。また、筋痛の計測には、Randal-Seritto テストを行なった。

(3)末梢の筋や皮膚の障害の有無の検討

CFS や FM モデルを用いた予備実験に

おいて、アロディニアが見られた足底や筋痛が見られた前頸骨筋での炎症の有無を検討するために、HE 染色などの通常組織検索のほか、リンパ球マーカーなどを用いて末梢組織を再検討する。さらに生化学的に筋の疲労や損傷を確認するため C reactive protein (CRP)、乳酸やクレアチンキナーゼ (CK) の血中濃度などを計測した。

(4)行動計測

以前の研究から少なくとも LWS モデル動物では昼間(ラットの休息期)の自発行動量の増加が観察されている。そこでビデオ撮影により、本モデルでの24時間の行動をモニターし、特殊な筋への負荷の有無などを検討した。

(5)免疫染色

ミクログリアの形態は Iba1 抗体等ミクログリアマーカーを用いて免疫組織化学的に解析した。その他、障害神経マーカーとして ATF3 抗体などを用いた。また、後根神経節の神経機能の同定には TrkA, TrkB, TrkC, VGluR1 などの抗体を用いた。

(6)脊運動ニューロン支配筋の同定

逆行性トレーサーとしてフルオロゴールドを下肢の筋や関節、足底に注入した。

4. 研究成果

慢性ストレス負荷による疼痛発症の仕組みを解明するために3つの異なる慢性ストレスモデルを用いて検討した。慢性疲労モデルと考えられている Low Water Level Stage (LWS)モデルでは5日間の慢性ストレス負荷により足底のアロディニアや筋の圧痛が生じた。また、Repetitive Cold Stress (RCS)モデルにおいても5日間のストレス負荷後アロディニアや筋の圧痛が認められた。さらにレゼルピンを複数回投与するモデルにおいては長期にわたって筋痛

が生じた。これらのモデル動物においては、明らかな末梢組織の炎症や神経の物理的損傷は認められなかった。また、LWS モデルにおいて末梢血中の炎症マーカーの CRP、疲労マーカーの乳酸、組織損傷マーカーのクレアチンキナーゼ CK を測定したが、いずれもコントロールレベルと有意な差は見られなかった。このことから、これらのモデルで生じている病的疼痛は末梢の組織炎症や損傷によるものではないと考えられた。そこで脊髄を中心に脳内のミクログリアやアストロサイト等のグリア動態を観察した所、いずれのモデル動物においても脊髄後角に活性化したミクログリアが認められた。LWS モデルでは、脊髄後角の内側領域で浅層から深層にわたって活性化したミクログリアの増殖が認められた。RCS モデルにおいても同様の領域にミクログリアの集積が認められた。一方、レゼルピンモデルでは脊髄後角のミクログリアの増加は他のモデル程著しくはないが、後角浅層のミクログリアの形態は活性化型に変化していた。このことは、ストレスの負荷方法によらず慢性的なストレスが、脊髄後角のミクログリア活性化につながっていることを示す。慢性ストレス下でのミクログリア活性化の原因を明らかにするために、LWS モデルラットを用いてさらに解析を進めた。ミクログリアの活性化はミノサイクリンで抑制できる。そこで、LWS モデルラットの髄腔内にミノサイクリンを継続的に投与した。その結果、アロディニアの疼痛閾値は半分程度上昇した。また、筋痛の閾値は正常に近い値にまで上昇した。このことから脊髄後角のミクログリア活性化が病的疼痛の原因の一端であると考えられた。また、LWS モデルではミクログリアの増殖活性化部位は固有感覚が入力する領域に一致すること。また、LWS モデルの後根神経節の固有感覚ニューロンで ATF 3 の発現が観察されたこ

