

神戸学院大学大学院薬学研究科学位論文

幼少期ストレス負荷後の成熟期における
神経障害性疼痛の増悪機構の解明

2016 年 1 月

西 中 崇

目 次

略語一覧

序論	1
----------	---

本論

第一章 幼少期ストレス負荷後の成熟期における 神経障害性疼痛に対する影響

1-1. 緒言	3
---------------	---

1-2. 実験材料ならびに方法	4
-----------------------	---

1-2-1. 動物

1-2-2. 母子分離・社会隔離 (maternal separation and social isolation、MSSI)

1-2-3. 実験スケジュール

Table 1. Experimental protocol

1-2-4. 高架式十字迷路試験 (elevated plus-maze test、EPM)

1-2-5. Open field 試験

1-2-6. 社会性相互作用試験 (Social interaction test、SIT)

1-2-7. スクロース嗜好性試験 (Sucrose preference test、SP)

1-2-8. Plantar 試験

1-2-9. von Frey 試験

1-2-10. 坐骨神経部分結紮 (Partial sciatic nerve ligation、PSL)

1-2-11. 統計学的処理

1-3. 結果	8
---------------	---

1-3-1. 体重変化に対する MSSI の影響

1-3-2. 情動行動に対する MSSI の影響

1-3-3. 坐骨神経障害後の熱的痛覚過敏に対する MSSI の影響

1-3-4. 坐骨神経障害後の機械的痛覚過敏に対する MSSI の影響

1-4. 考察	15
---------------	----

第二章 神経障害性疼痛による情動障害に対する MSSI の 影響と脳内 BDNF 発現の変化

2-1. 緒言	18
---------------	----

2-2. 実験材料ならびに方法	19
-----------------------	----

2-2-1. 実験スケジュール

2-2-2. 強制水泳試験 (forced swim test、FST)

2-2-3. 前頭前皮質、海馬、線条体組織抽出液の調製および
western blot 用サンプル調製

2-2-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)
および western blot 法

2-3. 結果	21
---------------	----

2-3-1. 坐骨神経障害後の抑うつ様行動に対する MSSI の影響

2-3-2. 3 週齢時における脳内 BDNF 発現に対する母子分離の影響

2-3-3. 12 週齢時における脳内 BDNF 発現に対する MSSI の影響

2-4. 考察	25
---------------	----

第三章 神経障害性疼痛時の脳内神経可塑性と NMDA 受容体ならびにドパミン受容体に対する 幼少期ストレス負荷の影響

3-1. 緒言	27
---------------	----

3-2. 実験材料ならびに方法	29
-----------------------	----

3-2-1. Light touch 刺激

3-2-2. 脳組織切片の調製

3-2-3. 免疫組織染色

3-2-4. p-ERK 陽性細胞数の計測

Fig. 8. Graphical representation of brain regions analyzed for p-ERK expression.

3-2-5. quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Table 2. qRT-PCR primers

3-3. 結果32

3-3-1. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する MSSI の影響

3-3-2. 側坐核における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する MSSI の影響

3-3-3. 室傍核における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する MSSI の影響

3-3-4. 扁桃体における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する MSSI の影響

3-3-5. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の GluN2A/GluN2B 発現に対する MSSI の影響

3-3-6. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の D₁/D₂ 受容体発現に対する MSSI の影響

3-4. 考察42

総括46

謝辞47

引用文献48

略語一覽

ANOVA	: analysis of variance
BDNF	: brain-derived neurotrophic factor
CREB	: cAMP responsive element binding protein
CRH	: corticotropin-releasing hormone
DRD 1/2	: dopamine receptor type 1/2
EPM	: elevated plus-maze
GAPDH	: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
HPA	: hypothalamic-pituitary-adrenal axis
i.p.	: intraperitoneal
mPFC	: medial prefrontal cortex
MSSI	: maternal separation and social isolation
NAc	: nucleus accumbens
NMDA	: N-methyl-D-aspartate
OF	: open field
PBS	: phosphate buffered saline
p-ERK	: phosphorylated extracellular signal-regulated kinase
PFA	: paraformaldehyde
PL	: plantar test
PMSF	: phenylmethanesulfonyl fluoride
PSL	: partial sciatic nerve ligation
PVN	: paraventricular nucleus
SEM	: standard error of the mean
SDS	: sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SIT	: social interaction test
SP	: sucrose preference test
TBS	: tris buffered saline
TrkB	: tropomyosin-related kinase B
vF	: von Frey test

序論

痛み (Pain) は IASP (International Association for the Study of Pain) によって「組織の実質的あるいは潜在的な傷害に結びつくか、このような傷害を表す言葉を使って述べられる不快な感覚、情動体験」と定義されており、痛みが感覚と情動の二つの側面から構成されることが明確に記されている。ヒトを含む多くの生物は、有害な刺激を感知し、その刺激が不快であるという感情を伴うことで、それを痛みとして認識し、同時に生体を守るための逃避行動を起こす。このような急性に生じる痛みは、有害な刺激から生体を守るために必要なシステムである。

一方、炎症や組織の障害によって引き起こされる慢性に生じる痛みは、全く不必要な感覚であり、治療の対象となりうる。本邦において、慢性疼痛の患者数は約 2700 万人であると推計されており、多くの国民が痛みを抱え、それが生活の質の低下を来す一因となっている¹⁾。

慢性の痛みを引き起こす原因の一つに神経障害性疼痛があり、これは、神経系の一次的損傷あるいは機能的障害によって発生する痛みである。神経障害性疼痛では、通常は痛みとして認識されない触刺激により痛みが生じる状態であるアロディニアや、痛み刺激に対して強い反応を示す痛覚過敏などの異常な痛みを引き起こすことが知られている。これらの特徴的な感覚に加え、神経障害性疼痛は慢性疼痛の中でも、既存の治療薬が奏功しにくいことが知られている。痛みは不快な情動を伴うことから、神経障害性疼痛では不安障害や抑うつなどの情動障害を合併することが多い。したがって、痛みは慢性化するに従い、器質的異常だけでなく、精神的、心理的、社会的な要因が複雑に関与して、痛みを増悪させ、遷延させることが示唆されている²⁾。そして、このような現状の中、2010 年に厚生労働省は、「痛みを慢性化させないことが重要である」と提言した。そのためには、痛みの早期発見・早期治療に加えて、慢性化に関係する精神的、心理的、社会的な要因による影響を明らかにする必要がある。

痛みの慢性化につながる精神的・社会的な要因の一つに幼少期の養育環境が挙げられる。幼少期における劣悪な養育環境、すなわち、虐待、暴力やネグレクト（育児放棄）などによって、成人期における精神の発達や機能に悪影響を及ぼすことは良く知られているが、慢性疼痛に対しても何らかの影響を及ぼすことが近年の報告から明らかにされつつある。例えば、幼少期に虐待を受けた人では慢性疼痛の一つである線維筋痛症の発症リスクが高くなることが報告されている³⁾。さらに、母親の死別や経済的な問題のある家庭で育った子供は、成人期における慢性的な広汎性疼痛の発症リスクが高くなることが示されている⁴⁾。このように、幼少期に受ける過度のストレスによって痛みが増悪・慢性化する機構が形成されていることが示唆される。幼少期ストレスと慢性疼痛の関係性を明らかにすることで、痛みが慢性化しやすい、あるいは強い痛みが生じやすい人の特徴を把握でき、慢性疼痛治療において重要とされる早期発見・早期治療に貢献できるものと思われる。

そこで、本研究においては、幼少期のストレス負荷による成熟期における神経障害性疼痛

に対する影響に関して解析を行った。さらに、成熟期の神経障害性疼痛に影響を及ぼす因子の探索ならびに脳内の神経機能に及ぼす影響についての検討も加えた。

本 論

第一章

幼少期ストレス負荷後の成熟期における神経障害性疼痛に対する影響

1-1. 緒言

幼少期における過度のストレス暴露が、成人期における精神疾患の発症リスクになることは広く知られており、さらに近年の報告では、精神疾患に対する治療の反応性に悪影響を及ぼすことも示唆されている^{5,6)}。これには、幼少期ストレスによる中枢神経系の発達異常やストレス脆弱性の形成が関係していることが示唆されている。実際に、幼少期に虐待や育児放棄（ネグレクト）を経験した人では、情動に関わる脳領域の大きさに変化が認められることや、機能的変化が観察されている⁷⁾。さらに、幼少期のストレスにより内分泌系の異常が認められ、この異常が成人期におけるストレスの反応性に関わることが示唆されている⁸⁾。これらの異常は、マウス等の動物を用いた基礎研究でも認められており、生後間もない仔を一時的に母親と別々に飼育する母子分離が、幼少期ストレスによる影響を分子的に解析するための動物モデルとして利用されている^{9,10)}。

幼少期ストレスは、疼痛制御に対しても影響を及ぼすことが報告されている。上記したように母子分離によって、成熟期の疼痛行動が変化すること^{11,12)}。さらに、幼少期ストレスが慢性疼痛の発症にも影響することが示唆されている^{3,4)}。また、これまでの実験動物において、慢性疼痛、特に神経障害性疼痛に対する幼少期ストレスの影響について解析した報告はわずかであることから、そのメカニズムは不明である。

そこでまず、第一章では成熟期の神経障害性疼痛に対する幼少期ストレスの影響に関して解析を行った。幼少期ストレスには、身体的・心理的な育児放棄のモデルである母子分離・社会隔離モデルを用いた。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Nishinaka T., Nakamoto K., Tokuyama S., Enhancement of nerve-injury-induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. *Life Sci.*, 121, 28-34 (2015).

1-2. 実験材料ならびに方法

1-2-1. 動物

ddY 系妊娠 14 日マウス (日本 SLC 株式会社、大阪、日本) を購入し、温度 24°C、湿度 55±5% の環境下において明暗サイクルが 12 時間 (AM 8:00 点灯、PM 8:00 消灯) の室内にて飼育した。なお、固形飼料 (オリエンタル酵母株式会社、東京、日本) と水は自由に摂取させた。全ての実験は、日本薬理学会が策定する動物実験に関する指針に従い、また、神戸学院大学動物委員会の承認を得て行った (承認番号: 14-45)。

1-2-2. 母子分離・社会隔離 (maternal separation and social isolation、MSSI)

MSSI は Niwa らの方法を改変して行った¹³⁾。出産を確認した日を出生後 0 日とした。出産後 15 日目 (2 週目) において、母親マウスとその仔マウスをランダムにコントロール群と MSSI 群に振り分けた。MSSI 群は、仔マウスをホームケージから取り出し、隔離ケージ (25 cm×15 cm×13 cm) に 1 匹ずつ入れた。隔離ケージの周りを紙で覆うことで、外界からの視覚的な影響を排除した。この隔離を 1 日あたり 6 時間行い、その後、仔マウスをホームケージに戻し母親マウスと同居させた。母子分離の間、母親マウスはホームケージとは別のケージで飼育した。この母子分離は出生後 15 日 (2 週目) から 21 日 (3 週目) の期間に行った。母子分離は明期に行い、分離開始時間はランダムにした。出生後 22 日目において、仔マウスを離乳させ、その後は実験終了まで隔離ケージで飼育した。コントロール群では、離乳まで母子分離をせずに標準的な環境で飼育した。離乳後は、同じ性別のマウス毎に 1 ケージあたり 2-4 匹で飼育した。

1-2-3. 実験スケジュール

Table 1 に実験スケジュールを示す。実験で用いたすべてのマウスは坐骨神経の結紮前に種々の行動実験に供した。7 週齢時において、elevated plus-maze (EPM) 試験、open field 試験、social interaction 試験、sucrose preference 試験を用いて情動行動の評価を行った。Cohort 1 のマウスでは、EPM 試験を行った。Cohort 2 のマウスでは、open field 試験、social interaction 試験、sucrose preference 試験を行った。Cohort 1 と Cohort 2 では別々のマウスを使用した。9 週齢時において、坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation、PSL) を行った。熱的ならびに機械的感受性の評価は、それぞれ plantar 試験、von Frey 試験を用いて行い、PSL 処置前と処置後 1 週間に 1 回行った。それぞれの行動実験は、明期に行った。

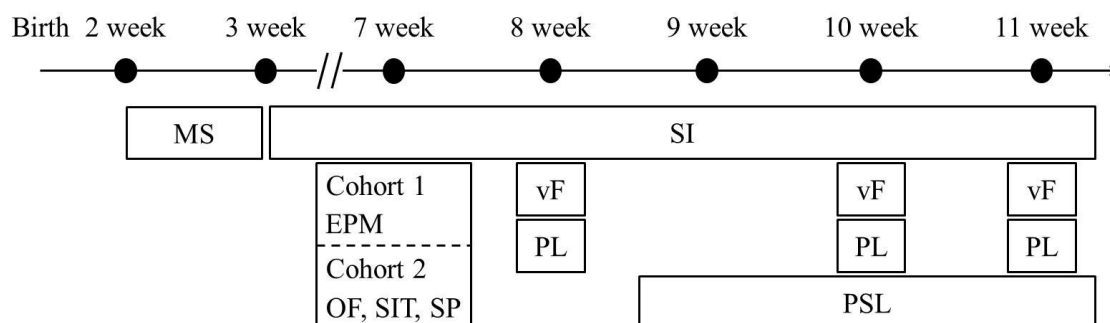


Table 1. Experimental protocol.

EPM – elevated plus-maze test; MS – maternal separation; OF – open field test; PL – plantar test; PSL – partial sciatic nerve ligation; SI – social isolation; SIT – social interaction test; SP – sucrose preference test; vF – von Frey test.

1-2-4. 高架式十字迷路試験 (elevated plus-maze test、EPM)

2 つの open arm と 2 つの enclosed arm (長さ 25 cm × 幅 8 cm) が中心のプラットホーム (長さ 8 cm × 幅 8 cm) から突き出ている十字迷路装置を用いた。この十字迷路を高さ 50 cm になるように設置し、十字迷路の上に照明を取り付け、open arm と enclosed arm における照明の強さが同程度 (60 lux) になるように調節した。マウスを十字迷路の中心プラットホームに置き、カメラを用いて 5 分間の行動を撮影した。解析には、4 つの arm の滞在時間に対する open arm の滞在時間の割合を算出した。

1-2-5. Open field 試験

マウスを open field (45 cm × 45 cm × 35 cm) に置き、60 分間の行動を観察した。カメラを open field の底面から 100 cm の高さに設置し、open field 上の照明の強さが 6 lux になるように調節した。マウスの行動は video tracking system (ANY-maze、ブレインサイエンス・イデア株式会社、東京、日本) を用いて解析し、総移動量、center zone (27 cm × 27 cm) の滞在時間の割合を算出した。

1-2-6. 社会性相互作用試験 (Social interaction test、SIT)

Berton らの方法を改変して行った¹⁴⁾。穴のあいたプラスチックの箱を open field (52 cm × 30 cm) の端に設置した。行動の評価を行うマウスを open field に置き、150 秒間自由に行動させた (no target session)。150 秒後、マウスを取り出しホームケージに戻した。この間に、行動の評価を行うマウスと同じ性別のマウスをプラスチックの箱に入れ、open field の端に設置した。再度、行動の評価を行うマウスを open field に置き、150 秒間の行動を観察した。

(target session)。行動観察後、評価を行ったマウスとプラスチックの箱に入れたマウスを取り出し、それぞれのホームケージに戻した。プラスチックの箱の周りを interaction zone と定義し、no target session ならびに target session の interaction zone 滞在時間を測定した。

1-2-7. スクロース嗜好性試験 (Sucrose preference test、SP)

ボールポイント給水先管を取り付けたボトルに水道水または 1% sucrose 溶液を 230 mL 入れた。マウスを個別のケージで飼育し、試験を行う前に、水道水が入ったボトルを 2 本ケージにさし、3 日間マウスを実験環境に順化させた。その後、1% sucrose 溶液と水道水が入ったボトルを 1 本ずつケージにさし、マウスが自由に選択できるようにした。1% sucrose 溶液と水道水が入ったボトルは 10-12 時間ごとに左右の位置を入れ替えた。24 時間ごとに、sucrose 溶液ならびに水道水の入ったボトルの重さを記録し、摂水量として記録した。Sucrose preference は 1 日の総摂水量に対する 1% sucrose 溶液の摂水量の割合として算出し、3 日間の値を平均し算出した。

1-2-8. Plantar 試験

Nakamoto らの方法に従った¹⁵⁾。後肢における熱感受性を plantar test (Ugo Basile Srl, Comerio VA, Italy) を用いて評価を行った。マウスをガラス板の上に置き、装置に馴れさせた。赤外線放射熱をマウス後肢の足蹠にあて、熱を当てた足を引っ込めるなどの逃避行動を起こすまでの潜時を測定した。組織の障害を防ぐために、熱を当てる時間は最大 20 秒間に設定した。測定を 5 分ごとに 3 回行い、3 回の測定値を平均した。

1-2-9. von Frey 試験

マウスを金網 (5 × 5 mm) 上に置き、2-3 時間順化させた。後肢の足蹠表面の中心部分に von Frey filament (ブレインサイエンス・イデア株式会社) を当て、機械的な刺激を加えた。0.16 g と 0.4 g の filament を使用した。0.16 g の filament から測定を行い、それぞれの filament で 10 回刺激した時の逃避行動の回数を測定した。1 回の刺激では filament を 6 秒間あて、10 秒以上の間隔をあけ次の刺激を行った。

1-2-10. 坐骨神経部分結紮 (Partial sciatic nerve ligation、PSL)

Seltzer らの方法に従った¹⁶⁾。処置はペントバルビタール麻酔下 (65 mg/kg、i.p.) にて行った。右後肢の坐骨神経を単離し、絹糸を用いて坐骨神経の 1/2 をきつく結紮した。偽処置群 (Sham) では、坐骨神経を結紮せずに、露出のみ行った。

1-2-11. 統計学的処理

結果は平均±標準誤差 (standard error of the mean; S.E.M.) として表現した。一元配置分散分析 (one-way analysis of variance, ANOVA)、two-way ANOVA 解析または F 検定を行った後

に、Bonferroni's post hoc test あるいは、Student's *t*-test を用いて統計的解析を行った。体重変化、plantar 試験と von Frey 試験の結果は two-way repeated-measures ANOVA 解析を行った後に、Bonferroni's post hoc test を用いて統計学的解析を行った。有意差は、危険率 5% を基準とした。

1-3. 結果

1-3-1. 体重変化に対する MSSI の影響

MSSI 負荷後の体重変化は、雄性ならびに雌性マウスとも有意な変化は認められなかった [Fig. 1A、stress \times time interaction: $F(5, 225) = 0.64$, $P > 0.05$, stress effect: $F(1, 225) = 0.08$, $P > 0.05$, time effect: $F(5, 225) = 2441.07$, $P < 0.01$, Fig. 1B、stress \times time interaction: $F(5, 280) = 0.91$, $P > 0.05$, stress effect: $F(1, 280) = 0.54$, $P > 0.05$, time effect: $F(5, 280) = 2145.77$, $P < 0.01$].

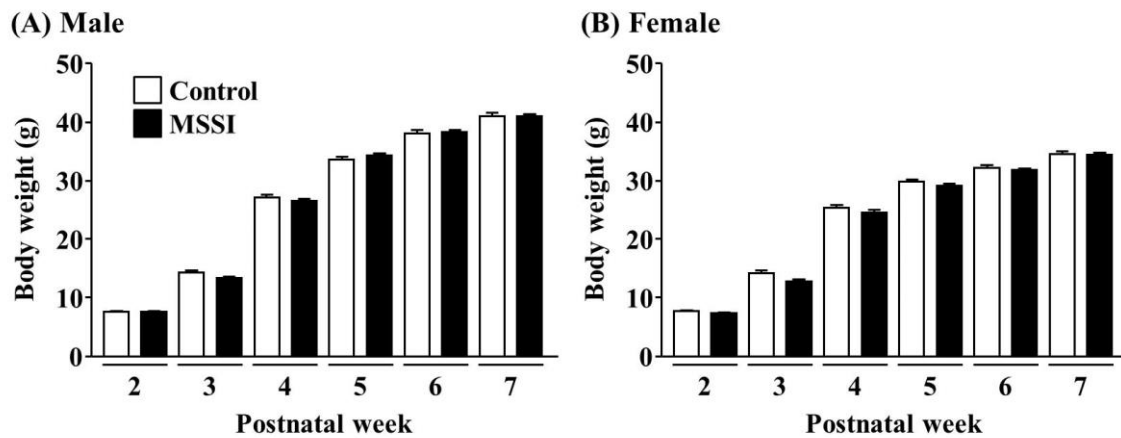


Fig. 1. Effect of maternal separation and social isolation (MSSI) on body weight.

