

厚生労働科学研究費補助金（慢性の痛み対策研究事業）
分担研究報告書

「情動的側面に着目した慢性疼痛の病態解明と診断・評価法の開発（H23-痛み-一般-001）」
慢性疼痛マーカーとなる情動関連分子の探索

研究分担者：井上 和秀（九州大学薬学研究院 教授）

研究代表者：南 雅文（北海道大学薬学研究院 教授）

研究要旨

昨年度までの神経障害性疼痛モデルラットを用いた研究における Gene chip assay の結果から、痛みによる負情動生成に関与すると考えられる複数の遺伝子を、慢性疼痛マーカー候補分子群として見出した。本年度は、動物種による相違の有無を検討するため、神経障害性疼痛モデルマウスの分界条床核における定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うと共に、慢性軽度ストレス負荷モデル（Chronic mild stress; CMS）動物の分界条床核における遺伝子発現変化と比較検討した。腹側分界条床核における β_1 ノルアドレナリン受容体遺伝子および 5-HT_{2A} セロトニン受容体遺伝子が神経障害性疼痛モデルマウスで有意に発現増加することを見出した。これら受容体分子が慢性疼痛評価に役立つマーカー分子となる可能性が示された。

A．研究目的

痛みによる不安、抑うつ、嫌悪などの負情動は、生体警告系としての痛みの生理的役割に重要であるが、これら負情動は、QOL を著しく低下させるだけでなく、精神疾患・情動障害の引き金ともなり、また、そのような精神状態が痛みをさらに悪化させるという悪循環を生じさせ、慢性疼痛の病態において重要な役割を果たしていると考えられる。そこで本研究では、神経障害性疼痛モデル動物を用いた研究により、慢性疼痛により発現変化する情動関連分子を探索し、慢性疼痛治療のための創薬標的として、また、PET などによる慢性疼痛評価法開発に役立つマーカー分子を同定することを目的とする。

B．研究方法

慢性疼痛では、情動機能に関与する神経機構

の可塑的变化により、不安、嫌悪、抑うつなどの負情動をより強く感じるようになり、そのような精神的変容が痛みをより強く感じさせる悪循環を引き起こしていると考えられる。本研究では、痛みによる負情動生成に関与する脳領域に着目し、神経障害性疼痛モデル動物で発現変化する遺伝子群を Gene chip assay による網羅的解析により探索し、定量的 RT-PCR により発現変化を確認する。本年度は、動物種による相違の有無を検討するため、神経障害性疼痛モデルマウスにおける定量的 RT-PCR 解析によって遺伝子発現変動の確認を行うことと共に、慢性軽度ストレス負荷モデル（Chronic mild stress; CMS）動物の分界条床核における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて比較検討することにより、慢性疼痛に特異的なマーカー分子を同定することを目指して研究を行った。

実験には体重 18-28 g の雄性 BALB/c マウス

を用いた。神経障害性疼痛モデルは、6週齢の時点で坐骨神経に由来する総腓骨神経、脛骨神経、腓腹神経を露出させ、総腓骨神経と脛骨神経を5-0滅菌済シルクプレート（日本商事株式会社、大阪）で結紮し、末梢側を切断することにより作製した（Spared nerve injury model：SNIモデル）。なお、神経の露出まで行った群をSham群とした。SNI施術の前日、および術後1週間ごとに3週間後までの計4回 von Frey test を行い、機械的痛覚過敏が生じている個体を抽出するとともに、尾懸垂試験（TST：Tail suspension test）を用いて、神経障害性疼痛モデルにおける抑うつ様症状の発現を確認した後に遺伝子解析の実験に用いた。CMSモデルは、6週齢の時点から、軽度ストレスを、マウスに予測できないようランダムな順序で5週間連続負荷した（表1, 2）。ストレスの負荷はすべて19時から開始した。ストレス負荷終了後、TSTを用いて、CMSモデルにおける抑うつ様症状の発現を確認した後に遺伝子解析の実験に用いた。脳サンプルの調整を行うため、頸椎脱臼したマウスより全脳を摘出し、ピプラトームを用いて400 μm厚の冠状スライスを作製した。分界条床核

