

令和元年5月30日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04968

研究課題名(和文) 痛みの慢性化のきっかけとなる脳への細胞分子伝達メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms of cellular and molecular transduction to the brain for trigger of pain chronification

研究代表者

中江 文 (NAKAE, Aya)

大阪大学・生命機能研究科・特任教授(常勤)

研究者番号：60379170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,600,000円

研究成果の概要(和文)：術後遷延性疼痛モデルを開発し、そのタイムコースに応じたサイトカインの変動について分析した結果、疼痛行動の減弱しているKOマウスとWTタイプの間有意差を認めた。

モデルの脳活動の変化は、術後2日目(急性期)と4週後(慢性期)についてマンガン造影MRIで各部位の活動性について有意な差は認められなかったが、その活動パターンは急性期、慢性期ともに手術前とは顕著な差が認められた。

鎮痛薬の薬効の検証では、機械刺激に対する疼痛閾値は投与個体と非投与個体の間で有意な差を認めた。脳内活動パターンは、ブプレノルフィン投与個体は手術前のパターンに近い傾向を呈し、ガバペンチンでは用量間で異なることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「痛み」はヒトの持つ感覚の中でとりわけ不快な感覚であり、特に痛みによる経済損失はガンや心臓病より大きく、最優先で取り組むべき課題である。慢性痛に伴う脳内のネットワーク異常が痛みのメカニズムとして着目されているが、それが原因であるのか結果であるのかの議論はなされておらず、脳のネットワーク異常が起こる仕組みも解明されていない。

本研究では、炎症性疼痛モデルを作成し、マクロファージから放出される液性因子とマクロファージそのものの脳への迷入と脳内ネットワークの変化の関係を明らかにし、高解像MRIで脳内活動パターンを解析することで、痛みの慢性化のきっかけとなる脳への細胞・分子伝達メカニズムを解明した。

研究成果の概要(英文)：We developed a postoperative persistent pain model, and analyzed the variation of cytokines according to the time course. The expression patterns in KO mice with diminished pain related behavior were remarkably different from those of WT.

Changes in the brain activity evaluated using Manganese-Enhanced MRI (MEMRI) in the pain model showed no significant difference in the enhanced level at each region between naïve, acute and chronic stages. However, their patterns of co-enhanced level were significantly different from those before the surgery in both acute and chronic stages.

We evaluated the brain activity by MEMRI using animals that showed significant higher thresholds of mechanical stimulation after administration of analgesics. Brain activity patterns showed that buprenorphine-administered animals displayed resemble pattern of pre-surgery animals. We also confirmed dose dependent patterns when comparing to naïve, low-dose and high-dose gabapentin-administered animals.

研究分野：神経因性疼痛のメカニズムの解明・疼痛認知機構の解明

キーワード：マクロファージ 痛み 術後遷延痛 高解像MRI

1. 研究開始当初の背景

「痛み」は不快な感覚であり、痛みによる経済損失はガン・糖尿病・心臓病を超え、取り組むべき課題であると考えられる (Gaskin et al. J Pain 2012; Vos et al. Lancet 2012)。「痛み」の中でも特に慢性痛は脳の痛み感受性が異常な状態と考えられるが、術後遷延性疼痛のように、何らかの組織損傷をきっかけとする場合が少なくない (Meretoja et al. JAMA 2014)。しかし、末梢における組織損傷の結果、どのようにして、脳内の異常につながるかについての研究は進んでいない。脳内のグリア細胞に代表される免疫担当細胞が、痛みにより活性化され、そのことが何らかの役割を担っていることが患者研究でも明らかになっている (Loggia et al. IASP abstract PH209, 2014)。さらに、脳内のグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトが脳内の神経繊維の方向を変え、神経ネットワークを変更しうることが最近明らかとなった (McKenzie et al. Science 2014)。我々のグループは慢性腰痛患者研究において、脳内のネットワーク解析により健康被験者と慢性腰痛患者の判別が90%以上可能という驚くべき中間結果 (図1)を既に得ており、痛みにおいて脳内ネットワーク異常は今後痛みを理解する上での主たる概念となるものと考えられる。しかし、そのネットワークを変えるきっかけとなる仕組みは明らかでない。