(A) Male mice. (B) Female mice. Body weights were measured once a week. Male Control group: $n = 41$; Male MSSI group: $n = 36$. Female Control group: $n = 35$; Female MSSI group: $n = 39$.

1-3-2. 情動行動に対する MSSI の影響

Open field 試験における総行動量に関して、雄性ならびに雌性マウスにおいて MSSI による有意な変化は認められなかった (Fig. 2A、male; $P > 0.05$ 、Fig. 2F、female; $P > 0.05$)。雄性マウスでは、MSSI は center zone 滞在時間に有意な影響を示さなかった (Fig. 2B)。一方、雌性マウスでは、MSSI により center zone 滞在時間の有意な低下が認められた (Fig. 2G)。EPM 試験において、MSSI は雌性マウスにおいてのみ open arm 滞在時間の有意な減少を引き起こした (Fig. 2C、male; $P > 0.05$ 、Fig. 2H、female; $P < 0.01$)。Social interaction 試験において、雄性ならびに雌性マウスの Control 群では、no target session と比較して target session における interaction zone 滞在時間が有意に増加した (Fig. 2D and I、 $P < 0.01$)。しかし、MSSI は target session における interaction zone 滞在時間を雄性ならびに雌性マウスにおいて有意に減少させた (Fig. 2D and I、 $P < 0.01$)。Sucrose Preference 試験に関して、MSSI は雄性ならびに雌性マウスにおいて、Control と比べて Sucrose preference を有意に減少させた (Fig. 2E and J、 $P < 0.05$)。

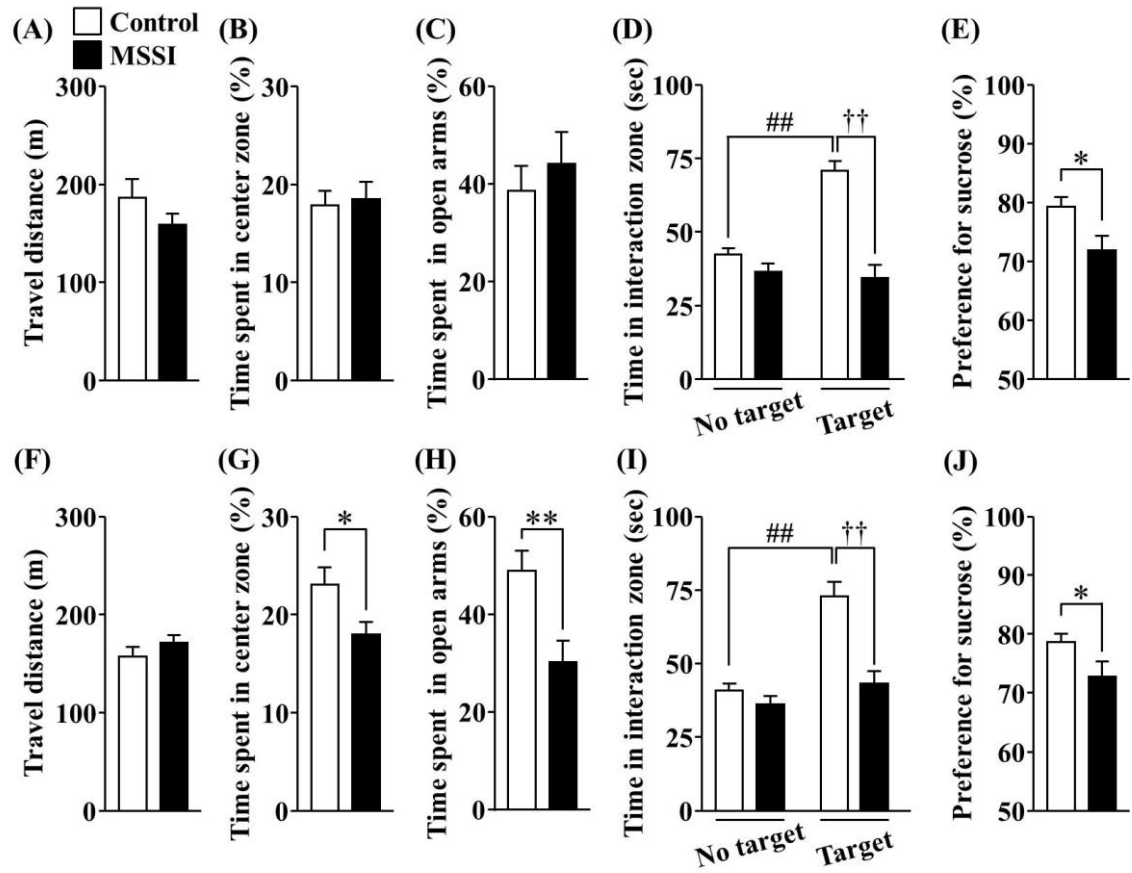


Fig. 2. Effect of MSSI on emotional behavior at 7 weeks of age.

(A–E) Male mice. (F–J) Female mice. Mice were tested in the open field test (A, B, F, G), elevated plus maze test (C, H), social interaction test (D, I), and sucrose preference test (E, J). (A, F) Total travel distance over 60 min. (B, G) Time spent in the center zone. (C, H) Time spent in the open arms. (D, I) Time spent in the interaction zone during no target and target sessions. (E, J) Sucrose intake. Male Control group: $n = 13-38$; Male MSSI group: $n = 11-36$. Female Control group: $n = 18-42$; Female MSSI group: $n = 19-38$. (A–C, E–H, J) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control. ## $P < 0.01$ vs. No target Control, †† $P < 0.01$ vs. Target Control.

1-3-3. 坐骨神経障害後の熱的痛覚過敏に対する MSSI の影響

雄性ならびに雌性マウスにおいて、後肢処置側における熱刺激に対する反応潜時は Control と MSSI の間に有意な変化は認められなかった (Fig. 3、 $P > 0.05$)。PSL 処置 1、2 週間後の雄性ならびに雌性マウスにおいて、MSSI は熱刺激に対する反応潜時を Control と比較して有意に低下させた [Fig 3A、stress \times time interaction: $F(2,70) = 1.42$ 、 $P < 0.05$ 、stress effect: $F(1,70) = 64.43$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,70) = 64.43$ 、 $P < 0.01$ 、Fig. 3B、stress \times time interaction: $F(2,68) = 3.85$ 、 $P < 0.05$ 、stress effect: $F(1,68) = 13.78$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,68) = 90.5$ 、 $P < 0.01$]。

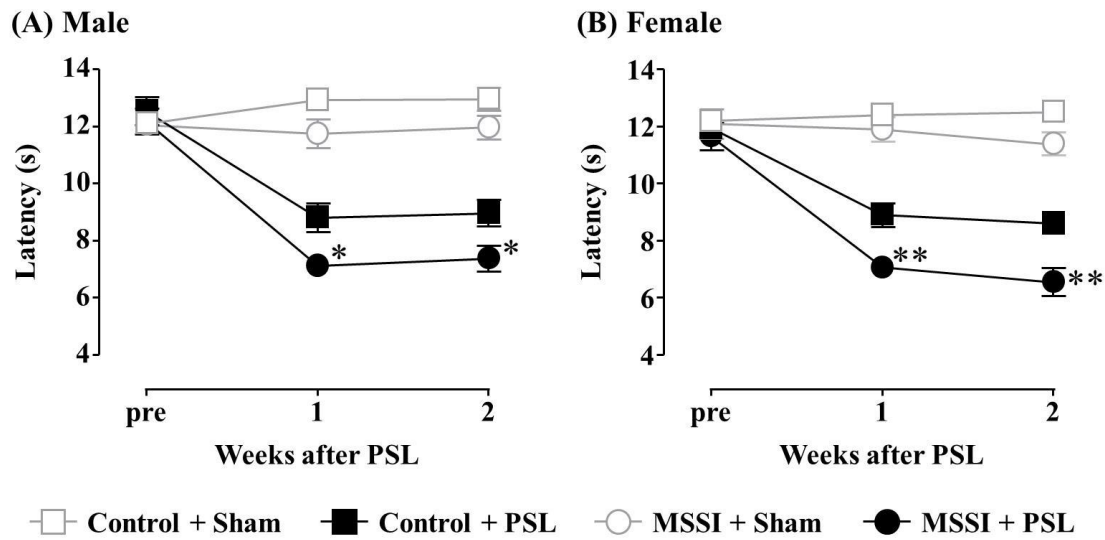


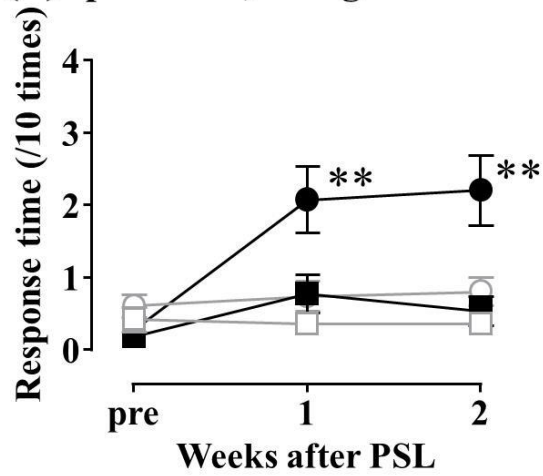
Fig. 3. Effect of MSSI on thermal hypersensitivity following nerve injury.

(A) Male mice. (B) Female mice. Thermal sensitivity was measured as hind paw withdrawal latencies to radiant heat. Male; Control-Sham group: $n = 19$, Control-PSL group: $n = 19$, MSSI-Sham group: $n = 18$, MSSI-PSL group: $n = 18$. Female; Control-Sham group: $n = 22$, Control-PSL group: $n = 20$, MSSI-Sham group: $n = 17$, MSSI-PSL group: $n = 16$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Control-PSL group.

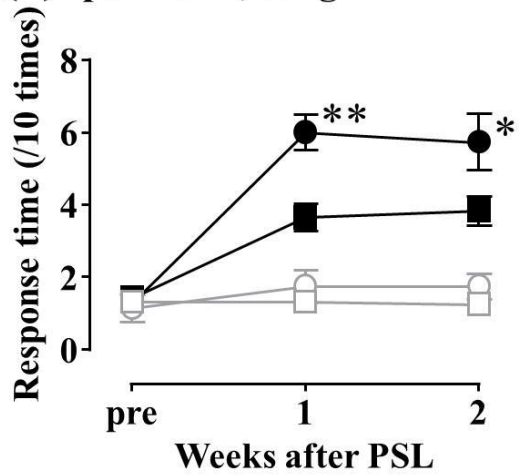
1-3-4. 坐骨神経障害後の機械的痛覚過敏に対する MSSI の影響

雄性ならびに雌性マウスにおいて、後肢処置側ならびに反対側における反応回数は Control と MSSI の間に有意な変化は認められなかった (Fig. 4、 $P > 0.05$)。PSL 処置 1、2 週間後の雄性ならびに雌性マウスにおいて、0.16g の filament に対する後肢処置側の反応回数は MSSI では Control と比較して有意な増加が認められた [Fig 4A、male; stress \times time interaction: $F(2,60) = 5.57$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,60) = 10.78$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,60) = 14.85$ 、 $P < 0.01$ 、Fig. 4E、female; stress \times time interaction: $F(2,76) = 10.57$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,76) = 30.03$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,76) = 26.64$ 、 $P < 0.01$]。同様に、0.4g の filament に対する後肢処置側の反応回数は MSSI では Control と比較して有意な増加が認められた [Fig. 4B、male; stress \times time interaction: $F(2,60) = 7.09$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,60) = 7.65$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,60) = 63.81$ 、 $P < 0.01$ 、Fig. 4F、female; stress \times time interaction: $F(2,76) = 2.95$ 、 $P > 0.05$ 、stress effect: $F(1,76) = 8.02$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,76) = 59.52$ 、 $P < 0.01$]。PSL は Control において、後肢反対側における反応回数に影響を与えなかった。一方、MSSI は雄性ならびに雌性マウスにおいて、後肢反対側における反応回数を有意に増加させた [Fig. 4C、male 0.16 g; stress \times time interaction: $F(2,62) = 7.79$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,62) = 13.94$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,62) = 4.48$ 、 $P < 0.05$ 、Fig. 4D、male 0.4 g; stress \times time interaction: $F(2,62) = 5.12$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,62) = 19.55$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,62) = 6.82$ 、 $P < 0.01$ 、Fig. 4G、female 0.16 g; stress \times time interaction: $F(2,56) = 7.59$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,56) = 8.84$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,56) = 8.73$ 、 $P < 0.01$ 、Fig. 4H、female 0.4 g; stress \times time interaction: $F(2,56) = 9.56$ 、 $P < 0.01$ 、stress effect: $F(1,56) = 12.49$ 、 $P < 0.01$ 、time effect: $F(2,56) = 11.27$ 、 $P < 0.01$]。

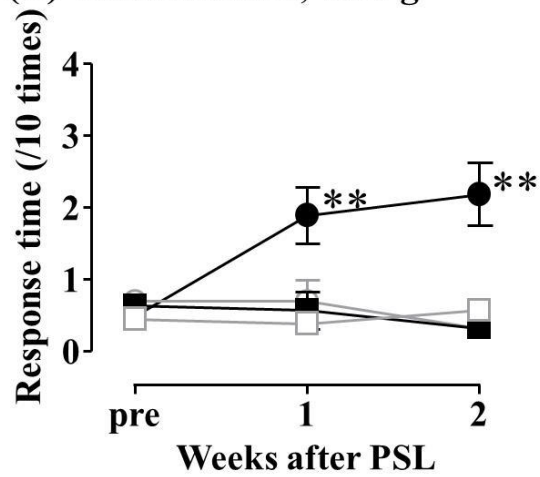
(A) Ipsilateral, 0.16 g



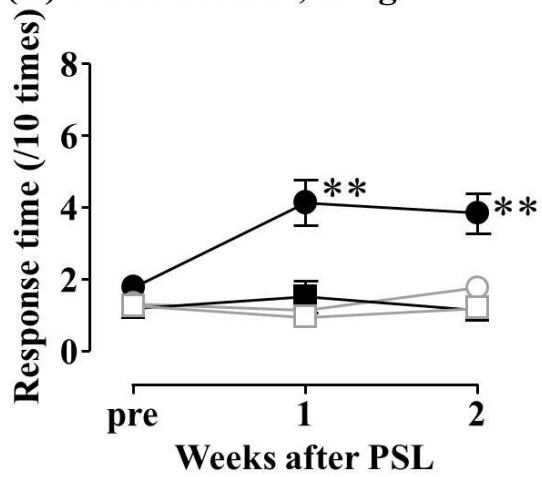
(B) Ipsilateral, 0.4 g



(C) Contralateral, 0.16 g



(D) Contralateral, 0.4 g



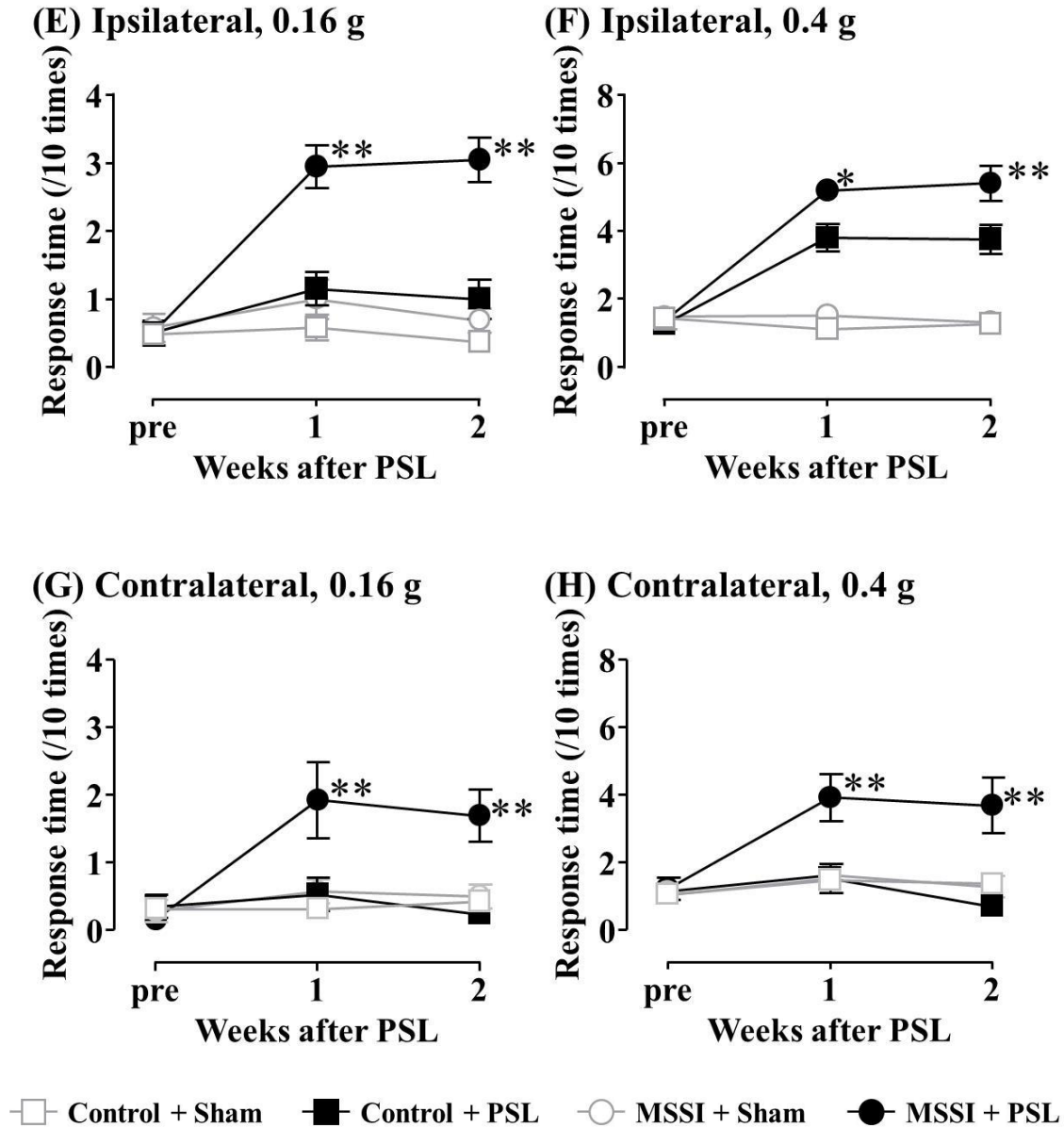


Fig. 4. Effect of MSSl on mechanical hypersensitivity following nerve injury.

(A-D) Male mice. (E-H) Female mice. (A, B, E, F) Number of responses of the ipsilateral hind paw. (C, D, G, H) Number of responses of the contralateral hind paw. Each hind paw was probed 10 times using filaments of 0.16 g (A, C, E, G) and 0.4 g (B, D, F, H). Male; Control-Sham group: n = 16–17, Control-PSL group: n = 16–17, MSSl-Sham group: n = 15–16, MSSl-PSL group: n = 15–17. Female; Control-Sham group: n = 19, Control-PSL group: n = 17–20, MSSl-Sham group: n = 14–19, MSSl-PSL group: n = 13–20. *P < 0.05, **P < 0.01 vs. Control-PSL group.