とから固有感覚ニューロンの過活動が予想できる。また、LWS モデルで負荷をさらに 1 日延長すると脊髄前角の一部にミクログリアの集積と活性化が認められた。この場合、ミクログリアは運動ニューロンを取り囲むように局在していた。この運動ニューロンの投射筋等を検討するために、逆行性のトレーサーであるフルオロゴールドを末梢の各種筋や関節、あるいは足底に注入した。その結果、ヒラメ筋にフルオロゴールドを注入した場合に標識される運動ニューロンの周囲にミクログリアの集積が認められた。また、他の筋への注入や関節・足底への注入では標識ニューロンとミクログリア局在の関係は見られなかった。以上の研究成果から、慢性的なストレス負荷は固有感覚の慢性的な過活動を引き起こし、これが脊髄内の一部のミクログリアの活性化につながり、病的な疼痛を起こしている可能性が考えられた。

引用文献

Konishi H, Ogawa T, Kawahara S, Matsumoto S, Kiayam H (2011) Continuous stress-induced dopamine dysregulation augments PAP-I and PAP-II expression in melanotrophs of the pituitary gland *Biochem Biophys Res Commun* 407(1): 7-12

Konishi H, Ogawa T, Nakagomi S, Inoue K, Tohyama M, Kiyama H (2010) Id1, Id2 and Id3 are induced in rat melanotrophs of the pituitary gland by dopamine suppression under continuous stress, *Neuroscience* 169: 1527-1534

Ogawa T, Kiryu-Seo S, Tanaka M, Konishi H, Iwata N, Saido T, Watanabe Y, Kiyama H (2005) Altered expression of neprilysin family members in pituitary gland of sleep-disturbed rat, an animal model of severe fatigue. *J Neurochem* 95(4):1156-1166

Ogawa T, Sei H, Konishi H, Shishioh-Ikejima N, Kiyama H, (2012) The absence of somatotroph proliferation during continuous stress is due to the lack of ERK1/2 activation, *J Neuroendocrinol* 24(10): 1335-1345.

Ogawa T, Shishioh-Ikejima N, Konishi H, Makino T, Sei H, Kiryu-Seo S, Tanaka M, Watanabe Y, Kiyama H (2009) Chronic stress elicits prolonged activation of α -MSH secretion and subsequent degeneration of melanotroph, *J Neurochem* 109, 1389–1399.

Nagakura Y, Oe T, Aoki T, Matsuoka N. (2009) Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia, *Pain*, 146(1-2):26-33.

Nasu T, Taguchi T, Mizumura K. (2010) Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats, *Eur J Pain*, 14(3):236-44

Shishioh-Ikejima N, Ogawa T, Yamaguti K, Watanabe Y, Kuratsune H, Kiyama H (2010) The increase of alpha-melanocyte-stimulating hormone in the plasma of chronic fatigue syndrome patients *BMC Neurology* 10:73

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2 件)

Yasui M, Yoshimura T, Takeuchi S, Tokizane K, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H, (2014) A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation, *Glia* 62(9):1407-1417, 査読有り
DOI: 10.1002/glia.22687

Akagi T, Matsumura Y, Yasui M, Minami E, Inoue H, Masuda T, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Mizumura K, Tsuda M, Kiyama H, Inoue K, (2014) Interferon regulatory factor 8 expressed in microglia contributes to tactile allodynia induced by repeated cold stress in rodents, *J Pharmacol Sci* 126(2):172-176, 査読有り
DOI: 10.1254/jphs.14143SC

[学会発表](計 3 件)

木山博資、慢性疲労モデルにおける痛覚異常のメカニズム：薬理学会 2015 年 3 月 20 日、名古屋国際会議場、愛知県・名古屋市

安井正佐也，時實恭平，校條由紀，木山博資、複合ストレスにより惹起される病的疼痛はミクログリアが関与する：第 67 回日本自律神経学会 2014 年 10 月 30 日、ラフレさいたま、埼玉県・さいたま市

木山博資、安井正佐也，時實恭平、慢性ストレスモデルにおける病的疼痛とグリア動態：第 10 回日本疲労学会総会・学術集会、2014 年 5 月 30 日、コングレコンベンションセンター、大阪府・大阪市

6 . 研究組織

(1)研究代表者

木山 博資 (KIYAMA HIROSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00192021