

氏 名 みやはら けんいちろう  
宮原 謙一郎

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富生命博甲第 140 号

学位授与年月日 令和 4 年 3 月 23 日

学位授与の要件 富山大学学位規則第 3 条第 3 項該当

教育部名 富山大学大学院生命融合科学教育部 博士課程  
認知・情動脳科学専攻

学位論文題目

Involvement of parvalbumin-positive neurons in the development of  
hyperalgesia in a mouse model of fibromyalgia

(線維筋痛症モデルマウスにおける痛覚過敏に脳内パルブアルブミン  
陽性ニューロンが関与する)

論文審査委員

(主査) 教授 笹原 正清

(副査) 教授 山崎 光章

(副査) 教授 森 寿

(副査) 教授 中辻 裕司

(指導教員) 教授 西条 寿夫

論 文 要 旨

論 文 題 目

**Involvement of parvalbumin-positive neurons in the development of  
hyperalgesia in a mouse model of fibromyalgia**

(線維筋痛症モデルマウスにおける痛覚過敏に  
脳内パルブアルブミン陽性ニューロンが関与する)

氏 名 宮原 謙一郎

備考 ① 論文要旨は、2,000字程度とする。

② A4判とする。

## 〔目的〕

線維筋痛症（FM）は、全身性自発痛や痛覚過敏とともにうつなどの精神症状を伴う、発症メカニズムの不明な難治性疾患であり、日本国内には約200万人の患者がいると推察されている。これまでの機能的磁気共鳴画像法（fMRI）を用いた研究により、FM患者では一次体性感覚野（S1）を含む脳の痛覚情報処理系の活動が亢進していることが報告されている。また神経生理学的研究により、S1におけるガンマオシレーションが痛み刺激の物理的強度や主観的痛み強度に相関し、さらにFM患者において同領域のガンマオシレーションが亢進していることが報告されている。ガンマオシレーション誘発には、GABA作動性介在ニューロン的一种であるパルブアルブミン（PV）陽性ニューロンが重要な役割を果たしている。一方、FM患者では脳脊髄液におけるカテコールアミン代謝産物が減少していることから、レセルピンの反復投与による動物モデルが考案されている。以上から本研究では、痛覚情報処理におけるPV陽性ニューロンの役割を明らかにするため、レセルピンの反復投与によりFMのマウスモデルを作製し、脳の痛覚情報処理系におけるPV陽性ニューロン数と痛覚回避行動との関係を解析した。

## 〔方法〕

### 1. 動物

8～10週齢のC57BL/6J雄性マウス（n = 60）を使用した。全実験期間を通じて食物と水を自由に摂取可能にした。

### 2. レセルピン誘発性疼痛モデル

0.5%酢酸溶液に希釈したレセルピン（ $0.25 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ ）を1日1回、3日間連続して背部の皮下に注射した（RES群）。コントロールは、同様にvehicle溶液（0.5%酢酸溶液）を注射した（VEH群）。

### 3. 行動実験

#### 1) ホットプレートテスト

初回投与から3日後に、ホットプレート装置により熱痛覚過敏を評価した。摂氏50度に加熱したホットプレート上にマウスを置き、後足を舂めるかジャンプを行う反応潜時（どちらか早い方）とジャンプ数を測定した。

#### 2) 強制水泳テスト

抑うつ行動を評価するために、2群のマウスを用いてそれぞれ3-4日目および10-11日目に強制水泳テストを行った。初回（初回レセルピン注射から3または10日目）に15分間強制水泳させ、24時間後（4日目と11日目）に5分間強制水泳を行わせてビデオカメラで撮影し不動時間を計測した。

### 4. 免疫組織化学的解析

初回投与から3日目に実施したホットプレートテストを終了後、灌流してから脳を取り出し、PV抗体を用いてS1（前肢領域、後肢領域）、内側前頭前皮質（前辺縁皮質、下辺縁皮質、前部帯状回）、扁桃核（外側核、基底外側核、介在細胞部）、および島皮質（顆粒皮質、亜顆粒皮質、無顆粒皮質）のPV陽性ニューロンを染色した。染色後、各領域における同ニューロン密度をステレオロジー法にて解析した。