1-4. 考察

第一章では、幼少期ストレス負荷後の成熟期における神経障害性疼痛に対する影響を検討した。まず、今回用いた幼少期ストレスモデルである **MSSI** によって、ストレスが負荷され、情動機能の障害が認められるかを確認するために、成熟期である 7 週齢時に各種情動行動の評価試験を行った。雄性ならびに雌性マウスにおいて、**MSSI** は抑うつ様行動の指標である社会性行動や嗜好性に障害が認められた。げっ歯類を対象にした研究では、幼少期ストレスモデルとして、母子分離（剥奪）が繁用される。マウスを用いた研究報告によると、生後 1-14 日または 1-21 日間の母子分離（3 h/day）は、不安様行動や抑うつ様行動などの行動障害が生じにくいことが示されており、母子分離ストレス負荷のみでは行動障害の評価が困難であることが推測されている^{17,18)}。一方、Niwa らは生後 15-21 日間の母子分離（6h/day）に社会隔離ストレスを組み合わせることによって、情動行動の障害を惹起させることができることを報告している¹³⁾。さらに、母子分離時に母親マウスに対してストレスを負荷するモデルや母子分離に加え、早期に離乳を行うモデルにおいても、顕著な情動行動が認められる^{19,20)}。以上の知見は、マウスにおいては母子分離に他のストレスを組み合わせることにより顕著な行動変化が引き起こされることを示唆する。しかし、本研究では、**MSSI** は雄性マウスの不安様行動に影響しなかった。同様の幼少期ストレスモデルを用いた Niwa らの報告では、雄性ならびに雌性マウスにおいて不安様行動の増加が認められている¹³⁾。この原因として、情動行動や幼少期ストレス負荷の影響にはマウス間の種差が認められることが報告されている²¹⁾。本研究では ddY 系を使用しているのに対して、Niwa らは C57BL/6 系を用いていることから、**MSSI** による行動障害発現の違いにマウス間の種差が影響していることが考えられる。さらに、不安様行動は評価に用いる試験方法の違いによって影響されることが報告されている²²⁾。雄性マウスの不安様行動に対する **MSSI** の影響を明らかにするためには、明暗試験など不安様行動を評価するその他の行動試験を用いた検討が必要である。

本研究において、坐骨神経を結紮していない状態では、熱ならびに機械感受性に対する **MSSI** の影響は認められなかった。ラットを用いた過去の研究では、母子分離による熱ならびに機械感受性の変化については結果が一致していない^{11,12,23-27)}。過去の研究を踏まえると、母子分離を行っている期間の違い、つまりストレスを負荷している時期の違いが、感受性の変化に影響していることが示唆される。感受性の変化が認められている報告の共通点としては、生後早期に母子分離を始めていることが挙げられ、母子分離は疼痛を制御する神経系の発達に対して直接的に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。痛みを伝達する神経系の発達は、生後数週間後も成熟化が継続して行われ、機能を獲得することが知られている²⁸⁾。興味深いことに、母子分離時に仔マウスを保温器に入れずに別のケージに移す場合では、感受性の変化が認められている^{12,23)}。生後早期の仔マウスは保温能力がなく、体温の維持は母親マウスに依存している。そのため、保温器に入れない条件では、母子分離時に体温が低下しやすく、それが神経系の発達に影響する可能性がある。本研究を含めて、生

後 2-3 週目では、仔マウスがある程度成長しており、母子分離時に体温低下などのストレス負荷が少なく、感受性に変化が認められなかったことが考えられる。以上のことから、母子分離時の仔マウスの状態や環境の違いが、痛みの感受性に対する影響を考慮する上で重要な因子であることが示唆される。

次に、坐骨神経結紮後の痛覚過敏に対する **MSSI** の影響を解析した。本研究で用いた神経障害性疼痛モデル (**PSL**) では、コントロールの雄性ならびに雌性マウスにおいて坐骨神経の部分結紮によって、処置側の後肢において熱ならびに機械感受性の亢進、すなわち痛覚過敏が認められた。この **PSL** モデルにおいて、雄性ならびに雌性マウスは **MSSI** の負荷によって熱ならびに機械的痛覚過敏の増強が認められた。異なる幼少期ストレスならびに神経障害性疼痛モデルを用いたラットにおける過去の報告では、幼少期ストレスにより雌性においてのみ神経障害後の機械ならびに冷的アロディニアが増強するとされている²³⁾。幼少期ストレスによる神経障害性疼痛の増強に対する性差は結論を得ないが、少なくとも幼少期ストレスは成熟期の神経障害性疼痛に悪影響を及ぼすことが示唆される。さらに、**MSSI** では **PSL** 処置反対側の後肢においても機械的感受性の亢進が認められた。片側の末梢神経障害が、反対側にも影響を及ぼすことは知られている²⁹⁾。例えば、**cAMP responsive element binding protein (CREB)** の過剰発現マウスや κ -オピオイド受容体のアンタゴニストである **nor-binaltorphimine** が投与されたマウスなどの慢性疼痛時の痛覚過敏に対して増強を示すマウスでは、非障害側の後肢においても感受性の変化が認められている^{30,31)}。以上の知見から、非障害領域における侵害刺激に対する感受性の変化は、痛みの増強を反映していることが考えられ、**MSSI** によって神経障害性疼痛が増強していることが強く示唆される。**MSSI** による神経障害性疼痛の増強メカニズムは不明であるが、ストレス負荷時に副腎皮質から分泌される糖質コルチコイドの一種であるコルチコステロンが、ストレス負荷後の疼痛増強を引き起こすことが報告されている³²⁾。拘束ストレス負荷直後に神経を障害することで、痛覚過敏の増強が認められ、これはグルココルチコイド受容体のアンタゴニストの前処置により抑制される。さらに、ストレス負荷でなくコルチコステロンの投与でも同様の痛覚過敏増強が認められる。本研究において、血清中のコルチコステロン濃度に対する **MSSI** の影響は検討できていないが、同様の幼少期ストレスモデルを用いた **Niwa** らの報告では、幼少期ストレスにより血清中グルココルチコイドが上昇することを示している¹³⁾。副腎皮質からのコルチコステロン遊離の調節機構として、海馬に発現するグルココルチコイド受容体による視床下部-下垂体-副腎髄質系 (**hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA**) に対する負のフィードバック機構が知られている³³⁾。実際に、幼少期ストレスは海馬におけるグルココルチコイド受容体を減少させることで負のフィードバック機構の破綻を引き起こし、ストレスに対する **HPA** 系の反応を亢進させる⁸⁾。したがって、本研究で認められた **MSSI** による神経障害性疼痛の増強機構に **HPA** 系ならびにコルチコステロンが関与していることが示唆される。

一方で、情動は痛みの知覚に影響を及ぼすことが知られていることから、**MSSI** による情

動障害が神経障害性疼痛の増強に関与していることが考えられる。末梢組織で感知された侵害刺激は、脊髄を介して痛みの感覚ならびに情動に関わる脳領域に伝達される³⁴⁾。痛みの感覚とは、痛みの部位や強度を認識する事であり、主に一次ならびに二次体性感覚野が関与する。一方、痛みの情動とは、痛みに伴う不安、怒りや抑うつなどの不快な感情であり、主に前帯状回皮質、前頭前皮質や扁桃体が関与する。痛みの情動に関わるこれらの脳領域は、幼少期ストレスにより構造・機能的な変化が引き起こされることが報告されている^{7,35,36)}。また、本研究で認められた **MSSI** による社会性行動の減少や **sucrose** に対する嗜好性の低下などの情動行動の障害は、社会敗北ストレスにおいても引き起こされる。社会敗北ストレスは、うつモデルとして広く使用されており、特に報酬系を構成する腹側被蓋野-側坐核系の異常が認められる^{14,37)}。腹側被蓋野-側坐核系におけるモノアミン量は、神経障害性疼痛による痛覚過敏の程度と相関することが知られている³⁸⁾。さらに、**Wister-Kyoto** ラットや嗅球摘出ラットなど、他のうつモデルにおいても神経障害性疼痛の増強が報告されている^{39,40)}。以上の知見から、ストレスによる脳機能の変化は、情動障害だけでなく神経障害性疼痛の増強を引き起こすことが示唆される。

第一章では、幼少期ストレスによる成熟期の神経障害性疼痛に対する影響を解析した。**MSSI** は成熟期において様々な情動行動の障害を引き起こし、その影響には性差が認められた。一方、**MSSI** は雄性ならびに雌性マウスにおいて坐骨神経障害による痛覚過敏を増強した。以上の結果から、マウスにおいて幼少期ストレスは成熟期における神経障害性疼痛を増強することが示唆された。本モデルは幼少期ストレスと神経障害性疼痛の相互関係に関わる分子的なメカニズムを明らかにするための有用なモデルになることが示唆された。

第二章

神経障害性疼痛による情動障害に対する MSSI の影響と 脳内 BDNF 発現の変化

2-1. 緒言

第一章では、MSSI が成熟期において情動機能の障害を引き起こし、雄性ならびに雌性マウスにおいて神経障害性疼痛を増強させることを見出した。臨床ならびに基礎研究において、神経障害性疼痛を含む慢性疼痛は、情動機能の障害を引き起こす⁴¹⁻⁴⁵⁾。このメカニズムに、痛みの情動的側面を担う前頭前皮質、帯状回皮質、扁桃体や側坐核などの脳領域の機能変化が関与していることが示唆されている^{42,46,47)}。これらの脳領域は、幼少期ストレスの負荷によっても影響を受けることから⁴⁸⁻⁵⁰⁾、神経障害性疼痛後の情動機能の障害に対しても幼少期ストレスが影響を及ぼすことが強く示唆される。

近年、情動機能の調節に関わる因子として brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が注目されている。BDNF は神経成長因子の 1 つであり、その受容体である tropomyosin-related kinase B (TrkB) に作用することで、シナプスの伝達や可塑的变化に関わる⁵¹⁾。うつ病などの精神疾患患者において、脳内や血清中の BDNF が低下しているとの報告から、精神疾患の病態に関わる因子であることが示唆されている^{52,53)}。興味深いことに、脳内 BDNF 発現変動が幼少期ストレスや慢性疼痛において認められることが報告されている^{54,55)}。そこで、第二章では神経障害性疼痛後の情動機能の障害に対する MSSI の影響に関して検討を行った。さらに、神経障害性疼痛後の脳内 BDNF 発現に対する MSSI の影響に関する検討も加えた。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Nishinaka T., Kinoshita M., Nakamoto K., Tokuyama S., Sex differences in depression-like behavior after nerve injury are associated with differential changes in brain-derived neurotrophic factor levels in mice subjected to early life stress. *Neurosci. Lett.*, 592, 32-36 (2015).

2-2. 実験材料ならびに方法

第一章 (1-2) と同様の実験材料ならびに方法に従った。

2-2-1. 実験スケジュール

9 週齢時に PSL を行い、処置 3 週間後 (12 週齢時) に抑うつ様行動の評価系である forced swim 試験を行った。脳組織の回収は、出生 21 日目の母子分離が終了後 24-72 時間 (3 週齢時) または強制水泳試験終了後 (12 週齢時) に行った。強制水泳試験は明期に行った。

2-2-2. 強制水泳試験 (forced swim test、FST)

実験には、バケツ (高さ 27 cm × 直径 25 cm) を使用し、水 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) を 15cm の高さになるまで入れた。マウスをゆっくりと水の中に置き、6 分間強制水泳をさせた。マウスの行動はバケツの上に取り付けたカメラで観察を行った。6 分間における無動行動の時間を測定した。無動行動は、マウスが水面上に頭部を保持するために必要な体動のみを呈し浮遊している状態と定義した。

2-2-3. 前頭前皮質、海馬、線条体組織抽出液の調製および western blot 用サンプル調製

マウスを頸椎脱臼により安楽死させた後に断頭を行い、脳を摘出した。Franklin と Paxinos のマウス脳地図に従い、氷冷下で海馬ならびに線条体を分取した⁵⁶⁾。嗅球を除いた後、前 2 mm 部分の皮質を前頭前皮質として分取した。分取した各脳部位は homogenize buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.5)、120 mM NaCl、4% tween 20、2 mM β -mercaptoethanol、1 mM Na_3VO_4 、5 mM benzamidine、20 mM NaF、1 mM p-nitrophenyl phosphate、5 mM imidazole] 150 mL に 50 $\mu\text{g/mL}$ trypsin inhibitor、50 $\mu\text{g/mL}$ leupeptine、50 $\mu\text{g/mL}$ aprotinin、5 mg/mL pepstatin、1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) を添加した溶液中で均質化し (800 rpm、25 stroke)、遠心分離 (15000 \times g、4 $^\circ\text{C}$ 、5 分) によって得られた上清を回収した。上清は 50 倍希釈し、Lowry 法 (DC プロテインアッセイ、BIO-RAD、CA、U.S.A.) によりタンパク質量を測定した。その結果をもとに粗タンパク質量として 40 μg を分取し、等量の 2 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) sample buffer [0.1 M Tris-HCl (pH6.8)、4% SDS、12% β -mercaptoethanol、20% glycerol、0.004% bromophenol blue (BPB)] を混合し、これを 97 $^\circ\text{C}$ で、5 分間加温し速やかに氷冷したものを western blot 用サンプルとした。

2-2-4. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) および western blot 法

タンパク質は 40 $\mu\text{g/lane}$ を 15% ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。泳動条件として 240 V、50 分、マーカーとして Precision Plus Protein Standards Kaleidoscope (BIO-RAD) を用いた。電気泳動後、タンパク質は semi-dry transfer 法によって

nitrocellulose 膜に転写した。条件として、15 V、50 分で行った。BDNF の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [Tris buffered saline (TBS)-T {20 mM Tris-HCl (pH7.6)、150 mM NaCl、0.1% tween 20} + 5% bovine serum albumin (BSA、SIGMA-ALDRICH Co、U.S.A.)] 中で、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の検出には、nitrocellulose 膜を blocking buffer [TBS-T (TBS、0.1% tween 20) + 5% non-fat dry milk (和光純薬工業株式会社、大阪、日本)] 中で 1 時間室温において振盪させた。その後、rabbit anti-BDNF polyclonal antibody (1:500、sc-546、Santa Cruz、CA、USA)、および mouse anti-GAPDH monoclonal antibody (1:20000、Chemicon、CA、U.S.A.) を 4°C にて一晩反応させた。その後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。続いて二次抗体として、horseradish peroxidase (HRP) -labeled affinity purified antibody to rabbit IgG+IgM (H+L) (1:1000、Kirkegaard and Perry Laboratories、Guildford、UK)、HRP-labeled affinity purified antibody to mouse IgG+IgM (H+L) (1:10000、Kirkegaard and Perry Laboratories) を室温で 1 時間反応させた。その後、nitrocellulose 膜を TBS-T で 3 分ごとの洗浄を 10 回行った。二次抗体の洗浄後、Pierce Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific Inc.、IL、U.S.A.) の No.1 と No.2 液を等量混和した溶液を用いて発色させ、Light-Capture (AE-6981;アトー株式会社、東京、日本) で撮影した。バンドの強度は、CS-Analyzer ver. 3.0 (アトー株式会社) を用いて解析した。

2-3. 結果

2-3-1. 坐骨神経結紮後の抑うつ様行動に対する MSSI の影響

雄性マウスにおいて、PSL は Control ならびに MSSI において無動時間に影響は認められなかった [Control: Sham、 196 ± 11 秒、PSL、 224 ± 9 秒; MSSI: Sham、 225 ± 17 秒、PSL、 228 ± 14 秒] (Fig. 5A)。一方、雌性マウスでは、PSL は MSSI においてのみ無動時間を増加させた [Control: Sham、 211 ± 8 秒、PSL、 229 ± 9 秒; MSSI: Sham、 204 ± 14 秒、PSL、 263 ± 8 秒] [Fig. 5B; stress and surgery effect: $F(1,74) = 4.04$ 、 $P > 0.05$; stress effect: $F(1,74) = 1.57$ 、 $P > 0.05$; surgery effect: $F(1,74) = 14.84$ 、 $P < 0.01$]。

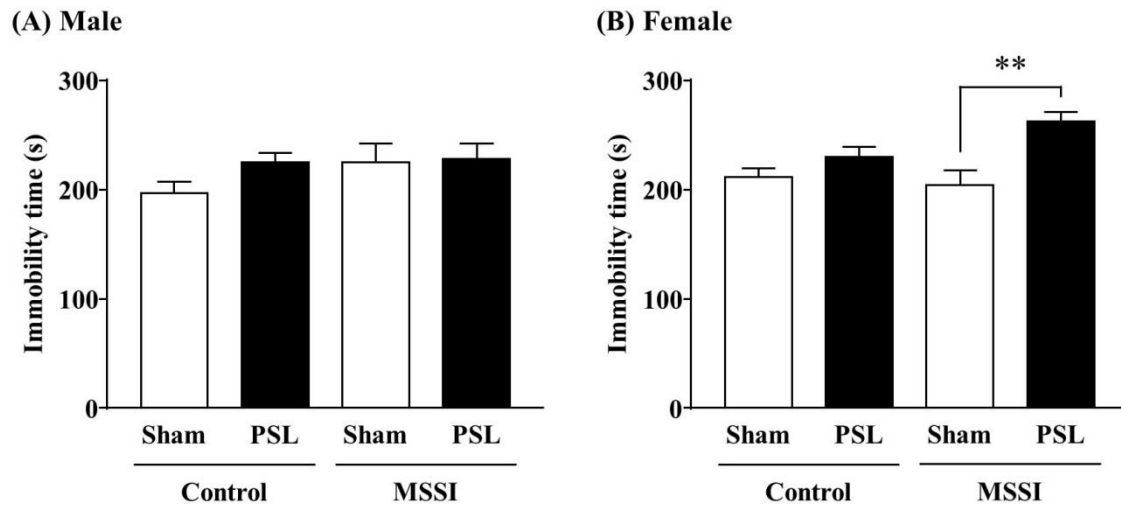


Fig. 5. Effect of MSSI on depression-like behavior during the neuropathic pain state.

(A) Male mice. (B) Female mice. Immobility behavior was measured for 6 min. Male: Control-Sham group, $n = 17$; Control-PSL group, $n = 17$; MSSI-Sham group, $n = 15$; MSSI-PSL group, $n = 15$. Female: Control-Sham group, $n = 19$; Control-PSL group, $n = 20$; MSSI-Sham group, $n = 19$; MSSI-PSL group, $n = 20$. ** $P < 0.01$, vs. MSSI-Sham group.