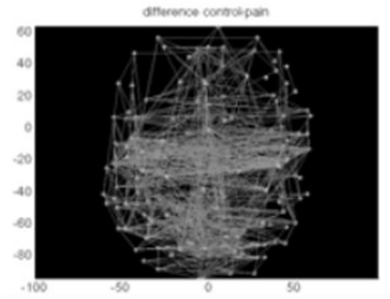


図1 慢性腰痛患者研究におけるネットワーク解析の中間結果

末梢組織から脳へのシグナル伝達の機序は大きく分けると3種類が考えられる (図2)。

- (1) 炎症反応に伴うサイトカインのような、血液を介して脳内に伝達される分子により、元々脳内にあった免疫細胞が活性化される。
- (2) 炎症反応に伴うサイトカインなどの影響を受けるかどうかにかかわらず、末梢にあった免疫担当細胞が脳内に迷入し、炎症性物質を放出する。
- (3) 炎症反応に伴い血液脳関門が破綻することにより、細胞・分子が脳内に入り込み作用する。

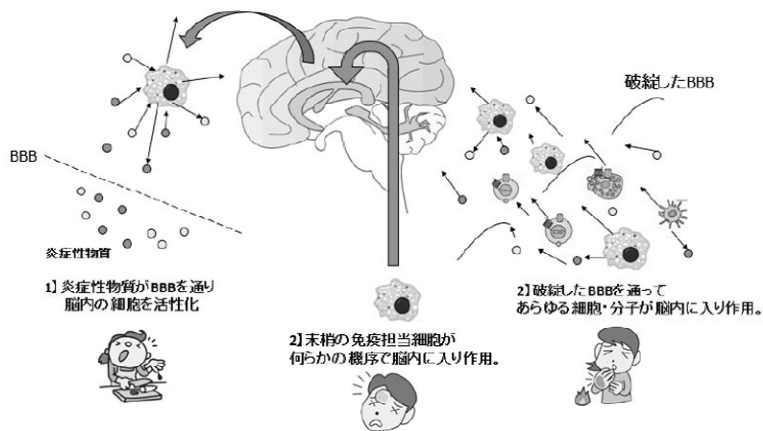


図2 抹消の炎症がどのようにして脳内に伝わるかの仮説

(1) については、神経炎症の末梢での機序について詳細な報告があるが (Dimitris N et al. Nat Rev Neurosci 2014)、その中のどの物質が痛みによる脳内ネットワークの変調に影響を及ぼすか明らかにした報告はない。これまでに MyD 88KO マウスによる研究で、LPS 刺激によりマクロファージからの炎症性サイトカインが全く産生されないこと (Kawai et al. Immunity 1999)、SNL モデル (神経障害性モデル) で疼痛行動が減弱すること (Stokes et al. J NeuroInflam 2013) が明らかになっており、マクロファージからの炎症性サイトカインの放出が何らかの働きを持つことは十分に予想される。

(2) については、我々の共同研究者で今回の研究協力者である吉岡のグループが驚くべき報告を出している。末梢で標識したマクロファージが LPS (エンドトキシン) の少量投与で誘発した全身性炎症の結果、血液脳関門の破綻を来すことなく、脳内に迷入するというものである。これらは我々の施設内に現有する小動物専用 11.7 テスラ MRI を用いた研究により明らかになった (図3)。従来末梢におけるマクロファージの役割を担うものはミクログリアだと言われてきた常識を覆す結果である (Mori Y, Yoshioka Y et al. Sequential and time lapse MRI monitoring of peripheral macrophage recruitment and migration in mouse brain. Proc.Intl Soc Mag Reson Med 2014; 22: 3813)。本研究と同様のメカニズムで脳内に免疫担当細胞が迷入し、それらが痛みの慢性化メカニズムを担う可能性は十分に考えられる。

