

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893084

研究課題名(和文)うつ病モデルラットを用いた疼痛性障害発症の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pain disorder onset with depression model rat

研究代表者

高橋 功次郎(TAKAHASHI, KOJIRO)

新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40736625

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病モデルラットを用いて、うつ関連型疼痛性障害の神経機構を解明するために、行動学的実験による逃避行動分析、痛みに関与する神経活動の電気生理学的解析および疼痛性障害に対する抗うつ薬の中枢性および末梢性薬理作用の分析を試みた。また、疼痛性障害と脳内セロトニン減少の関連、痛みを受容する末梢受容器に影響を与える神経ペプチドの存在、脳内セロトニンの増加による疼痛性障害の軽減について検討した。

研究成果の概要(英文)：Using a depression model rat, in order to elucidate the neural mechanisms of depression-related type pain disorder, escape behavior analysis by behavioral experiments, anti-depressants for the electrophysiological analysis and pain disorders of neural activity that are involved in pain central of medicine and tried to analysis of peripheral pharmacological action. In addition, related pain disorders and brain serotonin decrease, the presence of the neuropeptides that affect the peripheral receptors to receive the pain, was studied relief of pain disorders due to the increase in brain serotonin.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：疼痛性障害 うつ病 セロトニン 神経ペプチド

1. 研究開始当初の背景

ストレス社会といわれる現代において、うつ病等の神経症を患う人が急激に増加している。うつ病は、不眠・憂鬱感・食欲不振・全身倦怠など様々な症状を生じる。痛みと心理社会的要因の関係は深い関係にあり、心理社会的問題は身体疾患に基づく痛みを修飾する。急性痛は主に体性感覚入力によって引き起こされるが、苦痛と疼痛行動においては、時間経過と共に心理社会的要因による影響が大きくなる(Okeson JP, ベルの口腔顔面痛, クインテッセンス出版, 1998)(図1)。

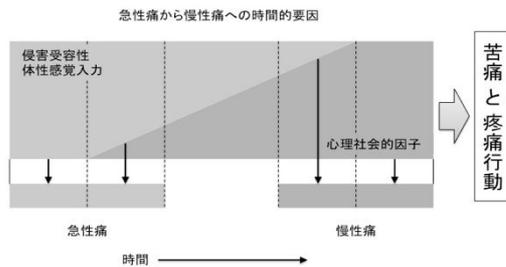


図1 疼痛と時間的要因

うつ病が引き起こす障害のひとつに、耐え難い痛みがいつまでも続く疼痛性障害 (pain disorder) と呼ばれる神経症がある。この病気を抱える患者は、歯科臨床の現場においても少なからず存在し、精神・神経科領域の専門知識を持つ歯科医の育成など、早急な対応がもとめられる。近年、慢性疼痛に対して、三環系抗うつ薬の使用が保険診療にて認められ、疼痛性障害に対して処方できるようになり、実際、セロトニンの再吸収を妨げる働きを持つ三環系抗うつ薬の服用により、疼痛性障害が改善されることもある。しかしながら、すべての場合に有効ではない。

難治性の疼痛性障害に対する治療薬として、多くの治療薬が用いられている。治療薬のゴールドスタンダードとして、Pregabalin が挙げられるが、浮動性めまいや傾眠などの副作用の報告がある。そこで、新たな疼痛治療薬の候補として、カンナビノイドが挙げられる。カンナビノイドは、カンナビノイド受容体の agonist であり、大麻草の成分である 9-Tetrahydrocannabinol (THC) や脳内で合成される内因性カンナビノイドがある。カンナビノイド系薬物の使用は、日本では医療目的であっても禁止されており、カンナビノイドを疼痛治療に用いるには、内因性カンナビノイド分解酵素阻害剤などによる内因性カンナビノイドの増加によって、鎮痛作用が生じる。

疼痛性障害に三環系抗うつ薬が有効な場合と効果を示さない場合があることから、疼痛性障害発症のメカニズムについて仮説を立てた。

つまり、脳内セロトニン量の減少が、間接的に末梢侵害受容体の閾値を下げ、痛みに対する感受性を高くする。この状態は脳内セロトニン量が増えても、改善されないということである。