2-3-2.3 週齢時における脳内 BDNF 発現に対する母子分離の影響

3 週齢時において、母子分離は雄性マウスにおける海馬ならびに線条体の BDNF 発現量を有意に増加させた (Fig. 6A、 $P < 0.05$)。前頭前皮質では、母子分離により BDNF 発現量の増加傾向を示したが、有意な変化は認められなかった (Fig. 6A)。反対に雌性マウスでは、母子分離は線条体における BDNF 発現量を有意に低下させた (Fig. 6B、 $P < 0.05$)。前頭前皮質ならびに海馬では母子分離による BDNF 発現に対する影響は認められなかった (Fig. 6B)。

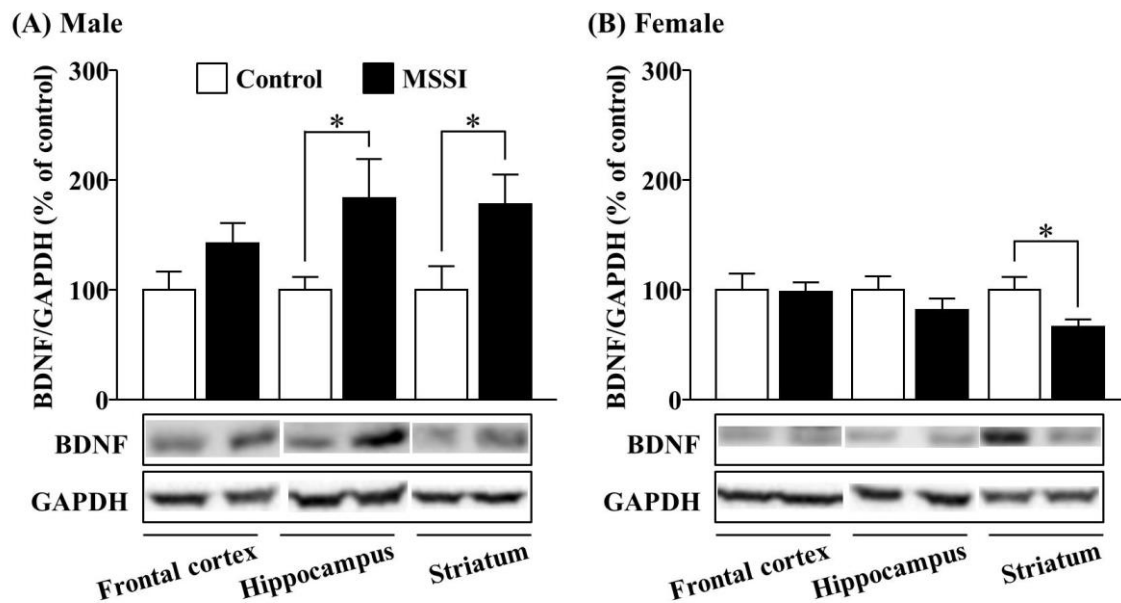


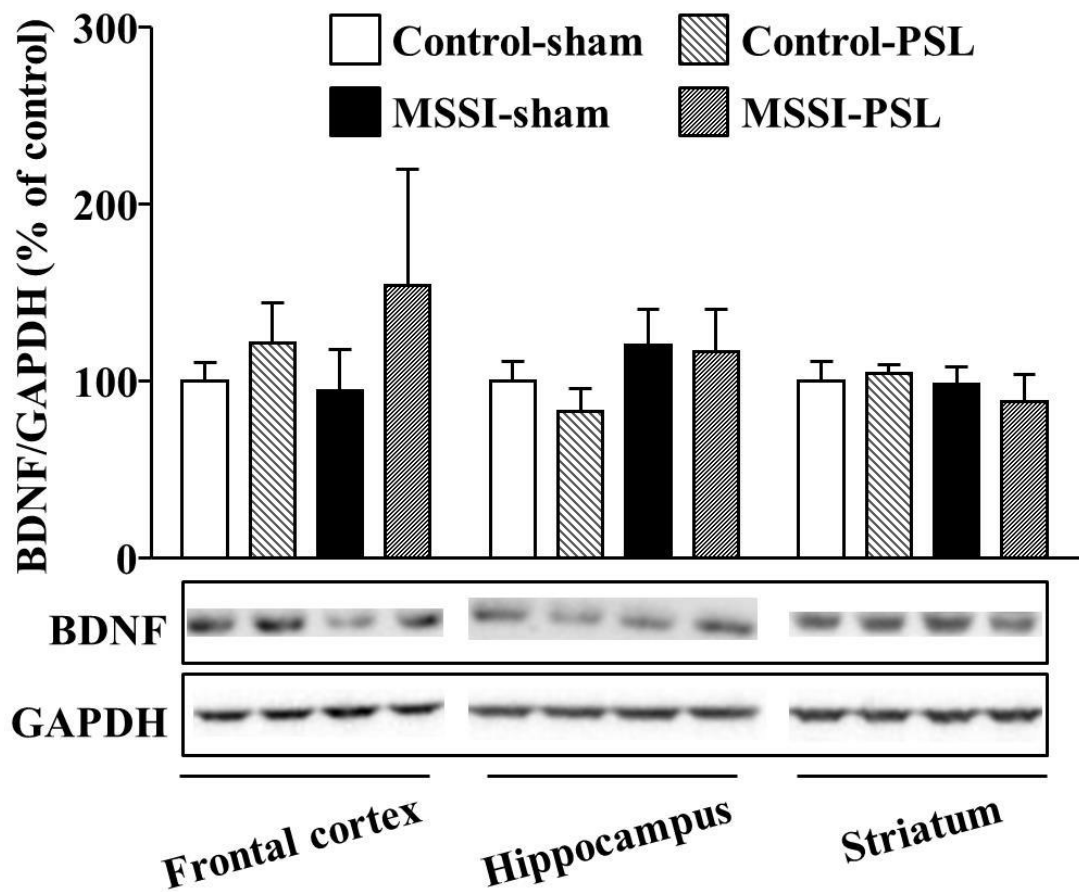
Fig. 6. Effect of MSSI on brain BDNF expression at 3 weeks of age.

(A) Male mice. (B) Female mice. BDNF levels in the frontal cortex, hippocampus and striatum were measured at 3 weeks of age (after maternal separation). The lower panel shows a representative western blot for BDNF and GAPDH. Relative levels of BDNF were normalized to GAPDH. The results are expressed as a percentage of control. Male: frontal cortex, $n = 15$; hippocampus, $n = 15$; striatum, $n = 9$. Female: frontal cortex, $n = 6$; hippocampus, $n = 12$; striatum, $n = 6$ (number of animals for Control and MSSI groups for each region were the same).

2-3-2. 12 週齢時における脳内 BDNF 発現に対する MSSI の影響

12 週齢時において、前頭前皮質における BDNF 発現量は Control と MSSI の間で同程度発現しており、PSL 処置の影響も認められなかった (Fig. 7A)。MSSI による海馬ならびに線条体の BDNF 発現量の増加は、12 週齢時では認められず、前頭前皮質と同様、PSL 処置の影響も認められなかった (Fig. 7A)。同様に、雌性マウスにおいても、MSSI による BDNF 発現変化はいずれの脳領域において認められず、さらに PSL 処置も BDNF 発現に影響しなかった (Fig. 7B)。

(A) Male



(B) Female

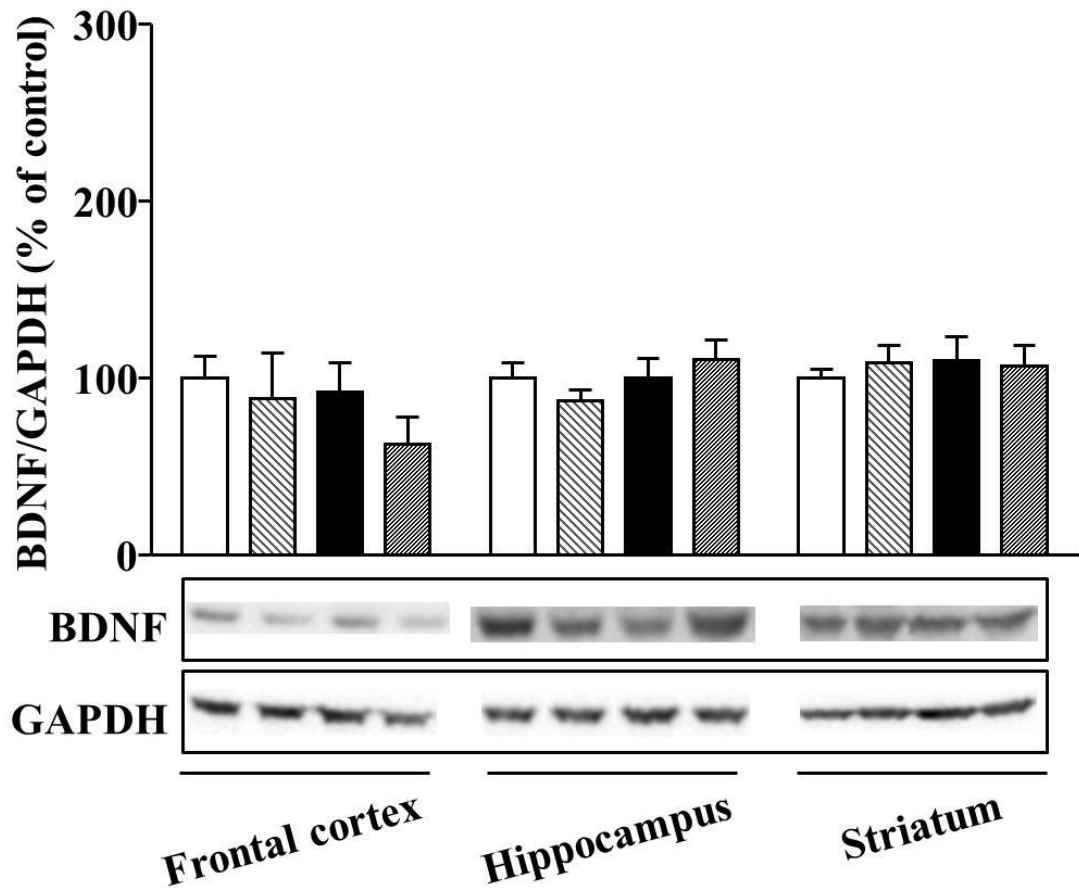


Fig. 7. Effect of MSSI on brain BDNF expression at 12 weeks of age.

(A) Male mice. (B) Female mice. BDNF levels in the frontal cortex, hippocampus and striatum were measured at 12 weeks of age (after the forced swim test). The lower panel shows a representative western blot for BDNF and GAPDH. Relative levels of BDNF were normalized to GAPDH. The results are expressed as a percentage of Control. Male: frontal cortex, $n = 12$; hippocampus, $n = 12$; striatum, $n = 6$. Female: frontal cortex: Control-Sham, $n = 12$; Control-PSL, $n = 10$; MSSI-Sham, $n = 11$; MSSI-PSL, $n = 10$; hippocampus: Control-Sham, $n = 12$; Control-PSL, $n = 12$; MSSI-Sham, $n = 13$; MSSI-PSL, $n = 12$; striatum: $n = 15$ (number of animals in the four groups for each region were the same, except for the frontal cortex and hippocampus for females).

2-4. 考察

第二章では、神経障害性疼痛による情動障害に対する **MSSI** の影響に関して検討を行った。さらに、情動機能の調節に関与していることが報告されている **BDNF** に着目し、情動を担う脳領域における **BDNF** 発現に対する **MSSI** の影響についても検討を加えた。

慢性疼痛モデル動物において、4 週間以上痛みが持続することによって不安や抑うつ様行動などの情動障害が認められることが報告されている^{41,57)}。本研究では、**PSL** 処置の 3 週間後に、情動行動に対する **MSSI** の影響を評価したところ、雌性マウスにおいてのみ抑うつ様行動が増加した。今回の結果は、他のストレスモデルを用いた過去の研究結果と一致しており、ストレス負荷は神経障害による痛覚過敏を増強し、痛みを惹起してから 4 週間以内に情動障害を引き起こすことが示唆される^{58,59)}。加えて、第一章で明らかにしたように、**MSSI** による神経障害性疼痛の増強は雄性ならびに雌性マウスにおいて認められたにもかかわらず、情動障害に対しては雌性マウスにおいてのみ変化が認められた。このことは、慢性疼痛に伴う情動障害が男性よりも女性の方が高い罹患率を示すことを報告した臨床研究の結果と一致している⁶⁰⁾。また、第一章で示したように、**MSSI** による情動機能の障害は雌性マウスにおいて強く認められており、神経障害性疼痛後の情動機能の障害に関しても雌性マウスが強く **MSSI** による影響を受けることが示唆される。

慢性的なストレスが行動障害を引き起こすことは知られているが、同時に脳内あるいは血清中の **BDNF** 量が低下しているとの報告がある⁵³⁾。本研究において、母子分離は一過性の **BDNF** 発現の変動を引き起こした。しかし、**MSSI** によって神経障害性疼痛後の情動障害が認められた成熟期においては **BDNF** 発現量の変動は認められなかった。これまでに、**BDNF** の発現変動が情動機能の障害と相関するとの結果がある一方、**BDNF** ノックアウトマウスの解析では、顕著な行動変化が認められていない⁶¹⁾。**BDNF** はストレスに対する感受性に影響することが知られていることから、母子分離直後の脳内 **BDNF** 発現の変動が、その後の成熟期における **MSSI** による神経障害性疼痛後の情動行動の発現に関与していることが示唆される。興味深いことに、幼少期ストレスによって脳内において特定の転写調節因子の発現が変動し、成熟期のストレス応答に影響を与えることが報告されているが、この転写調節因子を成熟期において強制的に発現変動させても、ストレス応答に変化が認められない³⁵⁾。幼少期は神経系の成熟化が活発に行われている時期であり、この時期における **BDNF** の発現変動は、成熟期における神経機能に強く影響を及ぼすことが考えられる。

本研究において、母子分離は雄性ならびに雌性マウスにおいて異なる脳領域における **BDNF** の発現変化を引き起こした。この結果は過去の知見と一致しており、幼少期ストレスは特定の脳領域において **BDNF** 発現量の変動を引き起こし、その影響には性差が認められる^{54,62)}。幼少期ストレスやコルチコステロン処置によって引き起こされる抑うつ様行動の発現と **BDNF-TrkB** シグナルの変化は相関があるとされている⁶³⁾。一方、神経障害性疼痛によって海馬における **BDNF** 発現量が減少することが報告されている⁶⁴⁾。さらに、**BDNF** の生合成を促進する薬剤である 4-methylcatechol を脳室内投与することで、神経障害性疼痛

後の抑うつ様行動が改善することが明らかになっていることから、痛みに伴う情動機能の障害においても BDNF がその病態形成に関与していることが考えられる⁶⁵⁾。したがって、幼少期ストレス負荷による BDNF 発現量の変動は、成熟期における神経障害性疼痛後の情動障害発現の性差に関与することが示唆された。

これまでに、海馬が情動やストレス応答の制御において重要な役割を果たすことが明らかにされている。例えば、海馬における神経新生はストレス応答に影響することが知られている⁶⁶⁾。海馬の神経新生を低下させたマウスでは、ストレス負荷後のコルチコステロンの分泌量が増加し、抑うつ様行動を示す。一方、慢性的な抗うつ薬の投与は海馬の神経新生を亢進させ、同時に BDNF 発現量の増加を引き起こす^{67,68)}。海馬の BDNF 発現量を増加させることで、ストレスに対する抵抗性を示すことが知られている^{69,70)}。さらに、幼少期ストレスは海馬におけるグルココルチコイド受容体の発現量を持続的に減少させることで、ストレスに対する脆弱性を引き起こす⁸⁾。したがって、本研究で認められた雄性マウスの海馬における母子分離後の BDNF 発現量の増加は、神経障害性疼痛後の情動障害の影響を減弱させるために作用していることが示唆される。

雌性マウスの線条体では MSS1 によって一過性の BDNF 発現の低下が認められた。線条体の中でも特に側坐核はストレス応答の調節において重要な役割を持つことが示唆されている。社会敗北ストレスは抑うつ様行動を引き起こし、側坐核における BDNF 発現量を増加させる¹⁴⁾。また、線条体の神経発達において、特に BDNF シグナル系が重要であることが知られている⁷¹⁾。したがって、幼少期ストレス負荷後の線条体における BDNF 発現の低下は、成熟期のストレス応答に関与していることが示唆される。

第二章では、MSS1 は神経障害性疼痛後の情動障害を増悪させ、その作用には性差が認められた。興味深いことに、MSS1 による神経障害性疼痛の増強は、雄性ならびに雌性マウスにおいて認められているものの、情動機能の障害は雌性マウスにおいてのみ認められた。臨床研究において、慢性疼痛による情動障害やうつ病の発症リスクは男性と比べて女性が高いことが報告されており、今回の結果は、これら臨床報告と一致している。したがって、今回作製したモデルは、精神疾患や痛みに伴う情動機能の障害における性差の影響を解析するための有用なモデルであることが示唆される。さらに、この性差を引き起こすメカニズムとして、幼少期ストレス負荷直後の脳内 BDNF 発現変化の違いが関与することが示唆された。

第三章

神経障害性疼痛時の脳内神経可塑性と NMDA 受容体ならびにドパミン受容体に対する幼少期ストレス負荷の影響

3-1. 緒言

第一章において、MSSI が成熟期において情動障害を引き起こし、雄性ならびに雌性マウスにおいて神経障害性疼痛の増強を引き起こすことを明らかにした。さらに、第二章では、MSSI は雌性マウスにおいてのみ神経障害性疼痛による情動障害を増悪させること、加えて、その情動障害増悪の性差に母子分離直後の脳内 BDNF 発現変動が関与していることを明らかにした。BDNF の発現変動は幼少期のみ認められ、成熟期において BDNF そのものは MSSI による神経障害性疼痛の増悪には直接的に関与していないことが示唆された。

神経障害性疼痛の発症機序として、疼痛の伝達経路である脊髄内における中枢性感作が関与していることが考えられている⁷²⁾。これは、末梢組織における炎症や神経障害によって、神経の可塑的变化、すなわち、脊髄神経活動の持続的な興奮や閾値の低下が引き起こされることが、異常な痛みを生じさせる原因であるという考えである。近年では、持続的な痛みによる神経の可塑的变化が脳内でも認められており、痛みの慢性化や情動障害に対する影響が着目されている⁷³⁻⁷⁵⁾。

Extracellular signal-regulated kinase (ERK) は mitogen-activated protein kinase ファミリーに属するリン酸化酵素であり、様々な刺激に応答し、リン酸化を受けることで活性化し、多種にわたる生理作用を発揮する。痛みを引き起こす侵害刺激は、痛みの伝達経路である脊髄後角や脳内において ERK の活性化を引き起こすことが知られている⁷⁶⁾。通常、触刺激などの痛みを引き起こさない刺激では、ERK は活性化されない。しかし、炎症や神経障害時では、触刺激においても ERK の活性化が認められることから、ERK の活性化が痛みの指標となり、神経の可塑的变化に関与する因子であることが強く示唆される⁷⁶⁻⁷⁹⁾。実際に、活性化された ERK は転写調節や翻訳後修飾を介して可塑的变化に関わる因子を調節することが知られている⁷⁶⁾。

本章の研究内容の一部は、下記の論文として発表した。

1. Nishinaka T., Nakamoto K., Tokuyama S., Early life stress induces sex-dependent increases in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase in brains of mice with neuropathic pain.
Eur. J. Pain, in press

グルタミン酸受容体である N-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体は、イオンチャネル内蔵型受容体であり、神経の可塑的变化に関わることが知られている⁸⁰⁾。興奮性シナプスにおいて、NMDA 受容体が開口すると、細胞内 Ca^{2+} 濃度が上昇し、ERK 経路を含む様々なシグナル伝達系を亢進させる。この変化が持続することで神経伝達の増強、すなわち神経の可塑的变化が引き起こされる。NMDA 受容体は、GluN1 と GluN2 の二つのサブユニットから構成され、GluN1 は co-agonist であるグリシンや D-セリンの結合部位を含んでおり、必須の構成サブユニットである。一方、GluN2 には A-D のサブタイプがあり、GluN2 のサブタイプによってアゴニスト刺激後の細胞内 Ca^{2+} 流入量やチャネルの開口時間が異なり、NMDA チャネルの機能に多様性を生み出す。脳領域毎に発現するサブタイプが異なっており、皮質、海馬、線条体や扁桃体などの前脳領域では、GluN2A と GluN2B が主に発現している。炎症性疼痛時では、脳内において GluN2B サブユニットの発現上昇が認められ、痛みの増強に関与していることが示されている⁸¹⁾。さらに、幼少期ストレスによっても、脳内において GluN2 サブタイプの発現変化が認められる⁸²⁾。

また、脳内の ERK シグナル経路を活性化させる因子の一つにドパミン神経系がある。ドパミン受容体は、G タンパク質共役型受容体であり 1-5 のサブタイプが知られているが、 D_1 受容体と D_2 受容体が ERK の活性化に関与することが知られている^{83,84)}。さらに、 D_1 受容体の刺激により、NMDA 受容体 GluN2B がリン酸化され、NMDA 受容体の機能が変化することが報告されている⁸⁵⁾。

そこで、第三章では、MSSI による成熟期における神経障害性疼痛の増強機構として脳内における神経の可塑的变化に着目した。上述したように、ERK の活性化、すなわち p-ERK は神経細胞の活性化ならびに可塑的变化を反映するマーカーとなりうることから、痛みや情動に関わる脳領域における p-ERK 発現に対する MSSI の影響に関して解析を行った。さらに、ERK の活性化に関わる NMDA 受容体やドパミン受容体のサブタイプの発現についての検討も加えた。