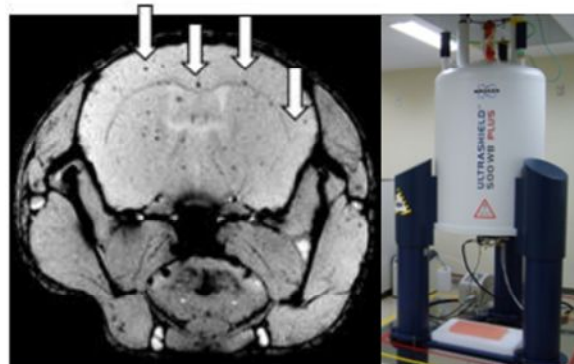


図3 抹消で標識したマクロファージの脳内迷入を捕らえた画像 (左) と現有する小動物専用11.7T-MRI (右)

(3)については慢性的なストレスは血液脳関門を破綻させることが知られている(Northrop et al. J Neuroimmune Pharmacol 2012)。2)のような軽微な全身性の炎症では血液脳関門の破綻はなかったが、炎症が長期にわたった場合、この機序が関与する可能性も否定できない。

代表者中江は痛みの臨床に携わりながら痛みの動物モデル研究を分担者中井と共にやってきた(Murray, Nakae et al. Nat Med 2010; Nakae, Nakai et al. Neurosci Lett 2012)。分担者熊谷は末梢免疫応答として知られるほぼすべてのパラメーター変化(ケモカイン、サイトカイン、細胞型、組織の炎症)を計測できる実験系を所持し、末梢の免疫ネットワークを簡便にモデル化した実績がある(Teraguchi, Kumagai et al. Phys Rev E. 2011)。さらに協力者吉岡の協力を得ることで、痛みの慢性化のきっかけとなる脳への細胞・分子伝達メカニズムが解明可能と考え、本研究を着想した。

## 2. 研究の目的

痛みはヒトの持つ感覚の中でとりわけ不快な感覚であり、特に慢性痛による経済損失は、ガンや心臓病より大きく、最優先で取り組むべき課題である。慢性痛に伴う脳内のネットワーク異常が痛みのメカニズムとして着目されているが、それが原因か結果についての議論はなされていない。脳のネットワーク異常がどのような仕組みを経て起こるかについての研究は未だ不十分である。本研究では炎症性疼痛モデルを作成し、マクロファージから放出される液性因子とマクロファージそのものの脳内の迷入と脳内ネットワークの変化の関係を明らかにする。抹消のマクロファージの脳への迷入をMRI画像で、マクロファージから放出される免疫関連物質の脳への影響を分子レベルで解析することを通じ、痛みの慢性化のきっかけとなるメカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

本研究は、痛みの原因となる脳内ネットワークの異常のきっかけとなる事象を明らかにすることを目的に、炎症性疼痛モデルを作成し、(1)抹消の免疫応答の欠如に伴い疼痛行動の減弱が予想されるMyD88-KOマウスとWTマウスで抹消免疫応答の網羅的解析を分子生物学的にその脳への影響を形態学的に比較する。次に、(2)抹消に存在するマクロファージが炎症性変化のもと、脳内へ迷入しうるか否か、その迷入がMyD88-KOマウスでも同様に観察可能か、11.7T-MRIのT2強調画像で明らかにする。最後に、(3)マウスのMRIによるコネクトミクス解析を行い、痛みによって生じる異常を明らかにし、液性因子の過剰投与によりその異常が再現できるかを確認する。

## 4. 研究成果

WTマウスと各種KOマウスを使用して、術後遷延性疼痛モデルを作成し、タイムコースに応じてサイトカインがどのように変動するかの分析を行った。分析したのは、サイトカインとケモカイン約30種であり、疼痛行動の減弱しているKOマウスにおける発現パターンとWTの発現パターンに顕著な違いを認めた。

