

氏 名 いとう ひさかつ
伊東 久勝

学位の種類 博士 (医学)

学位記番号 富医薬博甲第 120 号

学位授与年月日 平成 26 年 3 月 21 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 富山大学大学院医学薬学教育部 医学領域 博士課程
生命・臨床医学専攻

学位論文題目 **Analysis of sleep disorders under pain using optogenetic tool:
Effect of activation of dorsal raphe nucleus-serotonergic neuron.
(光遺伝学的手法を用いた疼痛下における背側縫線核-セロトニン神経系の機能変化と睡眠・覚醒に与える影響)**

論文審査委員

(主査)	教授	鈴木 道雄
(副査)	教授	井ノ口 馨
(副査)	教授	森 寿
(副査)	教授	田中耕太郎
(指導教員)	教授	山崎 光章

論文内容の要旨

目的：臨床的に、神経障害性疼痛をはじめとした慢性痛は難治性であり、しばしば睡眠障害を来す。また、過去の疫学研究においても慢性痛は高頻度に睡眠障害を引き起こし、患者の QOL を著しく低下させることが報告されている。しかしながら、慢性痛が睡眠・覚醒サイクルに与える影響についての神経学的機序は不明な点が多い。また、セロトニンは睡眠・覚醒調節を行っている重要な物質と考えられているが、セロトニン神経の中核である背側縫線核が慢性痛によって受ける影響について検討した報告は稀である。そこで、本研究では神経障害性疼痛が睡眠障害を引き起こし、同時に背側縫線核セロトニン神経にどのような影響を与えるかについて検討した。さらに光遺伝学的手法を用いて背側縫線核セロトニン神経を特異的に活性化させることによって、背側縫線核セロトニン神経の機能変化が睡眠・覚醒調節において果たす役割についての検討も行った。

方法：右側後肢大腿部坐骨神経を半周結紮することにより神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、脳波及び筋電図を用いて睡眠・覚醒の評価を行った。また、同モデルを用いて、背側縫線核から前頭前皮質に投射するセロトニン神経の活動性の変化を検討するために、電気刺激を用いて背側縫線核を刺激後、前頭前皮質における神経終末から放出された神経伝達物質を *in vivo* マイクロダイアリシス法を用いて回収し、高速液体クロマトグラフィーを用いて分離した含有セロトニン量を電気化学的検出器により測定した。さらに、光照射により神経細胞の活動を活性化させるチャンネルロドプシン 2(ChR2)を脳内セロトニン神経特異的に発現させた tryptophan hydroxylase-2 (Tph2) - ChR2 トランスジェニックマウスを使用し、背側縫線核セロトニン神経を光照射により活性化した際の睡眠・覚醒の変化を脳波及び筋電図を用いて評価した。

結果：神経障害性疼痛モデルマウスは偽手術群と比較して覚醒時間の増加および non-REM 睡眠時間の減少を認めた。また、背側縫線核から睡眠・覚醒を調整していると考えられる前頭前皮質への神経投射を、逆行性輸送マーカである Fluoro-gold を前頭前皮質へ注入することにより確認した。背側縫線核を電気刺激したところ前頭前皮質におけるセロトニンの遊離量は坐骨神経結紮群において有意に増加した。さらに、Tph2-ChR2 トランスジェニックマウスの背側縫線核において、ChR2 がセロトニン合成酵素である Tph2 に局在していることを免疫組織化学的染色法を用いて確認した。その後、背側縫線核の光刺激により背側縫線核セロトニン神経系を活性化し脳波解析を行ったところ、覚醒時間の増加および non-REM 睡眠時間の減少を認めた。

総括：神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、睡眠障害が生じること、また睡眠・覚醒サイクルに変動が認められ、その一因として背側縫線核セロトニン神経系の活動性の変化が関与していることが明らかとなった。本研究により、臨床的に神経障害性疼痛が睡眠障害を誘発し、さらには背側縫線核のセロトニン神経系に対するアプローチが治療対象となりうるという知見を得た。