2. 研究の目的

ストレス社会である現代において、耐え難い痛みがいつまでも続く疼痛性障害 (pain disorder) が歯科領域においても問題となっている。その原因として、脳内神経伝達物質であるセロトニンの不足の関与が示唆されているが、すべてのことが明らかになっていない。そこで、うつ病モデルラットを用いて、うつ関連型疼痛性障害の神経機構を解明するために、行動学的実験による逃避行動分析、痛みに関与する神経活動の電気生理学的解析および疼痛性障害に対する抗うつ薬の中枢性および末梢性薬理作用の分析を行う。これにより、疼痛性障害と脳内セロトニン減少の関連、痛みを受容する末梢受容体に影響を与える神経ペプチドの存在、脳内セロトニンの増加による疼痛性障害の軽減について明らかにする。

3. 研究の方法

本研究はうつ病モデルラットを用い、(1)疼痛性障害に脳内セロトニンの減少が、どの程度関与しているのか?、(2)どのような神経ペプチドが、痛みを受容する末梢受容体に影響を与えるのか?、(3)脳内セロトニンが増加した後で、疼痛性障害が軽減されるのか?

これらを明らかにするために、行動学的実験による分析、痛みに関与する神経活動の電気生理学的解析および抗うつ薬の投与による薬理学的実験を行い多角的に検討し、疼痛性障害の神経機構を解明する。

うつ病モデルラットについて

本研究では、実験動物として、うつ病モデルラットを用いる。ラットを逃避不可能な水槽に入れると、積極的な脱出探索行動が観察される。しかしながら、やがて脱出不可能と判断すると、無動状態となる。この刺激への反応性や自発運動の減少は、うつ病の症状によく似ているため、うつ病モデルラットまたは絶望モデルラットと呼ばれ、このうつ病モデルラットに抗うつ薬を与えると行動性が増すことが知られている(Borsini F et al. Psychopharmacology. 1989;97:183-188. Lu XY et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006;130:1593-1598.)。うつ病に関連した疼痛性障害と抗うつ薬の効果とその神経機構の解明を目的とした本研究には、このモデルラットは大いに役立つと思われる、このモデルを作成し、実験に使用することとした。

実験手順

(1)強制水泳試験によるうつ病ラットの選別

ラットを深い水槽に入れ、必死で四肢をバタバタと動かし、浮いていようとするラットと、何もしないで諦めたように動かないラット(無動ラット・うつ病ラット)を分類する。この方法は、強制水泳テスト (Forced Swimming Test: FST) と呼ばれ、抗うつ薬の有効性のスクリーニングテストなどに用いられている (Porsolt DC et al. Arch. Int. Pharmacodyn.

Ther. 1977;229:327-336. Porsolt DC et al. Eur. J. Pharmacol. 1978;47:379-391.)。

(2)逃避行動解析による疼痛性障害ラットの選別
von-Frey 刺激毛を用いて、うつ病ラットの足裏に定量的な痛み刺激を与え、その逃避閾値を測定 (Kitagawa et al. J. Neurophysiol. 2005;93:3594-3604. Kitagawa et al. J. Neurophysiol. 2005;94:4178-4187.)し、結果を比較することでさらに疼痛性障害モデルマウスを選別する。

(3)三環系抗うつ薬投与による疼痛性障害の変調

(2)で得られたうつ関連型疼痛性障害をもつラットに三環系抗うつ剤を投与する。その後、再度強制水泳テストを行うことで、刺激への反応性や自発運動の変調を観察し、疼痛性障害の症状の改善が認められたラットと認められなかったラットに選別する。

(4)電気生理学的実験

強制水泳テストと行動学的実験により判定された疼痛性障害をもつラットが、どのレベル(末梢侵害受容器または脊髄後角部位)で痛覚受容の変調が起きているのかを調べるために、通常ラット、疼痛性障害をもつラットおよび疼痛性障害がないうつ病ラットを用いて以下の実験を行う。

末梢侵害受容器に痛覚受容の変調が起きているか?を調べるために、それぞれのラットに麻酔を施し、足の神経に關係する脊髄神経節(L4 または L5)を剖出する。神経節に細胞外記録用電極を挿入し、ラット足裏を触りながら、刺激に回答する単一ニューロンを検索する。von-Frey 刺激毛を使って、足裏に触(機械)刺激や痛み刺激を与え、刺激の大きさ(強さ)とこれらに対する回答の關係(回答特性)を調べる (Kitagawa et al. J. Neurophysiol.2005;93:3594-3604. Kitagawa et al. J. Neurophysiol. 2005;94:4178-4187.)。