術後遷延性疼痛モデルの脳内活動にどのような変化をきたしているかを分析するため、術後遷延性疼痛モデルの術後2日目(急性期)4週間(慢性期)についてマンガン造影MRIの撮像を行った。その結果、各部位の活動性について有意な差は認められなかったが、その活動パターンについては、2日目、4週間後については手術前に比べて顕著な差を認めた。さらに、鎮痛薬の薬効を見るため、ブプレノルフィン、メロキシカム、ガバペンチンを投与した場合の脳内活動の変化を観察した。ブプレノルフィンは、4週間にあたる個体に対し、撮像2日前から12時間おきに4回、0.1mg/kg投与した。メロキシカムは、2日後と4週間後にあたる個体に対し、撮像2日前から24時間おきに2回、5mg/kg投与した。ガバペンチンは、4週間後にあたる個体に対し、撮像2日前から12時間おきに4回、100mg/kgと10mg/kgを異なるグループに投与した。疼痛行動の評価を行ったところ、機械刺激に対する疼痛閾値は投与個体と非投与個体の間で有意な差を認めた。疼痛行動評価を行った個体以外を用いて、マンガン造影MRIを撮像したところ、ブプレノルフィン投与個体の脳内活動パターンは手術前の脳内活動パターンに近い傾向を呈した。ガバペンチン投与個体においては、用量の異なる2つのグループ間で異なる傾向を示した。これらの結果については、明らかに違いを認めており、その定量化を検討していく必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

中江文、吉岡芳親、柳田敏雄、前臨床試験における高解像MRIを用いた毒性評価の可能性、毒性質問箱21号、査読無、21巻、2019、印刷中

DOIなし

中江文、中井國博、加藤弘樹、畑澤順、吉岡芳親、柳田敏雄、高解像MRIを用いた顔面の神経障害性疼痛モデルにおける自発痛の評価、日本疼痛学会誌、査読有、印刷中、2019、印刷中

DOIなし

〔学会発表〕(計8件)

岸本千恵、中江文、中井國博、吉岡芳親、加藤弘樹、能村幸太郎、中西美保、宮前誠、浦邊亮太郎、圓見純一郎、柳田敏雄、マウスの慢性の痛みのAIを用いた客観的評価の試み～マンガン造影MRIを用いた投薬量による違いの検証～、第41回日本疼痛学会、2019

Aya Nakae, Kunihiko Nakai, Yoshichika Yoshioka, Hiroki Kato, Chie Kishimoto, Koutaro Nomura, Miho Nakanishi, Makoto Miyamae, Ryotaro Urabe, Junichiro Enmi, Toshio Yanagida., Data Driven Quantification of the Effects of different doses of Gabapentin for Pain in Chronic Phase in Mice using Manganese-Enhanced MRI with AI based analyses, European Pain Federation (国際学会), 2019

Nakai K, Nakae A, Kubo T, Minegishi Y, Urabe R, Miyamae M, Hosokawa K., Pharmacological Studies of Spinal Cannabinoid Receptor subtypes in a Rat Model of Trigeminal Neuropathic Pain, 17th world Congress on Pain (国際学会), 2018

中江文、中井國博、加藤弘樹、畑澤順、吉岡芳親、柳田敏雄、高解像MRIを用いた顔面の神経障害性疼痛モデルの自発痛の評価、日本疼痛学会、2018

Nakae A, Soshi T, Tsugita Y, Kato K., Evaluation Method for Momentous Pain - Towards Development of Automatic Pain Evaluation System-, Society for Neuroscience 2017 (国際学会), 2017

Nakae A, Sumioka H, Yoshioka Y, Ishiguro H., Pituitary hormone secretion changes after experimental pain stimulation. Are GH/TSH changes in patients with Fibromyalgia syndrome in a situation of chicken or egg?, Euroanaesthesia 2017 (国際学会), 2017

中江文、脳波を用いた痛み客観的評価法の開発、日本ペインクリニック学会、2017

中江文、曾雌崇弘、次田裕美、加藤浩介、実験的熱刺激を用いた脳波による痛みの客観的評価、日本疼痛学会、2017

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：熊谷 雄太郎

ローマ字氏名：(KUMAGAI, yutaro)

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：主任研究員

研究者番号(8桁)：00528408

研究分担者氏名：中井 國博

ローマ字氏名：(NAKAI, kunihiko)

所属研究機関名：福井大学

部局名：学術研究院医学系部門(付属病院)

職名：准教授

研究者番号(8桁)：80362705

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：吉岡 芳親

ローマ字氏名：(YOSHIOKA, yoshichika)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。