学位論文審査の要旨

【目的】

神経障害性疼痛などの慢性痛は難治性であり、高頻度に睡眠障害を引き起こし、患者のQOLを著しく低下させることが報告されている。しかし、慢性痛が睡眠・覚醒サイクルに与える影響についての神経学的機序には不明な点が多い。また、セロトニンは睡眠・覚醒調節に関わる重要な物質と考えられているが、セロトニン神経中枢である背側縫線核(DRN)に、慢性痛がいかなる影響を及ぼすかについて検討した報告はまれである。

本研究で伊東久勝君は、神経障害性疼痛モデルマウスを用いて、神経障害性疼痛が睡眠障害を引き起こす際に、DRNセロトニン神経に変化が生じるかについて検討した。また光遺伝学的手法を用いて、DRNセロトニン神経を特異的に活性化させることによって、DRNセロトニン神経の機能変化が睡眠・覚醒調節において果たす役割についても検討した。

【方法と結果】

右側後肢大腿部坐骨神経を半周結紮することにより神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、坐骨神経を結紮しないで露出させる処置のみを行った偽手術群と比較した。

1) **Plantar test** により熱痛覚過敏反応を、**von Frey test** によりアロディニア反応を評価した。神経障害性疼痛モデルマウスでは、**plantar test** により後肢逃避反応潜時の有意な短縮、**von Frey test** により逃避反応の有意な亢進が認められた。

2) 頭部にヘッドマウント装着手術を行い、硬膜外に固定した電極から脳波を、後頸部筋層に挿入した電極から筋電図を記録し、睡眠・覚醒の評価を行った。神経障害性疼痛モデルマウスでは、覚醒時間の有意な増加と non-REM 睡眠時間の有意な短縮が認められ、睡眠障害が生じていた。

3) 前頭前皮質 (PFC) に逆行性輸送マーカである fluoro-gold をマイクロインジェクションし、DRN から PFC への神経投射の確認を行った。DRN において fluoro-gold の蛍光が確認され、また、セロトニン合成酵素である tryptophan hydroxylase-2 (Tph2) に対する抗体による二重免疫染色により、fluoro-gold と Tph2 の共局在が示された。

4) DRN から PFC に投射するセロトニン神経の活動性の変化を検討するために、DRN を電気刺激後、PFC の神経終末から放出されたセロトニンを *in vivo* マイクロダイアリス法を用いて回収し、高速液体クロマトグラフィーによって測定した。神経障害性疼痛モデルマウスでは、PFC におけるセロトニン遊離量の有意な増加が認められた。

5) さらに、光照射により神経細胞の活動を活性化させるチャネルロドプシン 2 (ChR2) を脳内セロトニン神経特異的に発現させた Tph2-ChR2 トランスジェニックマウスを使用し、DRN セロトニン神経に光照射した際の、PFC のセロトニン量をマイクロダイアリス法により測定し、また睡眠・覚醒の変化を脳波および筋電図を用いて評価した。Tph2-ChR2 トランスジェニックマウスでは、Tph2 と ChR2 の共局在が確認された。Tph2-ChR2 トランスジェニックマウスでは、DRN 光照射時に、非照射時と比較して、PFC におけるセロトニン遊離量の有意な増加が認められた。さらに DRN 光照射時に、非照射時と比較して、覚醒時間の有意な増加と non-REM 睡眠時間の有意な短縮、各 non-REM 睡眠段階の持続時間の有意な短縮、non-REM 睡眠における徐波の有意な減少が認められた。

【総括】

本研究で伊東久勝君は、神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、睡眠障害が生じること、DRN セロトニン神経活動の亢進が生じることを示すとともに、光遺伝学的手法を用いて、DRN セロトニン神経を特異的に刺激することにより睡眠・覚醒サイクルに変化が生じることを明らかにし、神経障害性疼痛による睡眠障害の機序として、DRN セロトニン神経系の

活動性の亢進が関与していることを示唆した。以上のことから、本研究は DRN セロトニン神経の活動を特異的に制御した上で、それが睡眠・覚醒サイクルの調節に重要であることを明らかにした点で新規性がある。また神経障害性疼痛に伴う睡眠障害の機序として、DRN セロトニン神経系の活動性変化を示唆した点で医学における学術的重要性が高く、DRN セロトニン神経活動の制御が慢性痛に伴う睡眠障害の新たな治療標的となる可能性を示した点で臨床的発展が期待できる。

以上より本審査委員会は、本論文を博士（医学）の学位に十分値すると判断した。