#### 〔結果〕

##### 1. 体重変化

レセルピン投与群（RES群）は、初回注射から3～5日目において、VEH群よりも平均体重が有意に減少した。

##### 2. 行動実験

###### 1) ホットプレートテスト

侵害刺激に対する反応潜時は、RES群ではVEH群と比較して有意に短縮した。ジャンプ数は、RES群がVEH群よりも有意に高値を示した。

###### 2) 強制水泳テスト

初回投与から4日目の不動時間は、RES群ではVEH群と比較して増加傾向を示した。11日目の不動時間は、RES群ではVEH群と比較して有意に増大した。

##### 3. 免疫組織化学的解析

S1の前肢、後肢、および肢領域（前肢と後肢の平均値）におけるPV陽性ニューロン密度は、RES群ではVEH群と比較して有意に増加した。その他の脳領域では、両群間に有意差は認められなかった。

##### 4. 相関解析

ホットプレートの侵害受容性熱刺激に対する反応潜時は、S1の前肢、後肢、および肢領域におけるPV陽性ニューロンの密度と有意な負相関を示した。他の脳領域においては、両者間に有意な相関が認められなかった。

#### 〔総括〕

本研究では、レセルピン投与マウス（RES群）は、一過性の体重減少を示し、強制水泳テストでは不動時間が延長した。ホットプレートテストでは、RES群はVEH群よりも侵害受容性熱刺激に対する応答潜時が短縮し、ジャンプ反応の数が増加した。以上から、本研究においてFM患者の特徴的な症状（食思不振、うつ状態、および痛覚過敏）が再現され、FM動物モデルが作製されたと考えられた。

レセルピンの反復投与によりS1のPV陽性ニューロン密度が増加し、そのPV陽性ニューロン密度とホットプレートテストにおける侵害受容性熱刺激に対する反応潜時の間

に負相関が認められた。以前の研究により、S1のPV陽性ニューロンを光遺伝学的に賦活すると、ガンマオシレーションを誘発するとともに侵害受容刺激に対する感受性が増大し、さらに、下行性痛覚修飾系である延髄吻側腹外側野の活動が増大することが報告されている。下行性痛覚修飾系から脊髄後角への線維のうち痛覚抑制性および亢進性の線維はそれぞれセロトニン性および非セロトニン性であることから、レセルピン存在下では痛覚抑制性の下行性線維の活動が相対的に低下することが示唆される。本研究結果およびこれらの所見から、S1のPV陽性ニューロンの活動亢進によりS1におけるガンマオシレーションが増大するとともに脊髄後角における痛覚情報処理が亢進することにより、痛覚過敏が起こることが示唆された。

## 学位論文審査の要旨

報告番号	富生命博甲第 号 富生命博乙第 号	氏 名	宮原 謙一郎
論文審査委員	職 名	氏 名	
	(主査) 教授	笹原 正清	
	(副査) 教授	森 寿	
	(副査) 教授	山崎 光章	
	(副査) 教授	中辻 裕司	
指導教員	教授	西条 寿夫	
(論文題目)	<b>Involvement of parvalbumin-positive neurons in the development of hyperalgesia in a mouse model of fibromyalgia</b> (線維筋痛症モデルマウスにおける痛覚過敏に脳内パルブアルブミン陽性ニューロンが関与する)		(判定) 合格
(論文審査の要旨)	<p>〔目的〕</p> <p>線維筋痛症 (FM) は、全身性自発痛や痛覚過敏とともにうつなどの精神症状を伴う、発症メカニズムの不明な難治性疾患であり、日本国内には約 200 万人の患者がいると推察されている。FM の病態として中枢性感作 (痛覚情報処理の亢進) が示唆されているものの、その実体は不明である。これまでの研究により、FM 患者では一次体性感覚野 (S1) を含む脳の痛覚情報処理系の活動が亢進していることや、S1 野のガンマオシレーションが亢進していることなどが報告されている。一方、ガンマオシレーション誘発には、GABA 作動性ニューロンの一種であるパルブアルブミン (PV) 陽性ニューロンが重要な役割を果たしている。以上から本研究では、痛覚情報処理における PV 陽性ニューロンの役割を明らかにするため、レセルピンの反復投与により FM のマウスモデルを作製し、脳の痛覚情報処理系における PV 陽性ニューロン数と痛覚回避行動との関係を解析した。</p> <p>〔方法〕</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>レセルピン誘発性疼痛モデルの作製          雄性マウスを使用し、レセルピン (0.25 mg/mL/kg) を 1 日 1 回、3 日間連続して注射した (RES 群)。コントロールは、同様に vehicle 溶液 (0.5% 酢酸溶液) を注射した (VEH 群)。</li> <li>行動実験          初回投与から 3 日後に、ホットプレートテストにより熱痛覚刺激を呈示し、後足を舂めるかジャンプを行う反応潜時 (どちらか早い方) とジャンプ数を測定した。また、抑うつ行動を評価するために、3-4 日目および 10-11 日目に強制水泳テストを行った。初回レセルピン注射から 3 または 10 日目に馴化のために 15 分間強制水泳させ、それぞれの 24 時間後 (4 日目と 11 日目) に 5 分間強制水泳を行わせて不動時間を計測した。</li> <li>免疫組織化学的解析          初回投与から 3 日目に実施したホットプレートテストを終了後、S1 (前肢領域、後肢領域)、</li> </ol>		