2. 3-2. 実験材料ならびに方法

第一章 (1-2) と同様の実験材料ならびに方法に従った。

3-2-1. Light touch 刺激

Gao らの方法を改変し行った⁷⁷⁾。PSL 処置 1 週間後 (10 週齢) のマウスを von Frey 試験と同様の装置に順化させた。Light touch 刺激はコットンの先端でマウスの PSL 処置側の後肢足蹠に軽く当てることで行った。この刺激を、5 分間 5 秒に一回のペースで行った。

3-2-2. 脳組織切片の調製

Light touch 刺激 15 分後に、マウスを diethyl ether 麻酔下にて開腹し、ペリスタポンプ AC-2110 (アトー株式会社、東京、日本) を用い、左心室より生理食塩水を灌流して駆血を行った。その後、4% paraformaldehyde (SIGMA-ALDRICH CO.LLC.) で灌流固定を行った。駆血した脳を摘出し、Bregma より -2、0、+2、+4 で切断した 2 mm 厚の冠状脳切片を作製し、4% paraformaldehyde (SIGMA-ALDRICH CO.LLC.) により 4℃ で 2 時間、10% スクロース (ナカライテスク株式会社、京都、日本) で 3 時間、20% スクロース (ナカライテスク株式会社) で一晩浸漬固定を行った。固定した脳切片を Tissue-Tek OCT Compound (サクラファインテックジャパン株式会社、東京、日本) を用いて凍結包埋を行った。凍結包埋後、クリオスタット (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) を用いて、-20℃ で厚さ 20 μm の脳組織切片を作製した。作製した脳組織切片を MAS-coated ガラススライド (松浪硝子工業株式会社、大阪、日本) に乗せ 30 分間風乾させた後、-80℃ にて保存した。

3-2-3. 免疫組織染色

Anti-rabbit p-EPK antibody による免疫組織染色は、VECTASTAIN Elite ABC kit のプロトコールに従い、VECTASTAIN Elite ABC kit (Vector Laboratories, Peterborough, UK) を用いて行った。凍結保存した切片を室温にて 15-30 分間風乾した後、phosphate buffered saline/0.1% TWEEN20 (PBST, pH 7.4) で洗浄した。組織の周りを撥水ペン (Dako pen、ダコ・ジャパン株式会社、東京、日本) で囲い、0.3% H₂O₂/methanol にて 30 分間インキュベートし、内在性酵素の不活化を行った。その後、脳切片を PBS で洗浄し、ブロッキングのために normal horse serum で 20 分間インキュベートした。続いて、ブロッキング試薬を除去し、一次抗体として、anti-rabbit p-ERK antibody (1:500, Cell signaling, Danvers, MA, U.S.A.) を 30 分間インキュベートさせた。次に脳切片を PBST で洗浄した後、goat anti-rabbit biotinylated antibody にて 30 分間インキュベートした。次に脳切片を PBS で洗浄し、VECTASTAIN Elite ABC 試薬 (avidin-biotin peroxidase complex) にて 30 分間インキュベートした。次に脳切片を PBS で洗浄し、脳切片に酵素基質溶液 (ImmPACT DAB) を滴下し 30-120 秒間反応させ、その後、脳切片を蒸留水につけ、反応を停止させた。脳切片を ethanol を用いて脱

水処理を行い、xylene により透徹を行った後、ソフトマウント (和光純薬株式会社) を用いて封入を行った。

3-2-4. p-ERK 陽性細胞数の計測

p-ERK 陽性細胞数の計測を行った脳領域を Fig. 8 に示す。各脳領域における p-ERK 陽性細胞数は、1 匹のマウスから 3-8 切片を作製し、定量を行った。染色した切片を CCD カメラ (DP20、オリンパス株式会社、東京、日本) を取り付けた光学顕微鏡 (BX43、オリンパス株式会社) を使用し、観察ならびに画像を取得した。p-ERK 陽性細胞数は ImageJ (Wayne Rasband, MD, U.S.A.) の cell counter analysis を使用し、計測を行った。

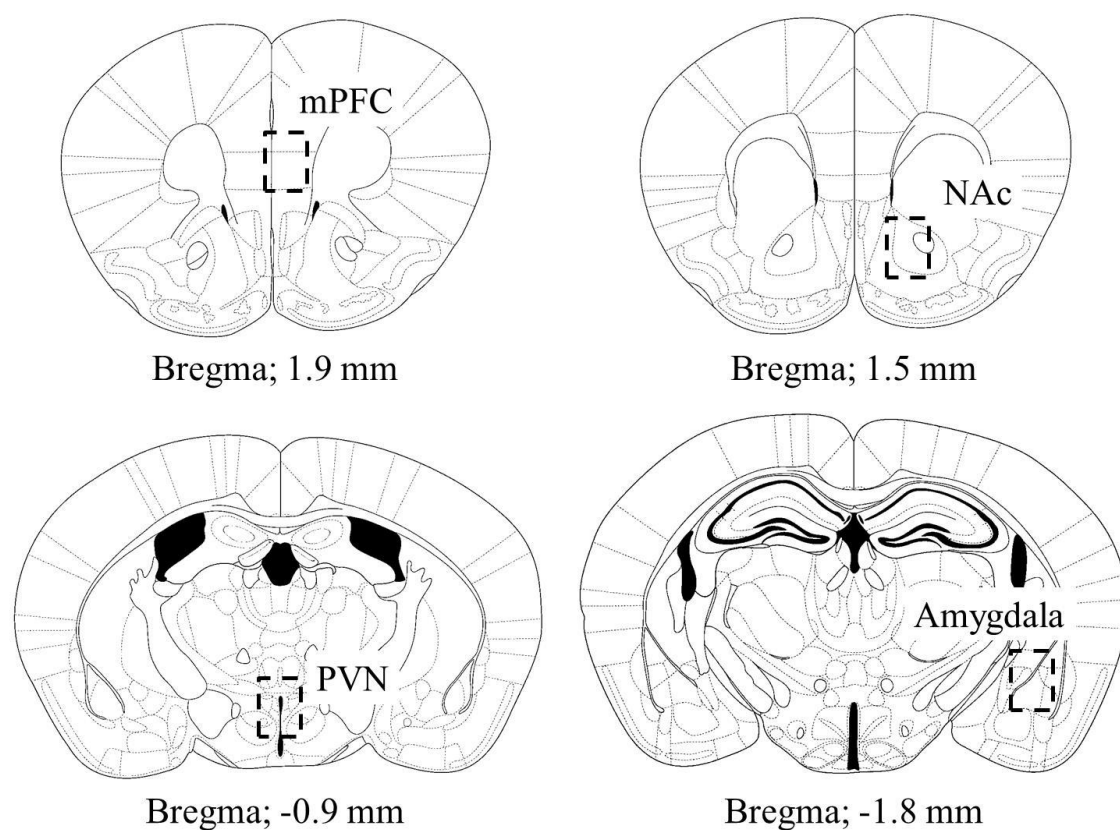


Fig. 8. Graphical representation of brain regions analyzed for p-ERK expression.

The illustrations of coronal sections were taken from the atlas of Franklin and Paxinos (2004). Square regions subjected to p-ERK expression analysis have indicated right hemisphere.

3-2-5. quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR)

PSL 処置 1 週間後のマウスを頸椎脱臼により安楽死させた後に断頭を行い、脳を摘出した。摘出した脳から brain slicer を用いて 内側前頭前皮質 (Bregma; 1.5-2.5 mm) を含む 1 mm 厚の冠状脳切片を作製し、生検トレパン (BPP-15F、1.5 mm、カイインダストリーズ株式会社、岐阜、日本) を用いて組織を回収し、直ちにドライアイスで凍結した。使用するまで組織サンプルは -80 °C にて保存した。RNA の抽出は、RNeasy Plus Micro kit (Qiagen、Venlo、Netherlands) を用い、プロトコールに従い行った。抽出した RNA を 260 nm における吸光度をもとに総 RNA 濃度を測定した。逆転写反応には PrimeScript RT reagent kit (タカラバイオ株式会社、滋賀、日本) を使用し、cDNA を作製した。定量的リアルタイム PCR 反応は、SYBR Premix EX TaqII (タカラバイオ株式会社) のプロトコールに従い、調製した cDNA 1μL にプライマー (Forward、reverse それぞれの終濃度 0.4 μM) を加え、Rotor-Gene Q (Qiagen) を用いて行った。使用したプライマーは Table 2 に記載した。PCR 条件は、最初に 95°C にて 30 秒間インキュベートした後、95°C : 5 秒、60°C : 30 秒のサイクルを 40 サイクル繰り返した。相対的 mRNA 発現量は、 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ の方法に従い、 β -actin の ΔC_t で補正を行い、算出した。

Table 2. qRT-PCR primers

	Forward	Reverse
<i>Grin2A</i>	5'-CAACGAAGGGATGAATGTGA-3'	5'-ACAAAGGGCACGGAGAAGT-3'
<i>Grin2B</i>	5'-TGCTACAACACCCACGAGAA-3'	5'-CTCCTCCAAGGTAACGATGC-3'
<i>Drd1</i>	5'-GGCTCCTAACACTTCTACCATGGA-3'	5'-GGACAGGATAAGCAGGGACAGA-3'
<i>Drd2</i>	5'-CCATCAGCATCGACAGGTACAC-3'	5'-CAGTAACTCGGCGCTTGGAG-3'
<i>β-actin</i>	5'-GGCTGTATTCCCCTCCATCG-3'	5'-CCAGTTGGTAACAATGCCATGT-3'

3-3. 結果

3-3-1. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する

MSSI の影響

雄性マウスにおいて、MSSI は PSL 処置同側脳半球における p-ERK 陽性細胞数に対して Sham 群ならびに PSL 群では影響が認められなかった。PSL 処置反対側脳半球では、Sham 群において MSSI による p-ERK 陽性細胞数の減少が認められた。一方、PSL 処置群では MSSI による影響は認められなかった (Fig. 9A and C)。一方、雌性マウスでは、MSSI は Sham 群ならびに PSL 処置群の両側脳半球において p-ERK 陽性細胞数を有意に増加させた (Fig. 9B and C)。

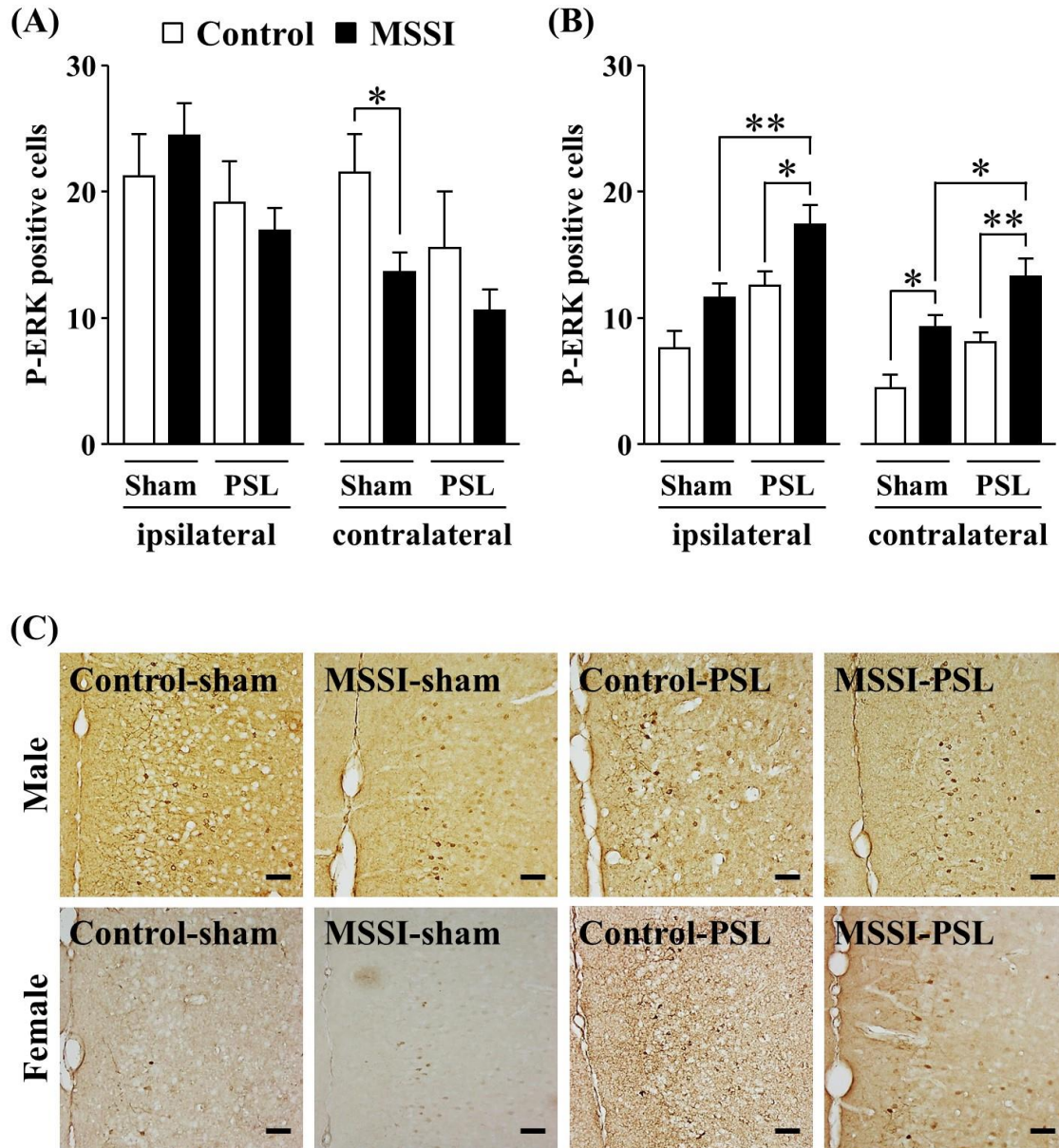


Fig. 9. Effect of MSSI on the p-ERK positive cells in the mPFC of Sham or PSL treated male (A) and female (B) mice.

At 1 week after nerve injury, brain slices were obtained at 15 min after light touch stimulation. The ventral surface of the ipsilateral hind paw was stimulated by a cotton tip for 5 min. (C) Representative immunohistochemical image of p-ERK expression in the ipsilateral hemisphere in the mPFC. Scale bar = 100 μ m. Male: Control-Sham; 28 slices (n = 5), MSSI-Sham; 36 slices (n = 6), Control-PSL; 16 slices (n = 3), MSSI-PSL; ipsi, 30, contra, 29 slices (n = 5). Female: Control-Sham; ipsi, 19, contra, 18 slices (n = 3), MSSI-Sham; ipsi, 36, contra, 35 slices (n = 6), Control-PSL; ipsi, 25, contra, 21 slices (n = 4), MSSI-PSL; ipsi, 39, contra, 35 slices (n = 6). Data are expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 and **P < 0.01 by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ipsi; ipsilateral, contra; contralateral, mPFC; medial prefrontal cortex

3-3-2. 側坐核における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する

MSSI の影響

雄性マウスの側坐核両側脳半球における p-ERK 陽性細胞数は Sham 群ならびに PSL 群において、MSSI による影響が認められなかった (Fig. 10A and C)。一方、雌性マウスでは、Sham 群ならびに PSL 群において MSSI は両側脳半球 p-ERK 陽性細胞数を増加させた (Fig. 10B and C)。

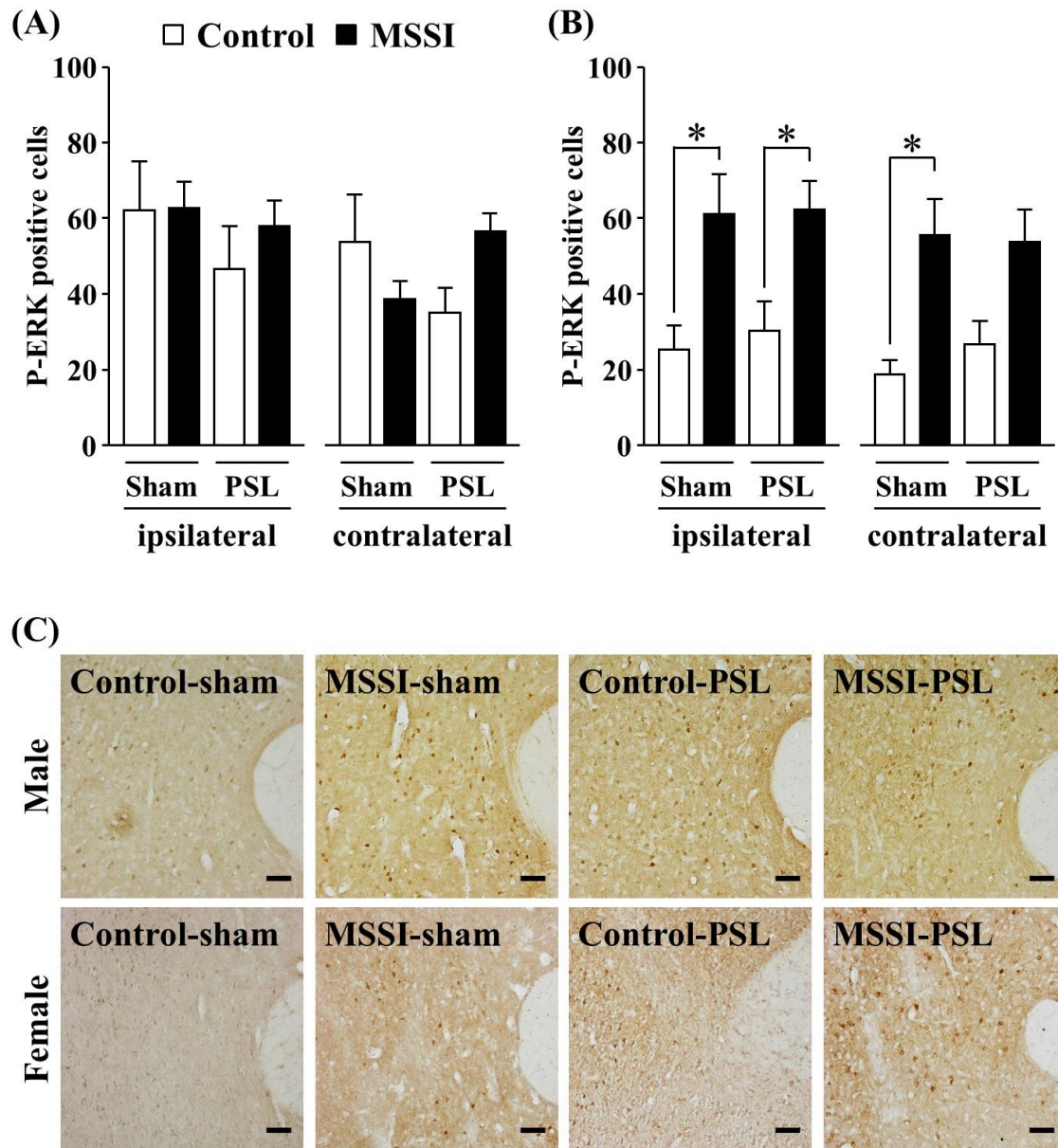


Fig. 10. Effect of MSSl on the p-ERK positive cells in the NAc of Sham or PSL treated male (A) and female (B) mice.