表1 CMS 負荷内容

番号	内容	ストレス負荷時間
1	ケージを45度傾ける	14時間
2	床敷を濡らす	24時間
3	絶食	24時間
4	絶水食	14時間
5	24時間点灯	24時間
6	過密飼育	24時間
7	ケージメイトの入替	24時間
8	24時間消灯	24時間
9	ケージ入替	24時間
10	何もしない	

表2 CMS 負荷日程

1週目	1	2	3	5	7	4	6
2週目	8	1	9	10	4	7	2
3週目	3	8	1	6	5	3	2
4週目	8	9	4	5	10	1	3
5週目	6	2	7	5	3	2	6

（BNST）を含む連続した2枚の脳スライスから、両側の腹側BNST（vBNST）および背外側BNST（dBNST）領域を冷PBS中でパンチアウト（直径1mm）した。作製したサンプルは、液体窒素で急速冷凍後、-80℃で保存した。RNAサンプルの調整は、3個体の脳組織を1サンプルとしてまとめ、TRIzolならびにRNeasy mini kitを用いてtotal RNAを抽出・精製した。定量的RT-PCR解析では、total RNAを鋳型として逆転写反応により得たcDNA溶液を用いた。定量的PCRは、Mx 3005P（STRATAGENE社）を用いた。PCR反応時間は、95℃、10秒で熱変性を行い、それ以降95℃で5秒、60℃で30秒の反応を40サイクル行った。反応終了後、指数関数的にDNA増幅が起こっている領域で任意にCt値を定め、Ct法を用いてサンプルのcDNA相対値を算出した。内標準にはβ-actinを用いた。なお各遺伝子のプライマーの特異性はPCR反応後の増幅産物を電気泳動し、予測分子量の位置にバンドを観察することで確かめた。

TSTでは、マウスを実験環境に30分静置して馴化させた後、マウスの尾の先端から1cmの部分にテープを巻き付け、測定装置（室町機械、東京）の尾固定部に張り付けて床から30cmの高さにぶら下げ、無動時間を6分間自動計測した。

研究の実施にあたっては、「動物の愛護及び管理に関する法律（動愛法）」を遵守し、研究

機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省告示第 71 号）及び、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（日本学会議） 国立大学法人北海道大学の動物実験に関する指針に即して、北海道大学で設けられた規程に従い立案した計画を、動物実験委員会の審議を経て研究機関の長の承認を得た上で動物実験に着手した。

C. 研究結果

1. 神経障害性疼痛モデルの作製

18 匹のマウスに対し総腓骨神経と脛骨神経結紮・切断を行った。術後 21 日目に von Frey test で機械的痛覚過敏形成の検討を行い、痛覚過敏の程度が高い上位 12 個体を遺伝子解析に用いた。TST を用いた解析において、神経障害性疼痛モデルマウスでは、sham 術群と比較して、無動時間が有意に増加しており、抑うつ様行動を発現していることが示された（図 1）。

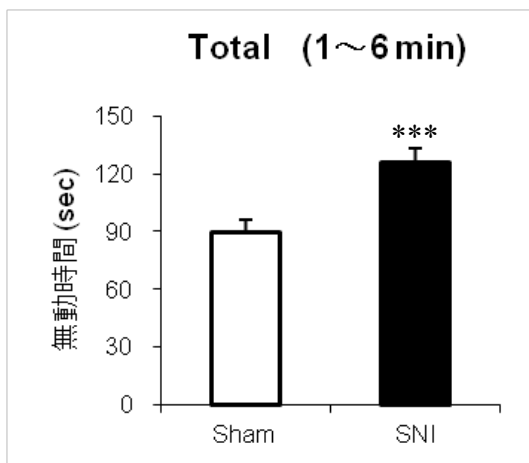


図 1 神経障害性疼痛モデルマウスにおける抑うつ様行動

TST の試験時間は 6 分、評価には試験中 1~6 分間の無動時間の合計値を用いた。n = 18, *** $P < 0.001$

2. 定量的 RT-PCR (神経障害性疼痛モデルマウス)