内側前頭前皮質(前辺縁皮質、下辺縁皮質、前部帯状回)、扁桃核(外側核、基底外側核、介在細胞部)、および島皮質(顆粒皮質、垂顆粒皮質、無顆粒皮質)のPV陽性ニューロンを染色した。染色後、各領域における同ニューロン密度をステレオロジー法にて解析した。

〔結果〕

1. 体重変化: レセルピン投与群 (RES 群) は、初回注射から3~5日目において、VEH群よりも平均体重が有意に減少した。
2. 行動実験
  - 1) ホットプレートテスト: 侵害刺激に対する反応潜時は、RES群ではVEH群と比較して有意に短縮した。ジャンプ数は、RES群がVEH群よりも有意に高値を示した。
  - 2) 強制水泳テスト: 初回投与から4日目の不動時間は、RES群ではVEH群と比較して増加傾向を示した。11日目の不動時間は、RES群ではVEH群と比較して有意に増大した。
3. 免疫組織化学的解析: S1野の前肢、後肢、および肢領域(前肢と後肢の平均値)におけるPV陽性ニューロン密度は、RES群ではVEH群と比較して有意に増加した。その他の脳領域では、両群間に有意差は認められなかった。
4. 相関解析: ホットプレートの侵害受容性熱刺激に対する反応潜時は、S1野の前肢、後肢、および肢領域におけるPV陽性ニューロンの密度と有意な負相関を示した。他の脳領域においては、両者間に有意な相関が認められなかった。

〔総括〕

本研究では、レセルピン投与マウス (RES 群) は、一過性の体重減少を示し、強制水泳テストでは不動時間が延長した。ホットプレートテストでは、RES群は侵害受容性熱刺激に対する応答潜時が短縮し、ジャンプ反応の数が増加した。以上から、本研究において繊維筋痛症の特徴的な症状(食思不振、うつ状態、および痛覚過敏)が再現され、動物モデルが作製されたと考えられた。

レセルピンの反復投与によりS1野のPV陽性ニューロン密度が増加し、そのPV陽性ニューロン密度とホットプレートテストにおける侵害受容性熱刺激に対する反応潜時の間に負相関が認められた。以前の研究により、S1野のPV陽性ニューロンを光遺伝学的に賦活すると、ガンマオシレーションを誘発するとともに侵害受容刺激に対する感受性が増大し、さらに、下行性痛覚修飾系である延髄吻側腹外側野の活動が増大することが報告されている。下行性痛覚修飾系から脊髄後角への線維のうち痛覚抑制性および亢進性の線維はそれぞれセロトニン性および非セロトニン性であることから、レセルピン存在下では痛覚抑制性の下行性線維の活動が相対的に低下することが示唆された。本研究結果およびこれらの所見から、S1野のPV陽性ニューロンの活動亢進によりS1におけるガンマオシレーションが増大するとともに脊髄後角における痛覚情報処理が亢進することにより、痛覚過敏が起こることが示唆された。

宮原氏の研究は、モデル動物を用いて、これまで原因不明であった線維筋痛症の中樞性感作の病態としてS1野におけるPV陽性ニューロン密度が増大することを初めて明らかにしたものであり、新規性が高くまた医学における重要性も極めて高いと評価された。また、本研究結果は非侵襲的にS1野を抑制することにより線維筋痛症が緩和しうる可能性を示すものであり、臨床的発展性を有すると判断された。以上から、本審査委員会は本論文を価値の高いものであると評価し、博士(医学)の学位に値するものと判定した。