複雑なニューロン結合によって異なった種類の求心線維間の干渉や下行路を介しての求心線維に対する脳の選択的干渉が行われている脊髄後角における痛覚受容の変調を調べるために、脊髄後角へ記録電極を刺入し、ラット足裏へ刺激をしながら、痛みに關与する単一神経応答を検索し、von-Frey 刺激毛を用いて、与えた刺激に対するニューロンの応答特性を調べる (Kitagawa et al. J. Neurophysiol. 2005;93:3594-3604. Kitagawa et al. J. Neurophysiol. 2005;94:4178-4187.)。

(5)ホールセルパッチクランプ法

痛み受容に關わる神経細胞の興奮のしやすさ、細胞の刺激感受性を解析するために、パッチクランプ法にて実験を行う。脊髄神経節(L4 または L5)を酵素処理によって分離する。痛み刺激部位に由来する細胞と判断するために、事前に足

裏に注入した蛍光色素によりラベリングされた細胞のみパッチクランプ実験に使う。痛覚を伝える神経線維である A -fiber と C-fiber の神経細胞を細胞直径により選別し、細胞膜の興奮性の変調に關わる K⁺ (IA および IK 電流)、Ih 電流 (hyperpolarization-activated current)などの電位依存性のチャネル電流に対する変調を調べる (Tsuboi et al. Pain. 2004;111:323-334. Kitagawa et al. Eur. J. Neurosci. 2006;24:1976-1986.)。上述のパッチクランプ実験を、通常ラット、疼痛性障害をもつラット、疼痛性障害がないうつ病ラットおよび抗うつ薬により疼痛性障害が改善されたラットに行い、結果を比較し、うつ病との関連性を探る。

4. 研究成果

うつ病に關与していると考えられるカンナビノイドレセプター (CB1 レセプター)の分布を検討し、海馬や小脳および延髄で多く発現していることが確認された。内因性カンナビノイドには、2-Arachidonoyl Glycerol (2-AG) や N-arachidonylethanolamine (AEA , Anandamide)が含まれる。カンナビノイド受容体に対する親和性は AEA より高いため、内因性カンナビノイドが鎮痛作用に与える影響は、2-AG によるものが大きいと考えられる。2-AG は、diacycle glycerol から diacycle glycerol lipase (DAGL) によって合成され、monoacyleglycerol lipase (MAGL) によって分解される。さらに、脳内で産生されるカンナビノイド(エンドカンナビノイド)の分解を阻害する薬剤 (JZL187)を用い、エンドカンナビノイドの局在性を、免疫組織化学染色法を用いて検討した。(図2)

強拡大像 (DAGL)

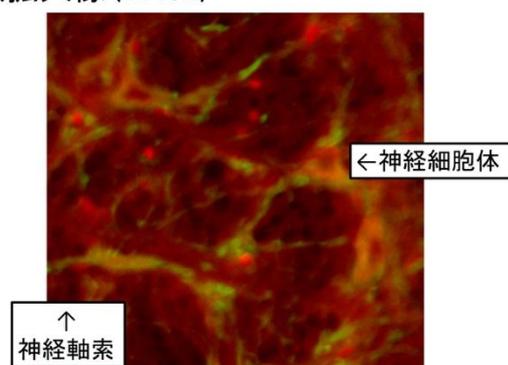


図2 免疫組織化学染色像

DAGL、および MAGL を樹状突起のマーカーである MAP2 と共染色を行った。本結果では、DAGL および MAGL は、三叉神経脊髄路核および視床において、神経細胞軸索の近傍および神経細胞体に発現していることが示唆された。このことから、神経細胞体で産生された DAGL および MAGL が軸索輸送され、神経細胞終末から放出されていることを示していると考えられた。

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 1 件)

Takatsuji H, Takahashi K, Kitagawa J.
Physiological and pharmacological actions
involved in the pharyngeal and laryngeal
sensation. Nihon Yakurigaku Zasshi (査読
あり)145(6) 2015. 278-82.

6．研究組織

(1)研究代表者

高橋 功次郎 (TAKAHASHI KOJIRO)
新潟大学・医歯学総合病院・医員

研究者番号：40736625