At 1 week after nerve injury, brain slices were obtained at 15 min after light touch stimulation. The ventral surface of the ipsilateral hind paw was stimulated by a cotton tip for 5 min. (C) Representative immunohistochemical image of p-ERK expression in the ipsilateral hemisphere in the NAc. Scale bar = 100 μ m. Male: Control-Sham; 16 slices (n = 4), MSSl-Sham; 23 slices (n = 6), Control-PSL; 10 slices (n = 3), MSSl-PSL; 25 slices (n = 5). Female: Control-Sham; ipsi, 11, contra, 10 slices (n = 3), MSSl-Sham; ipsi, 23, contra, 24 slices (n = 5), Control-PSL; ipsi, 16, contra, 14 slices (n = 3), MSSl-PSL; ipsi, 15, contra, 16 slices (n = 4). Data are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ipsi; ipsilateral, contra; contralateral, NAc; nucleus accumbens

3-3-3. 室傍核における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する

MSSI の影響

雄性マウスにおいて、MSSI は Sham 群において p-ERK 陽性細胞数を有意に増加させた。PSL 処置群では、有意な差ではないものの MSSI による p-ERK 陽性細胞数の増加傾向が認められた (Fig. 11A and C)。雌性マウスにおいても、MSSI による p-ERK 陽性細胞数の増加が PSL 群において認められ、Sham 群では増加傾向が認められた (Fig. 11B and C)。

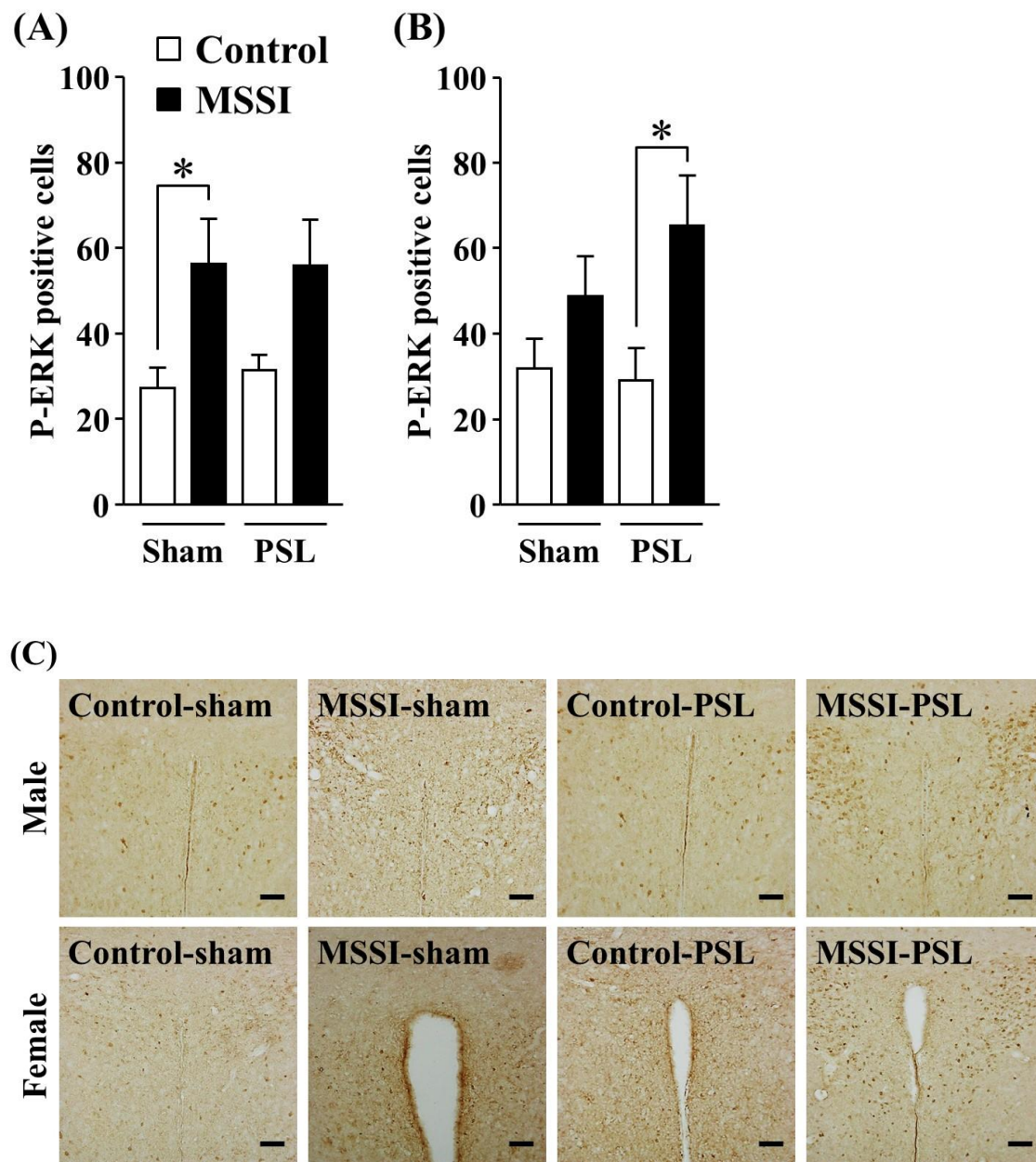


Fig. 11. Effect of MSSl on the p-ERK positive cells in the PVN of Sham or PSL treated male (A) and female (B) mice.

At 1 week after nerve injury, brain slices were obtained at 15 min after light touch stimulation. The ventral surface of the ipsilateral hind paw was stimulated by a cotton tip for 5 min. (C) Representative immunohistochemical image of p-ERK expression in the ipsilateral hemisphere in the PVN. Scale bar = 100 μ m. Male: Control-Sham; 23 slices (n = 6), MSSl-Sham; 24 slices (n = 6), Control-PSL; 12 slices (n = 3), MSSl-PSL; 17 slices (n = 5). Female: Control-Sham; 15 slices (n = 4), MSSl-Sham; 28 slices (n = 7), Control-PSL; 20 slices (n = 5), MSSl-PSL; 19 slices (n = 5). Data are expressed as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ipsi; ipsilateral, contra; contralateral, PVN; paraventricular nucleus

3-3-4. 扁桃体における神経障害性疼痛時の p-ERK 発現に対する

MSSI の影響

雄性マウスでは、MSSI は Sham 群において両側脳半球の p-ERK 陽性細胞数を有意に増加させた。一方、PSL 群では MSSI による p-ERK 陽性細胞数に対する有意な変化は認められなかった (Fig. 12A and C)。雌性マウスでは、MSSI は PSL 処置同側脳半球の p-ERK 陽性細胞数のみ PSL 群において有意に増加させた。一方、Sham 群において MSSI は両側脳半球の p-ERK 陽性細胞数に変化は認められなかった (Fig. 12B and C)。

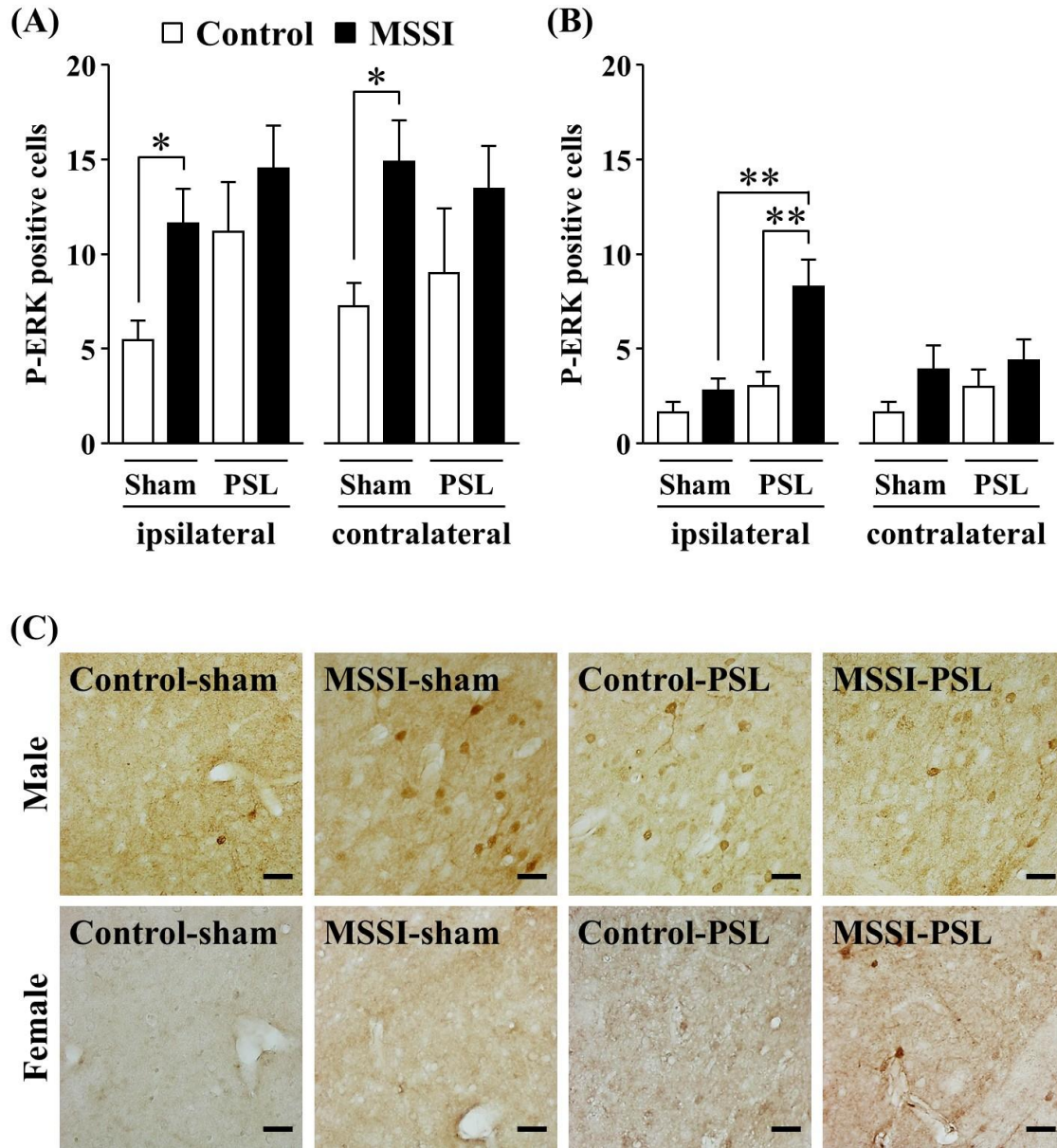


Fig. 12. Effect of MSSSI on the p-ERK positive cells in the amygdala of Sham or PSL treated male (A) and female (B) mice.

At 1 week after nerve injury, brain slices were obtained at 15 min after light touch stimulation. The ventral surface of the ipsilateral hind paw was stimulated by a cotton tip for 5 min. (C) Representative immunohistochemical image of p-ERK expression in the ipsilateral hemisphere in the amygdala. Scale bar = 30 μ m. Male: Control-Sham; 23 slices (n = 6), MSSSI-Sham; 24 slices (n = 6), Control-PSL; 10 slices (n=3), MSSSI-PSL; ipsi, 14, contra, 13 slices (n = 4). Female: Control-Sham; 16 slices (n = 4), MSSSI-Sham; ipsi, 28, contra, 27 slices (n = 7), Control-PSL; 20 slices (n = 5), MSSSI-PSL; 17 slices (n = 5). Data are expressed as the mean \pm SEM. *P < 0.05 and **P < 0.01 by a two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ipsi; ipsilateral, contra; contralateral

3-3-5. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の GluN2A/GluN2B 発現に対する

MSSI の影響

雄性マウスにおいて、GluN2A (*Grin2a*) mRNA 発現に対する MSSI の影響は、Sham ならびに PSL 群において認められなかった (Fig. 13A)。同様に、GluN2B (*Grin2b*) mRNA 発現に対しても、MSSI の影響は認められず、*Grin2b/Grin2a* 比も Control と MSSI に変化は認められなかった (Fig. 13B and C)。一方、雌性マウスでは、Sham 群においては MSSI による *Grin2a* 発現に対する影響は認められないものの、PSL 群では MSSI は *Grin2a* 発現を減少させる傾向にあった (Fig. 13A)。さらに、MSSI は Sham 群においてのみ *Grin2b* 発現を上昇させる傾向が認められた (Fig. 13B)。MSSI は Sham 群において *Grin2b/Grin2a* 比を有意に増加させ、PSL 群では増加傾向を示した (Fig. 13C)。

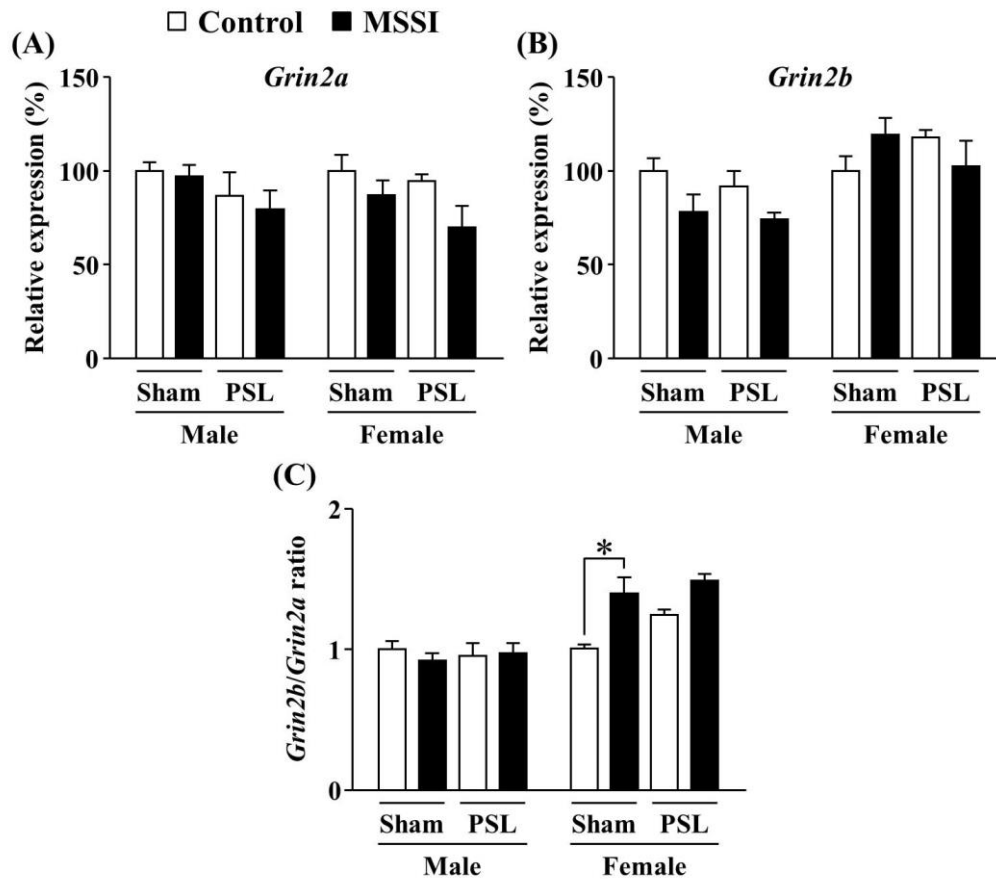


Fig. 13. Effect of MSSI on the GluN2A (*Grin2a*) (A), GluN2B (*Grin2b*) (B) mRNA levels and *Grin2b/Grin2a* ratio (C) in the mPFC.

Control and MSSI mice were treated PSL at the 9 weeks of ages. At 1 week after PSL, mPFC tissue was obtained by biopsy, and *Grin2a* and *Grin2b* levels were measured by qRT-PCR. The specific primer pairs for *Grin2a* and *Grin2b* show the table 2. Expression levels were normalized to the values for β -actin. The results of qRT-PCR are shown as percentage of Control-Sham. Male: Control-Sham group, n = 4; MSSI-Sham group, n = 5; Control-PSL group, n = 4; MSSI-PSL group, n = 5. Female: Control-Sham group, n = 4; MSSI-Sham group, n = 5; Control-PSL group, n = 4; MSSI-PSL group, n = 4. Data are expressed as means \pm SEM; *P < 0.05; two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test.

3-3-6. 内側前頭前皮質における神経障害性疼痛時の D₁/D₂ 受容体発現に対する

MSSI の影響

MSSI は雄性マウスの Sham ならびに PSL 群において D₁ 受容体 (*Drd1*) mRNA 発現に影響しなかった (Fig. 14A)。しかし、MSSI は Sham 群において D₂ 受容体 (*Drd2*) mRNA 発現を Control と比べて有意に低下させた (Fig. 14B)。PSL 群では *Drd2* 発現に対する MSSI の影響は認められなかった (Fig. 14B)。一方、雌性マウスでは、MSSI は Sham ならびに PSL 群において *Drd1* 発現に影響しなかった (Fig. 14A)。同様に、*Drd2* 発現に対しても MSSI の影響は Sham ならびに PSL 群で認められなかった (Fig. 14B)。

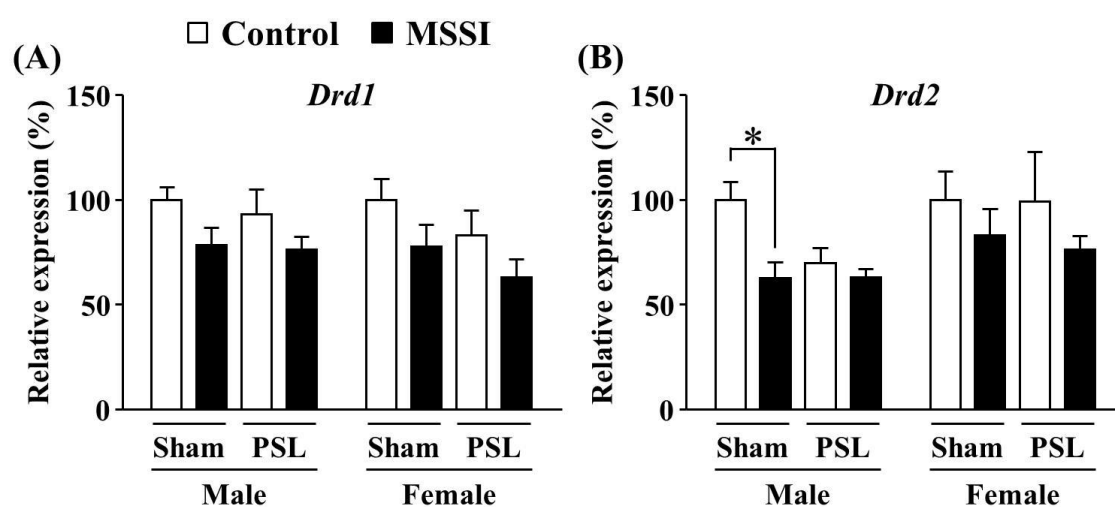


Fig. 14. Effect of MSSI on the D₁ receptor (*Drd1*) (A) and D₂ receptor (*Drd2*) (B) mRNA levels in the mPFC.

Control and MSSI mice were treated PSL at the 9 weeks of ages. At 1 week after PSL, mPFC tissue was obtained by biopsy, and *Drd1* and *Drd2* levels were measured by qRT-PCR. The specific primer pairs for *Drd1* and *Drd2* show the table 2. Expression levels were normalized to the values for β -actin. The results of qRT-PCR are shown as percentage of Control-Sham. Male: Control-Sham group, n = 4; MSSI-Sham group, n = 5; Control-PSL group, n = 4; MSSI-PSL group, n = 5. Female: Control-Sham group, n = 4; MSSI-Sham group, n = 5; Control-PSL group, n = 4; MSSI-PSL group, n = 4. Data are expressed as means \pm SEM; *P < 0.05; two-way analysis of variance followed by Bonferroni's post hoc test.