昨年度に引き続き、不安や抑うつ、嫌悪に関与することが報告されている受容体およびそのリガンド遺伝子ならびにそれらのシグナル

伝達パスウェイ関連分子の遺伝子に関して、dlBNST ならびに vBNST より調製したサンプルを用いて定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した。一昨年度の Gene chip assay において検討した dlBNST ならびに vBNST と、昨年度検討した前帯状回 (ACC) ならびに島皮質 (IC) の計 4 部位において発現変動が見られた遺伝子である、低分子量 G タンパク質 Ras ファミリー (RASD2)、Orphan 核内受容体 (NR4A3)、BDNF 受容体 (NTRK2)、ホーマータンパク質 (HOMER1)、アデノシン受容体 (ADORA2A) ならびに シヌクレイン (SNCG) に関しても同様に定量的 RT-PCR により発現量変化を検討した (図 2)。vBNST 領域において、5-HT_{2A} およびアドレナリン β_1 受容体 mRNA 発現量の有意な増加が観察された。一方、昨年度までの神経障害性疼痛モデルラットにおける検討において発現変動が見られた他の遺伝子に関しては、有意な変化は確認されなかった。

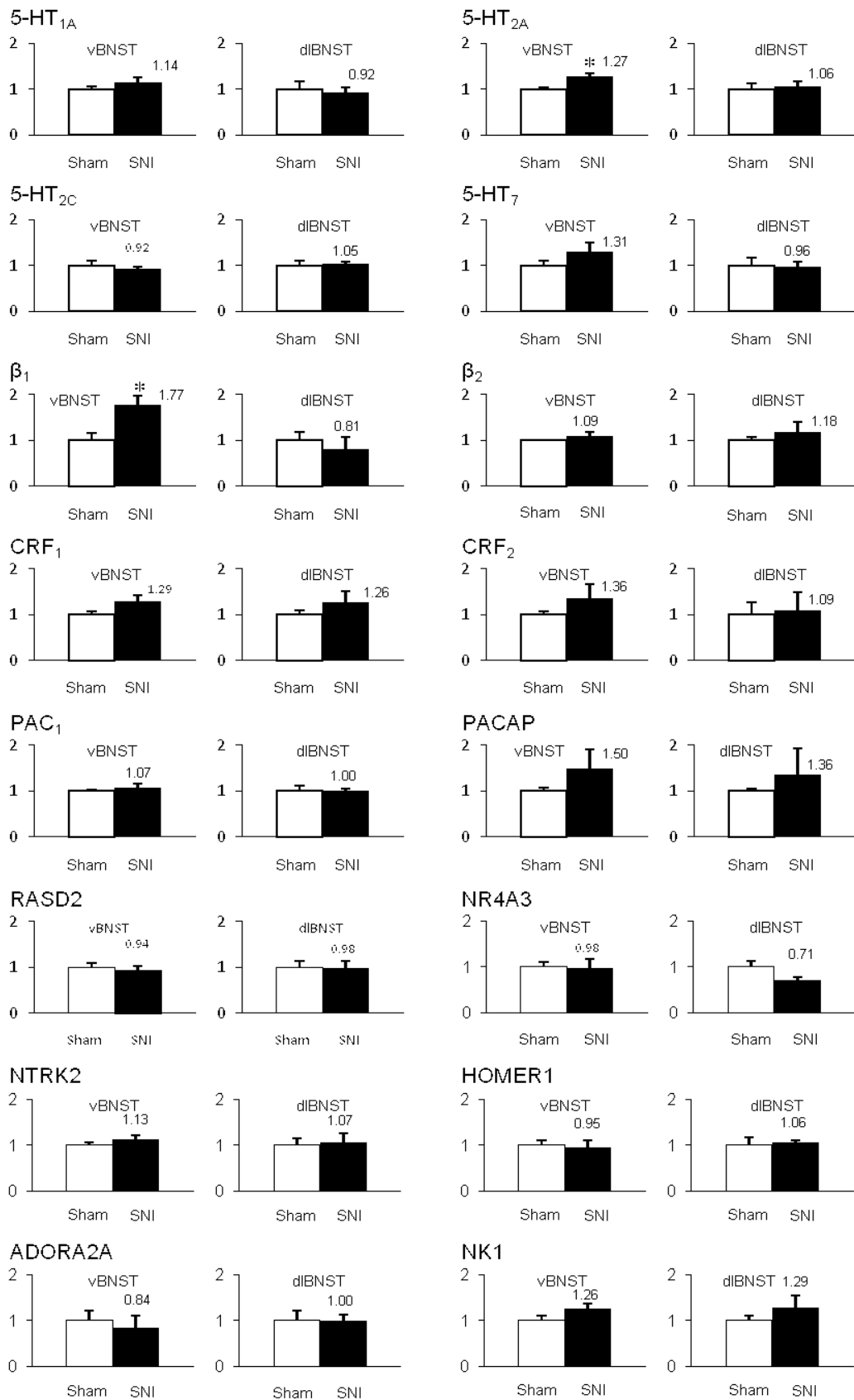


図2 神経障害性疼痛モデルマウスのvBNSTおよびdIBNST内におけるmRNA量発現変化