3-4. 考察

本章では、神経障害性疼痛時の脳内 p-ERK 発現に対する MSSI の影響に関して検討を行った。本研究では、神経細胞の活性化マーカーとして p-ERK に着目したが、早期遺伝子である c-fos も同様のマーカーとしてよく知られている。神経細胞の活性化によって c-fos の発現上昇が引き起こされる⁸⁶⁾。しかし、神経細胞活性化後の ERK リン酸化と比較すると、c-fos タンパク質の発現上昇は時間がかかる^{87,88)}。さらに、炎症や神経障害後の ERK リン酸化を抑制することによって痛みが軽減されるが、c-fos の発現上昇を抑制しても疼痛行動には影響しないことが知られている⁷⁶⁾。したがって、痛みに関連する神経細胞の活性化と ERK のリン酸化は相関することから、神経障害時における神経細胞活性化の評価には ERK のリン酸化が有用である。

MSSI は PSL 処置群だけでなく sham 群においても、複数の脳領域において p-ERK 陽性細胞数の増加が認められた。以前の報告では、母子分離は扁桃体における p-ERK 発現を増加させることが示されている⁸⁹⁾。さらに、他の神経細胞の活性化マーカーである c-fos の発現変化を検討した報告においても、複数の脳領域において母子分離による c-fos 発現の増加が認められている⁹⁰⁾。したがって、幼少期ストレスは広範囲の脳領域において神経の活動性を亢進させることが示唆される。興味深いことに、前脳特異的 GluN2B 過剰発現マウスは、炎症性疼痛の増強やホルマリン誘発の脳内 c-fos 発現増加の亢進といった特徴を示す⁹¹⁾。炎症や神経障害による痛覚過敏の増強は、前脳特異的 CREB 過剰発現マウスでも認められる³¹⁾。NMDA 受容体は細胞内 Ca^{2+} 濃度を増加させ、ERK や CREB の活性化を引き起こし、NMDA 受容体のリン酸化や様々なタンパク質発現を調節することで、神経細胞の活動性を高める。したがって、広範囲の脳領域、特に皮質、線条体、海馬や扁桃体を含む前脳領域の神経活動の増加は、炎症や神経障害時に生じる痛覚過敏を増強させることが示唆される。

前脳領域は認知や情動による痛みの調節に関与していることが知られている^{34,92)}。痛みを引き起こす侵害刺激は、二つの経路を介して前脳領域に伝わる (Fig. 15)。前脳領域の一つである扁桃体は、脊髄、脳幹や皮質を介して侵害刺激を受け取り、下行性疼痛制御の中枢である中脳水道周囲灰白質に投射することが知られている⁹³⁾。一方、不安や恐怖の調節においても扁桃体が重要であることが知られている^{94,95)}。したがって、扁桃体が情動による痛みの調節に関与していることが示唆される。本研究では、扁桃体領域における神経障害後の p-ERK 発現増加が雌性マウスにおいて認められている。今回のモデルでは、右後肢の坐骨神経を結紮しているため、右脳半球扁桃体領域の p-ERK 発現が増加しているが、この結果は以前の報告と一致している^{96,97)}。その他の脳部位として、室傍核はストレス応答に関わる視床下部-下垂体-副腎皮質系の反応性を調節することが知られている⁹⁸⁾。室傍核に多く発現している副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (Corticotropin-releasing hormone, CRH) は、下垂体から副腎皮質刺激ホルモンを遊離させる。また、ストレス負荷後、室傍核において CRH 陽性細胞において p-ERK 発現が上昇することが報告されている⁹⁸⁾。上記の内容をまとめ

第一章や第二章で示したように、MSSI による影響には性差が認められたが、脳内 p-ERK 発現に対しても顕著な性差が認められた。内側前頭前皮質は、認知や情動の処理において重要な領域であるが、疼痛制御としての役割も示すことが知られている³⁴⁾。幼少期ストレスや神経障害性疼痛は内側前頭前皮質において遺伝子ネットワークや機能的変化を引き起こすことが報告されている^{35,99)}。近年の光遺伝学的手法を用いた報告では、内側前頭前皮質の神経活動が、炎症や神経障害時の痛覚過敏や情動障害の発現に関与していることが示されている¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾。同様に、側坐核も痛みに伴う情動障害と関係があることが報告されている^{47,103)}。したがって、MSSI による性依存的な p-ERK 発現変動は、神経障害性疼痛後に認められる情動障害の発現に関与することが示唆される。

脳内において、ERK を活性化する上流の因子としてグルタミン酸受容体とドパミン受容体が知られている。本研究では、MSSI による p-ERK 発現上昇が認められた雌性マウスの内側前頭前皮質において、GluN2B/GluN2A 比の増加が認められた。これは、NMDA 受容体を構成するサブユニットに、MSSI を負荷したマウスでは GluN2B が多く含まれることを反映していることが考えられる。GluN2 は受容体に含まれるサブタイプによって、NMDA 受容体の機能に影響することが知られている⁸⁰⁾。GluN2B は GluN2A と比較して、グルタミン酸に対する反応性は高くないものの、一度のチャネル開口による細胞内 Ca^{2+} 流入量が多く、細胞内のシグナル伝達経路を動員する能力が GluN2A よりも高い。さらに、神経の可塑的变化に関わる長期増強には、GluN2B が重要であることが遺伝学的なマウスを用いた研究から明らかになっている¹⁰⁴⁾。前脳における GluN2B 過剰発現マウスでは、炎症による痛みが増強することや前帯状回皮質の神経活動の増強が、神経障害性疼痛時に認められることが報告されている^{91,105)}。したがって、雌性マウスの内側前頭前皮質では MSSI によって GluN2B を含む NMDA 受容体が多くなり、その結果、下流の ERK の活性化を亢進させ、神経障害性疼痛を増強していた可能性が考えられる。興味深いことに、脳の発達に従い前脳領域に発現する GluN2A と GluN2B は発現変動する。発生から生後直後までは、GluN2B が主に発現し、GluN1 と NMDA 受容体を構成するが、成長が進むにつれ GluN2A の発現量が多くなり、脳が成熟に達する時期では、主に GluN2A が NMDA 受容体の構成サブユニットになる¹⁰⁶⁾。この発達に伴う GluN2B から GluN2A への切り替えは、母子分離によって障害を受け、GluN2B の発現量が通常よりも高くなることが報告されている¹⁰⁷⁾。したがって、本研究における GluN2B/GluN2A 比の変動も幼少期の母子分離が影響していたことが考えられる。

一方、ドパミン受容体も ERK の活性化に関与することが知られているが、本研究では、雄性マウスの内側前頭前皮質において MSSI による D_2 受容体の発現低下が認められた。 D_1 受容体、 D_2 受容体それぞれの選択的アゴニストの刺激により、ERK が活性化される。通常、受容体に対してアゴニストを繰り返し作用させると、受容体のダウンレギュレーションが引き起こされる。したがって、本研究で認められた、MSSI による内側前頭前皮質の D_2 受容体発現低下は、内因性アゴニストであるドパミンが過剰に作用していたことを示唆す

る。しかし、本研究では、雄性マウスの内側前頭前皮質において、MSSI による p-ERK 発現に影響は認められなかった。さらに、同じ領域における D₁ 受容体発現には MSSI は影響しなかった。したがって、雄性マウスにおける MSSI による D₂ 受容体の発現低下は、ERK の活性化とは関係がないことが示唆される。D₂ 受容体は、G_{ai} タンパク質と共役していることから、その選択的なアゴニストを脳内に投与することで抗侵害作用を示す^{108,109}。この作用は、神経障害後の痛みに対しても認められることから、神経障害性疼痛時の疼痛制御にドパミン神経系が関与していることが考えられる¹¹⁰⁻¹¹²。慢性疼痛に分類される線維筋痛症や腰痛の患者では、脳内のドパミン神経伝達に異常が認められる^{113,114}。また、6-hydroxydopamine 処置によるドパミン神経の障害によって、神経障害による痛みが増強することが報告されている¹¹⁵。したがって、MSSI は雄性マウスの内側前頭前皮質においてドパミン神経系に障害を引き起こすことで、神経障害性疼痛を増強していることが考えられる。

以上をまとめると、MSSI は部位特異的に p-ERK 発現を上昇させ、さらに p-ERK 発現の上昇に性差が認められた。したがって、幼少期ストレスによる複数における脳領域の活性化は、神経障害による痛覚過敏の増強や情動障害の発現の性差に寄与することが示唆される。内側前頭前皮質においては、雌性マウスにおける p-ERK 発現増加に、NMDA 受容体の GluN2B/GluN2A 比の増加が関与していることが示された。また、雄性マウスでは、GluN2B/GluN2A 比に対する MSSI の影響は認められず、D₂ 受容体の発現低下が認められた。よって、MSSI による神経障害後の痛覚過敏の増強が雄性・雌性マウスの両方で認められているものの、そのメカニズムには性差が存在する可能性がある。

総 括

本研究では、幼少期ストレス負荷後の成熟期における神経障害性疼痛に対する影響に関して検討を行い、加えて、これらの機序解明を目的として脳内 BDNF、p-ERK、NMDA 受容体やドパミン受容体発現に焦点をあて解析を行い、以下の結果を得た。

1. 幼少期ストレスモデルとして用いた **MSSI** は、成熟期において情動機能の障害を引き起こし、一部の行動変化に性差が認められた。さらに、**MSSI** は雄性ならびに雌性マウスにおいて神経障害後の痛覚過敏を増強させた。
2. **MSSI** は雌性マウスにおいて、神経障害後の抑うつ様行動を増加させた。
3. 母子分離直後の幼少期において情動機能の調節を担う **BDNF** の発現変動が認められ、その変動には性差が認められた。一方、神経障害性疼痛の増強や情動障害の増悪が認められた成熟期では、**BDNF** の発現変化は認められなかった。
4. **MSSI** は内側前頭前皮質、側坐核、室傍核や扁桃体などの痛みと情動の調節に関わる脳領域において、神経の活性化や可塑的変化の指標となる **p-ERK** 発現を増加させ、一部の脳領域では性差が認められた。
5. 内側前頭前皮質において、**MSSI** は雌性マウスの **GluN2B/GluN2A** 比を増加させた。一方、雄性マウスでは **MSSI** により **D₂** 受容体の発現低下が認められた。

以上、本研究から、幼少期のストレスは成熟期における神経障害性疼痛を増悪し、痛みによる情動障害にも影響を及ぼすこと、加えて、幼少期ストレスによる影響には性差が認められることが示された。さらに、幼少期ストレス負荷後早期あるいは成熟期の脳内における物質的な変化が、痛みの増強や情動障害の増悪に関与していることが示された。

今後、今回確立したモデルをさらに詳細に解析することによって、痛みの増悪あるいは慢性化機構の解明に寄与すると考えられる。将来的には、慢性疼痛治療において重要とされる早期発見・早期治療に貢献できるものと期待される。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、本研究の機会を与えて頂き、終始御懇切なる御指導と御鞭撻を賜りました神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 徳山 尚吾 教授に深甚たる謝意を表します。

本論文作成にあたり、御校閲ならびに御助言を賜りました神戸学院大学薬学部 李 英培 教授、久米 典昭 教授、白川 晶一 教授に心から感謝致します。

NMDA 受容体ならびにドパミン受容体サブタイプの mRNA 発現量測定に御協力頂きました大阪医科大学麻酔科学研究室 下條 正仁 講師に謹んで感謝の意を申し上げます。

本研究の遂行ならびに論文作成において、御指導、御助言を賜りました神戸学院大学薬学部臨床薬学研究室 小畑 友紀雄 講師、中本 賀寿夫 講師、原田 慎一 レクチャラーに心から御礼申し上げます。また、温かい励ましと御助力を頂きました本研究室の皆様および卒業生の皆様に心から感謝致します。

最後に、温かく見守りそして辛抱強く支援して頂きました家族に対して心より感謝の意を表します。

引用文献

1. Ogawa S, Iseki M, Kikuchi S. A large-scale survey on chronic pain and neuropathic pain in japan. *J. Japanese Clin. Orthop. Assoc.*, **47**, 565–574 (2012).
2. Ministry of Health, Labour and Welfare
<<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2010/06/dl/s0601-7a.pdf>>
3. Imbierowicz K., Egle U.T. Childhood adversities in patients with fibromyalgia and somatoform pain disorder. *Eur. J. Pain*, **7**, 113–119 (2003).
4. Jones G.T., Power C., Macfarlane G.J. Adverse events in childhood and chronic widespread pain in adult life: Results from the 1958 British Birth Cohort Study. *Pain*, **143**, 92–96 (2009).
5. Heim C., Nemeroff C.B. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: preclinical and clinical studies. *Biol. Psychiatry*, **49**, 1023–1039 (2001).
6. Nanni V., Uher R., Danese A. Childhood maltreatment predicts unfavorable course of illness and treatment outcome in depression: a meta-analysis. *Am. J. Psychiatry*, **169**, 141–151 (2012).
7. Cohen R.A., Grieve S., Hoth K.F., Paul R.H., Sweet L., Tate D., Gunstad J., Stroud L., McCaffery J., Hitsman B., Niaura R., Clark C.R., McFarlane A., MacFarlane A., Bryant R., Gordon E., Williams L.M. Early life stress and morphometry of the adult anterior cingulate cortex and caudate nuclei. *Biol. Psychiatry*, **59**, 975–982 (2006).
8. Hackman D.A., Farah M.J., Meaney M.J. Socioeconomic status and the brain: mechanistic insights from human and animal research. *Nat. Rev. Neurosci.*, **11**, 651–659 (2010).
9. Pryce C.R., Feldon J. Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **27**, 57–71 (2003).
10. Melo A.I., Lovic V., Gonzalez A., Madden M., Sinopoli K., Fleming A.S. Maternal and littermate deprivation disrupts maternal behavior and social-learning of food preference in adulthood: tactile stimulation, nest odor, and social rearing prevent these effects. *Dev. Psychobiol.*, **48**, 209–219 (2006).
11. Stephan M., Helfritz F., Pabst R., von Hörsten S. Postnatally induced differences in adult pain sensitivity depend on genetics, gender and specific experiences: reversal of maternal deprivation effects by additional postnatal tactile stimulation or chronic imipramine treatment. *Behav. Brain Res.*, **133**, 149–158 (2002).
12. Weaver S.A., Diorio J., Meaney M.J. Maternal separation leads to persistent reductions in pain sensitivity in female rats. *J. Pain*, **8**, 962–969 (2007).
13. Niwa M., Matsumoto Y., Mouri A., Ozaki N., Nabeshima T. Vulnerability in early life to changes in the rearing environment plays a crucial role in the aetiopathology of psychiatric disorders. *Int.*

- J. Neuropsychopharmacol.*, **14**, 459–477 (2011).
14. Berton O., McClung C.A., Dileone R.J., Krishnan V., Renthal W., Russo S.J., Graham D., Tsankova N.M., Bolanos C.A., Rios M., Monteggia L.M., Self D.W., Nestler E.J. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress. *Science*, **311**, 864–868 (2006).
 15. Nakamoto K., Nishinaka T., Sato N., Mankura M., Koyama Y., Kasuya F., Tokuyama S. Hypothalamic GPR40 signaling activated by free long chain fatty acids suppresses CFA-induced inflammatory chronic pain. *PLoS One*, **8**, e81563 (2013).
 16. Seltzer Z., Dubner R., Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain*, **43**, 205–218 (1990).
 17. Millstein R.A., Holmes A. Effects of repeated maternal separation on anxiety- and depression-related phenotypes in different mouse strains. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **31**, 3–17 (2007).
 18. Savignac H.M., Dinan T.G., Cryan J.F. Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front. Behav. Neurosci.*, **5**, 13 (2011).
 19. Kundakovic M., Lim S., Gudsnuk K., Champagne F.A. Sex-specific and strain-dependent effects of early life adversity on behavioral and epigenetic outcomes. *Front. psychiatry*, **4**, 78 (2013).
 20. George E.D., Bordner K.A., Elwafi H.M., Simen A.A. Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neurosci.*, **11**, 123 (2010).
 21. O’Leary T.P., Gunn R.K., Brown R.E. What are we measuring when we test strain differences in anxiety in mice? *Behav. Genet.*, **43**, 34–50 (2013).
 22. Ramos A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? *Trends Pharmacol. Sci.*, **29**, 493–498 (2008).
 23. Burke N.N., Llorente R., Marco E.M., Tong K., Finn D.P., Viveros M.P., Roche M. Maternal deprivation is associated with sex-dependent alterations in nociceptive behavior and neuroinflammatory mediators in the rat following peripheral nerve injury. *J. Pain*, **14**, 1173–1184 (2013).
 24. Kalinichev M., Easterling K.W., Holtzman S.G. Early neonatal experience of Long-Evans rats results in long-lasting changes in morphine tolerance and dependence. *Psychopharmacology (Berl.)*, **157**, 305–312 (2001).
 25. Uhelski M.L., Fuchs P.N. Maternal separation stress leads to enhanced emotional responses to noxious stimuli in adult rats. *Behav. Brain Res.*, **212**, 208–212 (2010).
 26. d’Amore A., Mazzucchelli A., Loizzo A. Long-term changes induced by neonatal handling in the nociceptive threshold and body weight in mice. *Physiol. Behav.*, **57**, 1195–1197 (1995).

27. Clausning P., Mothes H.K., Opitz B., Kormann S. Differential effects of communal rearing and preweaning handling on open-field behavior and hot-plate latencies in mice. *Behav. Brain Res.*, **82**, 179–184 (1997).
28. Fitzgerald M. The development of nociceptive circuits. *Nat. Rev. Neurosci.*, **6**, 507–520 (2005).
29. Koltzenburg M., Wall P.D., McMahon S.B. Does the right side know what the left is doing? *Trends Neurosci.*, **22**, 122–127 (1999).
30. Schepers R.J., Mahoney J.L., Gehrke B.J., Shippenberg T.S. Endogenous kappa-opioid receptor systems inhibit hyperalgesia associated with localized peripheral inflammation. *Pain*, **138**, 423–439 (2008).
31. Descalzi G., Fukushima H., Suzuki A., Kida S., Zhuo M. Genetic enhancement of neuropathic and inflammatory pain by forebrain upregulation of CREB-mediated transcription. *Mol. Pain*, **8**, 90 (2012).
32. Alexander J.K., DeVries A.C., Kigerl K.A., Dahlman J.M., Popovich P.G. Stress exacerbates neuropathic pain via glucocorticoid and NMDA receptor activation. *Brain. Behav. Immun.*, **23**, 851–860 (2009).
33. Schloesser R.J., Martinowich K., Manji H.K. Mood-stabilizing drugs: mechanisms of action. *Trends Neurosci.*, **35**, 36–46 (2012).
34. Bushnell M.C., Ceko M., Low L.A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci.*, **14**, 502–511 (2013).
35. Uchida S., Hara K., Kobayashi A., Funato H., Hobara T., Otsuki K., Yamagata H., McEwen B.S., Watanabe Y. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.*, **30**, 15007–15018 (2010).
36. Stevenson C.W., Marsden C.A., Mason R. Early life stress causes FG-7142-induced corticolimbic dysfunction in adulthood. *Brain Res.*, **1193**, 43–50 (2008).
37. Krishnan V., Han M.-H., Graham D.L., Berton O., Renthal W., Russo S.J., Laplant Q., Graham A., Lutter M., Lagace D.C., Ghose S., Reister R., Tannous P., Green T.A., Neve R.L., Chakravarty S., Kumar A., Eisch A.J., Self D.W., Lee F.S., Tamminga C.A., Cooper D.C., Gershenfeld H.K., Nestler E.J. Molecular adaptations underlying susceptibility and resistance to social defeat in brain reward regions. *Cell*, **131**, 391–404 (2007).
38. Taylor A.M.W., Murphy N.P., Evans C.J., Cahill C.M. Correlation between ventral striatal catecholamine content and nociceptive thresholds in neuropathic mice. *J. Pain*, **15**, 878–885 (2014).