Sham群の発現量を1とし、SNI群の値を相対値で示した。n = 4, *P < 0.05

3. 慢性軽度ストレス負荷モデルの作製

15匹のマウスに対し5週間のCMS負荷を行った。ストレス負荷終了後にTSTを用いた解析を行ったところ、CMSモデルマウスでは、control群と比較して、無動時間が有意に増加しており、抑うつ様行動を発現していることが示された(図3)。TSTにおいて無動時間が長い、上位9個体を遺伝子解析に用いた。

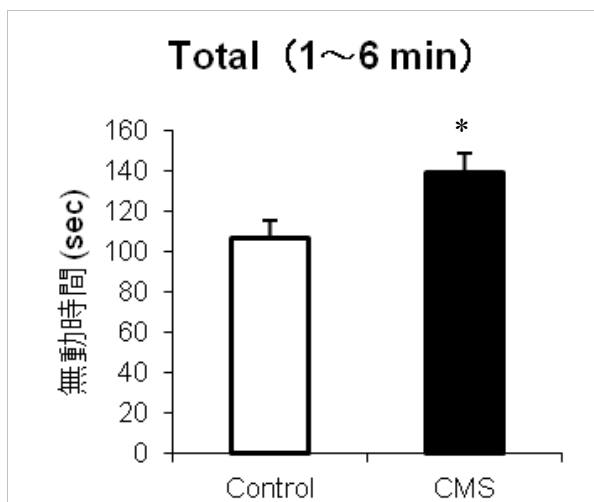


図3—慢性軽度ストレス負荷モデルマウスにおける抑うつ様行動
TSTの試験時間は6分、評価には試験中1~6分間の無動時間の合計値を用いた。Control : n = 15, CMS : n = 16, * P < 0.05

4. 定量的 RT-PCR (慢性軽度ストレス負荷モデルマウス)

神経障害性疼痛モデルマウスを用いた解析と同じ遺伝子に関して、CMSモデルにおける遺伝子発現変化を、定量的 RT-PCR により検討した(図4)。CMS群では、vBNSTでのCRF₂受容体およびNR4A3のmRNA発現量が有意に増加し、dBNSTでのPAC₁受容体mRNA発現量が有意に低下していた。また、dBNSTにおいてNR4A3のmRNAが増加(P=0.097)、5-HT_{1A}受容体のmRNAが減少(P=0.090)傾向を示した。

D. 考察

慢性疼痛治療のための創薬標的およびPETなどによる慢性疼痛評価法の開発に役立つマーカー分子の同定を目的とし、神経障害性疼痛モデル動物と慢性軽度ストレス負荷モデル動物の分界条床核における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて比較検討した。両モデルとも抑うつ様行動の有意な増加が見られたものの、遺伝子発現変化については、一部遺伝子において異なることを明らかとした。腹側分界条床核におけるβ₁ノルアドレナリン受容体遺伝子および5-HT_{2A}セロトニン受容体遺伝子の発現は、神経障害性疼痛モデル動物でのみ有意に増加していた。腹側分界条床核内におけるこれら受容体の発現変化が慢性疼痛マーカーとして有用であることが示唆された。一方、慢性軽度ストレス負荷モデル動物で有意な発現変化もしくはその変化の傾向が見られた遺伝子、腹側分界条床核におけるCRF₂受容体とNR4A3遺伝子、ならびに背外側分界条床核におけるPAC₁受容体、NR4A3、および5-HT_{1A}受容体遺伝子に関しても、慢性疼痛との関連性は示されなかったものの、負情動との関連性については今後も検討すべきであると考えられる。

E. 結論

神経障害性疼痛モデルマウスおよび慢性軽度ストレス負荷モデルマウスの分界条床核における遺伝子発現変化を定量的 RT-PCR 法を用いて比較検討し、慢性疼痛時に特異的に変動する慢性疼痛マーカー候補分子として、腹側分界条床核におけるβ₁ノルアドレナリン受容体遺伝子および5-HT_{2A}セロトニン受容体遺伝子を見出した。これら受容体分子が慢性疼痛評価に役立つマーカー分子となる可能性が示された。