39. Zeng Q., Wang S., Lim G., Yang L., Mao J., Sung B., Chang Y., Lim J.-A., Guo G., Mao J. Exacerbated mechanical allodynia in rats with depression-like behavior. *Brain Res.*, **1200**, 27–38 (2008).
40. Burke N.N., Hayes E., Calpin P., Kerr D.M., Moriarty O., Finn D.P., Roche M. Enhanced nociceptive responding in two rat models of depression is associated with alterations in monoamine levels in discrete brain regions. *Neuroscience*, **171**, 1300–1313 (2010).
41. Narita M., Kaneko C., Miyoshi K., Nagumo Y., Kuzumaki N., Nakajima M., Nanjo K., Matsuzawa K., Yamazaki M., Suzuki T. Chronic pain induces anxiety with concomitant changes in opioidergic function in the amygdala. *Neuropsychopharmacology*, **31**, 739–750 (2006).
42. Narita M., Kuzumaki N., Narita M., Kaneko C., Hareyama N., Miyatake M., Shindo K., Miyoshi K., Nakajima M., Nagumo Y., Sato F., Wachi H., Seyama Y., Suzuki T. Chronic pain-induced emotional dysfunction is associated with astrogliosis due to cortical delta-opioid receptor dysfunction. *J. Neurochem.*, **97**, 1369–1378 (2006).
43. Gormsen L., Rosenberg R., Bach F.W., Jensen T.S. Depression, anxiety, health-related quality of life and pain in patients with chronic fibromyalgia and neuropathic pain. *Eur. J. Pain*, **14**, 127.e1–8 (2010).
44. Cardoso-Cruz H., Dourado M., Monteiro C., Matos M.R., Galhardo V. Activation of dopaminergic D2/D3 receptors modulates dorsoventral connectivity in the hippocampus and reverses the impairment of working memory after nerve injury. *J. Neurosci.*, **34**, 5861–5873 (2014).
45. Yalcin I., Barthas F., Barrot M. Emotional consequences of neuropathic pain: insight from preclinical studies. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **47**, 154–164 (2014).
46. Gonçalves L., Silva R., Pinto-Ribeiro F., Pêgo J.M., Bessa J.M., Pertovaara A., Sousa N., Almeida A. Neuropathic pain is associated with depressive behaviour and induces neuroplasticity in the amygdala of the rat. *Exp. Neurol.*, **213**, 48–56 (2008).
47. Goffer Y., Xu D., Eberle S.E., D'amour J., Lee M., Tukey D., Froemke R.C., Ziff E.B., Wang J. Calcium-permeable AMPA receptors in the nucleus accumbens regulate depression-like behaviors in the chronic neuropathic pain state. *J. Neurosci.*, **33**, 19034–19044 (2013).
48. Baudin A., Blot K., Verney C., Estevez L., Santamaria J., Gressens P., Giros B., Otani S., Daugé V., Naudon L. Maternal deprivation induces deficits in temporal memory and cognitive flexibility and exaggerates synaptic plasticity in the rat medial prefrontal cortex. *Neurobiol. Learn. Mem.*, **98**, 207–214 (2012).
49. Jahng J.W., Ryu V., Yoo S.B., Noh S.J., Kim J.Y., Lee J.H. Mesolimbic dopaminergic activity

- responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience*, **171**, 144–152 (2010).
50. Rentesi G., Antoniou K., Marselos M., Syrrou M., Papadopoulou-Daifoti Z., Konstandi M. Early maternal deprivation-induced modifications in the neurobiological, neurochemical and behavioral profile of adult rats. *Behav. Brain Res.*, **244**, 29–37 (2013).
 51. Leal G., Comprido D., Duarte C.B. BDNF-induced local protein synthesis and synaptic plasticity. *Neuropharmacology*, **76**, 639–56 (2014).
 52. Guilloux J.P., Douillard-Guilloux G., Kota R., Wang X., Gardier A.M., Martinowich K., Tseng G.C., Lewis D.A., Sibille E. Molecular evidence for BDNF- and GABA-related dysfunctions in the amygdala of female subjects with major depression. *Mol. Psychiatry*, **17**, 1130–1142 (2012).
 53. Duman R.S. Role of neurotrophic factors in the etiology and treatment of mood disorders. *Neuromolecular Med.*, **5**, 11–25 (2004).
 54. Kikusui T., Ichikawa S., Mori Y. Maternal deprivation by early weaning increases corticosterone and decreases hippocampal BDNF and neurogenesis in mice. *Psychoneuroendocrinology*, **34**, 762–772 (2009).
 55. Thibault K., Lin W.K., Rancillac A., Fan M., Snollaerts T., Sordollet V., Hamon M., Smith G.M., Lenkei Z., Pezet S. BDNF-dependent plasticity induced by peripheral inflammation in the primary sensory and the cingulate cortex triggers cold allodynia and reveals a major role for endogenous BDNF as a tuner of the affective aspect of pain. *J. Neurosci.*, **34**, 14739–14751 (2014).
 56. Franklin K.B.J., Paxinos G. *The mouse brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press **2nd**, (Academic Press, 2004).
 57. Yalcin I., Bohren Y., Waltisperger E., Sage-Ciocca D., Yin J.C., Freund-Mercier M.-J., Barrot M. A time-dependent history of mood disorders in a murine model of neuropathic pain. *Biol. Psychiatry*, **70**, 946–953 (2011).
 58. Norman G.J., Karelina K., Morris J.S., Zhang N., Cochran M., Courtney DeVries A. Social interaction prevents the development of depressive-like behavior post nerve injury in mice: a potential role for oxytocin. *Psychosom. Med.*, **72**, 519–526 (2010).
 59. Norman G.J., Karelina K., Zhang N., Walton J.C., Morris J.S., Devries A.C. Stress and IL-1 β contribute to the development of depressive-like behavior following peripheral nerve injury. *Mol. Psychiatry*, **15**, 404–414 (2010).
 60. Tsang A., Von Korff M., Lee S., Alonso J., Karam E., Angermeyer M.C., Borges G.L.G., Bromet E.J., Demyttenaere K., de Girolamo G., de Graaf R., Gureje O., Lepine J.P., Haro J.M., Levinson

- D., Oakley Browne M. a, Posada-Villa J., Seedat S., Watanabe M. Common chronic pain conditions in developed and developing countries: gender and age differences and comorbidity with depression-anxiety disorders. *J. Pain*, **9**, 883–891 (2008).
61. Jiang C., Salton S.R. The Role of Neurotrophins in Major Depressive Disorder. *Transl. Neurosci.*, **4**, 46–58 (2013).
 62. Roceri M., Cirulli F., Pessina C., Peretto P., Racagni G., Riva M.A. Postnatal repeated maternal deprivation produces age-dependent changes of brain-derived neurotrophic factor expression in selected rat brain regions. *Biol. Psychiatry*, **55**, 708–714 (2004).
 63. Hill R.A., Klug M., Kiss Von Soly S., Binder M.D., Hannan A.J., van den Buuse M. Sex-specific disruptions in spatial memory and anhedonia in a “two hit” rat model correspond with alterations in hippocampal brain-derived neurotrophic factor expression and signaling. *Hippocampus*, **24**, 1197–1211 (2014).
 64. Al-Amin H., Sarkis R., Atweh S., Jabbur S., Saadé N. Chronic dizocilpine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. *Exp. Neurol.*, **228**, 30–40 (2011).
 65. Fukuhara K., Ishikawa K., Yasuda S., Kishishita Y., Kim H.-K., Kakeda T., Yamamoto M., Norii T., Ishikawa T. Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Cell. Mol. Neurobiol.*, **32**, 971–977 (2012).
 66. Snyder J.S., Soumier A., Brewer M., Pickel J., Cameron H.A. Adult hippocampal neurogenesis buffers stress responses and depressive behaviour. *Nature*, **476**, 458–461 (2011).
 67. Li Y., Luikart B.W., Birnbaum S., Chen J., Kwon C.H., Kernie S.G., Bassel-Duby R., Parada L.F. TrkB regulates hippocampal neurogenesis and governs sensitivity to antidepressive treatment. *Neuron*, **59**, 399–412 (2008).
 68. Nibuya M., Nestler E.J., Duman R.S. Chronic antidepressant administration increases the expression of cAMP response element binding protein (CREB) in rat hippocampus. *J. Neurosci.*, **16**, 2365–2372 (1996).
 69. Toth E., Gersner R., Wilf-Yarkoni A., Raizel H., Dar D.E., Richter-Levin G., Levit O., Zangen A. Age-dependent effects of chronic stress on brain plasticity and depressive behavior. *J. Neurochem.*, **107**, 522–532 (2008).
 70. Taliaz D., Loya A., Gersner R., Haramati S., Chen A., Zangen A. Resilience to chronic stress is mediated by hippocampal brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurosci.*, **31**, 4475–4483 (2011).
 71. Baydyuk M., Xie Y., Tessarollo L., Xu B. Midbrain-derived neurotrophins support survival of

- immature striatal projection neurons. *J. Neurosci.*, **33**, 3363–3369 (2013).
72. Woolf C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. *Pain*, **152**, S2–15 (2011).
 73. Koga K., Descalzi G., Chen T., Ko H.G., Lu J., Li S., Son J., Kim T., Kwak C., Haganir R.L., Zhao M., Kaang B.K., Collingridge G.L., Zhuo M. Coexistence of Two Forms of LTP in ACC Provides a Synaptic Mechanism for the Interactions between Anxiety and Chronic Pain. *Neuron*, **85**, 377–389 (2014).
 74. Hubbard C.S., Khan S.A., Xu S., Cha M., Masri R., Seminowicz D.A. Behavioral, metabolic and functional brain changes in a rat model of chronic neuropathic pain: a longitudinal MRI study. *Neuroimage*, **107**, 333–344 (2015).
 75. Santello M., Nevian T. Dysfunction of cortical dendritic integration in neuropathic pain reversed by serotonergic neuromodulation. *Neuron*, **86**, 233–246 (2015).
 76. Gao Y.J., Ji R.R. c-Fos and pERK, which is a better marker for neuronal activation and central sensitization after noxious stimulation and tissue injury? *Open Pain J.*, **2**, 11–17 (2009).
 77. Gao Y.J., Ji R.R. Light touch induces ERK activation in superficial dorsal horn neurons after inflammation: involvement of spinal astrocytes and JNK signaling in touch-evoked central sensitization and mechanical allodynia. *J. Neurochem.*, **115**, 505–514 (2010).
 78. Devoize L., Alvarez P., Monconduit L., Dallel R. Representation of dynamic mechanical allodynia in the ventral medial prefrontal cortex of trigeminal neuropathic rats. *Eur. J. Pain*, **15**, 676–682 (2011).
 79. Wei F., Zhuo M. Activation of Erk in the anterior cingulate cortex during the induction and expression of chronic pain. *Mol. Pain*, **4**, 28 (2008).
 80. Yashiro K., Philpot B.D. Regulation of NMDA receptor subunit expression and its implications for LTD, LTP, and metaplasticity. *Neuropharmacology*, **55**, 1081–1094 (2008).
 81. Wu L.J. Upregulation of Forebrain NMDA NR2B Receptors Contributes to Behavioral Sensitization after Inflammation. *J. Neurosci.*, **25**, 11107–11116 (2005).
 82. Roceri M., Hendriks W., Racagni G., Ellenbroek B.A., Riva M.A. Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Mol. Psychiatry*, **7**, 609–616 (2002).
 83. Tassin T.C., Benavides D.R., Plattner F., Nishi A., Bibb J.A. Regulation of ERK Kinase by MEK1 Kinase Inhibition in the Brain. *J. Biol. Chem.*, **290**, 16319–16329 (2015).
 84. Yoon D.H., Yoon S., Kim D., Kim H., Baik J.H. Regulation of dopamine D2 receptor-mediated extracellular signal-regulated kinase signaling and spine formation by GABAA receptors in

- hippocampal neurons. *Neurosci. Lett.*, **586**, 24–30 (2015).
85. David O., Barrera I., Chinnakkaruppan A., Kaphzan H., Nakazawa T., Yamamoto T., Rosenblum K. Dopamine-induced tyrosine phosphorylation of NR2B (Tyr1472) is essential for ERK1/2 activation and processing of novel taste information. *Front. Mol. Neurosci.*, **7**, 66 (2014).
 86. Madabhushi R., Gao F., Pfenning A.R., Pan L., Yamakawa S., Seo J., Rueda R., Phan T.X., Yamakawa H., Pao P.C., Stott R.T., Gjoneska E., Nott A., Cho S., Kellis M., Tsai L.H. Activity-Induced DNA Breaks Govern the Expression of Neuronal Early-Response Genes. *Cell*, **161**, 1592–1605 (2015).
 87. Ji R.R., Baba H., Brenner G.J., Woolf C.J. Nociceptive-specific activation of ERK in spinal neurons contributes to pain hypersensitivity. *Nat. Neurosci.*, **2**, 1114–1119 (1999).
 88. Presley R.W., Menétrey D., Levine J.D., Basbaum A.I. Systemic morphine suppresses noxious stimulus-evoked Fos protein-like immunoreactivity in the rat spinal cord. *J. Neurosci.*, **10**, 323–35 (1990).
 89. Park H.J., Kim S.K., Kang W.S., Chung J.H., Kim J.W. Increased activation of synapsin 1 and mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinase in the amygdala of maternal separation rats. *CNS Neurosci. Ther.*, **20**, 172–181 (2014).
 90. Horii-Hayashi N., Sasagawa T., Matsunaga W., Matsusue Y., Azuma C., Nishi M. Developmental changes in desensitisation of c-Fos expression induced by repeated maternal separation in pre-weaned mice. *J. Neuroendocrinol.*, **25**, 158–167 (2013).
 91. Wei F., Wang G.D., Kerchner G.A., Kim S.J., Xu H.M., Chen Z.F., Zhuo M. Genetic enhancement of inflammatory pain by forebrain NR2B overexpression. *Nat. Neurosci.*, **4**, 164–169 (2001).
 92. Ossipov M.H., Dussor G.O., Porreca F. Central modulation of pain. *J. Clin. Invest.*, **120**, 3779–3787 (2010).
 93. Neugebauer V., Galhardo V., Maione S., Mackey S.C. Forebrain pain mechanisms. *Brain Res. Rev.*, **60**, 226–242 (2009).
 94. Asede D., Bosch D., Lüthi A., Ferraguti F., Ehrlich I. Sensory Inputs to Intercalated Cells Provide Fear-Learning Modulated Inhibition to the Basolateral Amygdala. *Neuron*, **86**, 541–554 (2015).
 95. Tye K.M., Prakash R., Kim S.Y., Fenno L.E., Grosenick L., Zarabi H., Thompson K.R., Gradinaru V., Ramakrishnan C., Deisseroth K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. *Nature*, **471**, 358–362 (2011).
 96. Carrasquillo Y., Gereau R.W. Hemispheric lateralization of a molecular signal for pain modulation in the amygdala. *Mol. Pain*, **4**, 24 (2008).

97. Carrasquillo Y., Gereau R.W. Activation of the extracellular signal-regulated kinase in the amygdala modulates pain perception. *J. Neurosci.*, **27**, 1543–1551 (2007).
98. Bonfiglio J.J., Inda C., Refojo D., Holsboer F., Arzt E., Silberstein S. The corticotropin-releasing hormone network and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: molecular and cellular mechanisms involved. *Neuroendocrinology*, **94**, 12–20 (2011).
99. Metz A.E., Yau H.J., Centeno M.V., Apkarian V., Martina M. Morphological and functional reorganization of rat medial prefrontal cortex in neuropathic pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **106**, 2423–2428 (2009).
100. Lee M., Manders T.R., Eberle S.E., Su X.C., James D., Yang X.R., Lin H.Y., Deisseroth K., Froemke R.C., Wang X.J. Activation of Corticostriatal Circuitry Relieves Chronic Neuropathic Pain. *J. Neurosci.*, **35**, 5247–5259 (2015).
101. Wang G.Q., Cen C., Li C., Cao S., Wang N., Zhou Z., Liu X.M., Xu Y., Tian N.X., Zhang Y., Wang J., Wang L.P., Wang Y. Deactivation of excitatory neurons in the prelimbic cortex via Cdk5 promotes pain sensation and anxiety. *Nat. Commun.*, **6**, 7660 (2015).
102. Zhang Z., Gadotti V.M., Chen L., Souza I.A., Stemkowski P.L., Zamponi G.W. Role of Prelimbic GABAergic Circuits in Sensory and Emotional Aspects of Neuropathic Pain. *Cell Rep.*, **12**, 752–759 (2015).
103. Schwartz N., Temkin P., Jurado S., Lim B.K., Heifets B.D., Polepalli J.S., Malenka R.C. Chronic pain. Decreased motivation during chronic pain requires long-term depression in the nucleus accumbens. *Science*, **345**, 535–542 (2014).
104. Akashi K., Kakizaki T., Kamiya H., Fukaya M., Yamasaki M., Abe M., Natsume R., Watanabe M., Sakimura K. NMDA receptor GluN2B (GluR epsilon 2/NR2B) subunit is crucial for channel function, postsynaptic macromolecular organization, and actin cytoskeleton at hippocampal CA3 synapses. *J. Neurosci.*, **29**, 10869–10882 (2009).
105. Li X.Y., Ko H.G., Chen T., Descalzi G., Koga K., Wang H., Kim S.S., Shang Y., Kwak C., Park S.-W., Shim J., Lee K., Collingridge G.L., Kaang B.K., Zhuo M. Alleviating neuropathic pain hypersensitivity by inhibiting PKMzeta in the anterior cingulate cortex. *Science*, **330**, 1400–1404 (2010).
106. Liu X.B., Murray K.D., Jones E.G. Switching of NMDA receptor 2A and 2B subunits at thalamic and cortical synapses during early postnatal development. *J. Neurosci.*, **24**, 8885–8895 (2004).
107. Rodenas-Ruano A., Chávez A.E., Cossio M.J., Castillo P.E., Zukin R.S. REST-dependent epigenetic remodeling promotes the developmental switch in synaptic NMDA receptors. *Nat. Neurosci.*, **15**, 1382–1390 (2012).

108. Potvin S., Grignon S., Marchand S. Human evidence of a supra-spinal modulating role of dopamine on pain perception. *Synapse*, **63**, 390–402 (2009).
109. Wood P.B. Role of central dopamine in pain and analgesia. *Expert Rev. Neurother.*, **8**, 781–797 (2008).
110. Wei H., Viisanen H., Pertovaara A. Descending modulation of neuropathic hypersensitivity by dopamine D2 receptors in or adjacent to the hypothalamic A11 cell group. *Pharmacol. Res.*, **59**, 355–363 (2009).
111. Dang Y.H., Zhao Y., Xing B., Zhao X.J., Huo F.Q., Tang J.S., Qu C.L., Chen T. The role of dopamine receptors in ventrolateral orbital cortex-evoked anti-nociception in a rat model of neuropathic pain. *Neuroscience*, **169**, 1872–1880 (2010).
112. Cobacho N., de la Calle J.L., Paíno C.L. Dopaminergic modulation of neuropathic pain: analgesia in rats by a D2-type receptor agonist. *Brain Res. Bull.*, **106**, 62–71 (2014).
113. Martikainen I.K., Nuechterlein E.B., Peciña M., Love T.M., Cummiford C.M., Green C.R., Stohler C.S., Zubieta J.K. Chronic Back Pain Is Associated with Alterations in Dopamine Neurotransmission in the Ventral Striatum. *J. Neurosci.*, **35**, 9957–9965 (2015).
114. Wood P.B., Schweinhardt P., Jaeger E., Dagher A., Hakyemez H., Rabiner E.A., Bushnell M.C., Chizh B.A. Fibromyalgia patients show an abnormal dopamine response to pain. *Eur. J. Neurosci.*, **25**, 3576–3582 (2007).
115. Saadé N.E., Atweh S.F., Bahuth N.B., Jabbur S.J. Augmentation of nociceptive reflexes and chronic deafferentation pain by chemical lesions of either dopaminergic terminals or midbrain dopaminergic neurons. *Brain Res.*, **751**, 1–12 (1997).

主論文

1. Nishinaka T., Nakamoto K., Tokuyama S., Enhancement of nerve-injury-induced thermal and mechanical hypersensitivity in adult male and female mice following early life stress. *Life Sci.*, 121, 28-34 (2015).
2. Nishinaka T., Kinoshita M., Nakamoto K., Tokuyama S., Sex differences in depression-like behavior after nerve injury are associated with differential changes in brain-derived neurotrophic factor levels in mice subjected to early life stress. *Neurosci. Lett.*, 592, 32-36 (2015).
3. Nishinaka T., Nakamoto K., Tokuyama S., Early life stress induces sex-dependent increases in phosphorylated extracellular signal-regulated kinase in brains of mice with neuropathic pain. *Eur. J. Pain*, in press