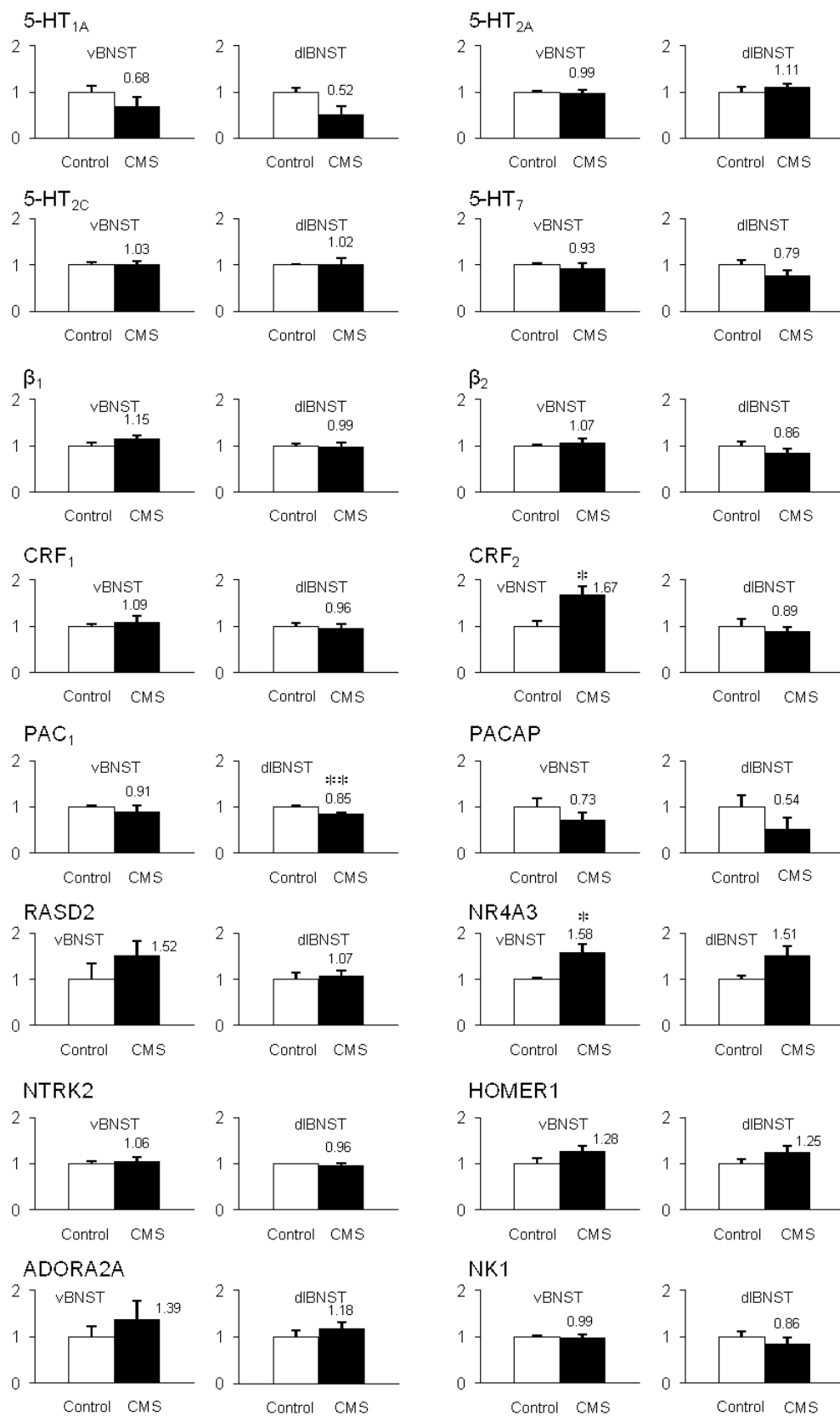


図4 慢性軽度ストレス負荷モデルマウスのvBNSTおよびdIBNST内におけるmRNA量発現変化
Control群の発現量を1とし、CMS群の値を相対値で示した。n = 3-4, *P < 0.05, **P < 0.01

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会および研究会発表

- 1) 出山諭司、中誠則、井手聡一郎、仲子友和、平田美紀枝、眞嶋悠幾、武田宏司、吉岡充弘、南雅文: 腹側分界条床核内 アドレナリン受容体の活性化は摂食量減少と不安様行動を惹起する. Neuro2013 (第36回日本神経科学大会・第56回日本神経化学学会大会・第23回日本神経回路学会大会), 京都, 2013.6.22
- 2) 圓山智嘉史、井手聡一郎、原大樹、大野篤志、玉野竜太、小関加奈、中誠則、出山諭司、金田勝幸、吉岡充弘、南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内コルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 神経情報伝達の相反的役割. 次世代を担う創薬・医療薬理 シンポジウム 2013, 熊本, 2013.8.31
- 3) 井手聡一郎、原大樹、金田勝幸、南雅文: 背外側分界条床核におけるコルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 神経情報伝達の電気生理学的解析. 第23回日本臨床精神薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26
- 4) 眞嶋悠幾、井川ありさ、井手聡一郎、南雅文: 慢性疼痛による分界条床核内 neurokinin 1 受容体 mRNA の発現増加: Neurokinin 1 受容体の不安様行動への関与. 第23回日本臨床精神薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26
- 5) 小関加奈、井手聡一郎、大野篤志、玉野竜太、圓山智嘉史、中誠則、出山諭司、吉岡充弘、

南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核内コルチコトロピン放出因子とニューロペプチド Y 情報伝達の役割. 第23回日本臨床精神薬理学会・第43回日本神経精神薬理学会合同学会, 沖縄, 2013.10.24-26

- 6) Deyama S, Ide S, Ohno A, Tamano R, Koseki K, Naka T, Maruyama C, Yoshioka M, Minami M: Opposing roles of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y within the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis in the negative affective component of pain in rats. Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting), San Diego, 2013.11.9-13
- 7) Minami M, Hara T, Ide S, Kaneda K: Opposing effects of corticotropin-releasing factor and neuropeptide Y on neuronal excitability in the dorsolateral bed nucleus of the stria terminalis. Neuroscience2013 (SfN 43rd Annual Meeting), San Diego, 2013.11.9-13
- 8) 井手聡一郎、金田勝幸、南雅文: 痛みによる不快情動生成における背外側分界条床核の役割. 日本薬学会 第134年会, 熊本, 2014.3.28-30

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

