

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19（共通）

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書



平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10468

研究課題名（和文）酸感受性受容体を中心とした骨吸収関連疼痛因子の発現検索による骨粗鬆性疼痛の解明

研究課題名（英文）Elucidation of osteoporotic pain by a manifestation search of a bone resorption

研究代表者

若林 弘樹（Wakabayashi, Hiroki）

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：50362687

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000 円

研究成果の概要（和文）：両側卵巣摘出による骨粗鬆性動物モデルを作成し、行動学的および免疫組織学的評価により疼痛閾値が上昇していることを見だし、骨粗鬆性疼痛動物モデルを確立した。確立した骨粗鬆性疼痛動物モデルを用いてビスフォスフォネートおよびテリパラチドの骨粗鬆性疼痛抑制効果を検討した。ビスフォスフォネートもしくはテリパラチドを投与することにより骨の粗鬆化を抑制するだけでなく、行動学的および免疫組織学的に疼痛も抑制することを見いだした。骨粗鬆性疼痛の一つの機序として酸性環境の可能性を見いだした。

研究成果の概要（英文）：Ovariectomy induced bone loss and mechanical hyperalgesia in hindlimbs with upregulation of TRPV1 and CGRP expressions in DRG neurons innervating hindlimbs. Alendronate or teriparatide prevented ovariectomy-induced bone loss and mechanical hyperalgesia in ovariectomized mouse hindlimbs, and it suppressed upregulation of pain markers (TRPV1 and CGRP expressions).

研究分野：整形外科

キーワード：骨粗鬆症 疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

長寿大国である我が国は、高齢化社会となったことで様々な問題が生じている。医療面において運動器分野では運動器不安定症の原因の一つである骨粗鬆症患者が 1000 万人存在することである。骨粗鬆症患者では腰背部痛に悩まされている患者が多く、診療所に通院する骨粗鬆症患者の約 80%に腰背部痛の訴えがある<sup>1)</sup>。腰背部痛の原因は、椎体骨折や微小骨折、椎間関節の不整合などの物理的な障害が関与していると考えられていた<sup>2)</sup>。一方、骨悪性腫瘍や転移性骨腫瘍における骨の痛み(骨痛)の要因として、骨破壊による物理的障害だけでなく、破骨細胞や腫瘍細胞からの酸放出による酸性環境が関与している<sup>3,4)</sup>。骨粗鬆症においても、骨吸収の相対的增加、すなわち破骨細胞から酸放出が増加していることから、酸性環境が骨粗鬆症の疼痛原因の一つである可能性が考えられる。メカニズムとして、破骨細胞により放出された酸により局所の pH が低下し、骨組織内に存在する、酸感受性受容体である transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)を介して、侵害受容性神経を興奮させて痛みを引き起こすと考えられている<sup>3)</sup>。また、骨組織内には calcitonin gene-related peptide (CGRP)やサブスタンス P (SP)などの神経ペプチドが存在し<sup>3,5,6)</sup>、侵害受容器から有害信号が求心性に伝達されると、軸索反射により他の侵害受容繊維末端から神経ペプチドが放出され、末梢血管拡張、透過性亢進、肥満細胞からのヒスタミン放出などの作用を及ぼし、神経原性炎症を引き起こすと考えられている<sup>7)</sup>。そこで我々は、骨粗鬆症における TRPV1、CGRP、SP の関与に着目した。本研究においては骨粗鬆症病態における酸感受性受容体である TRPV1 を中心とした疼痛関連因子の活性化とそれに応答する細胞内シグナル経路を同定することにより骨粗鬆症性疼痛の分子メカニズムを明らかにし、メカニズムに立脚する効果的かつ特異的な新しい骨粗鬆症性疼痛治療法開発のための指針を得ることを目的とする。

## 2. 研究の目的

骨粗鬆症動物モデルを作成し、行動解析・免疫組織学的評価により骨粗鬆症性疼痛における新たなメカニズムについて酸感受性受容体の関与を中心に検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルの確立

生後8週齢のメス ddY マウスに全身麻酔下に、両側卵巣摘出術(OVX)を行い、von Frey filament test で術後4週後に疼痛評価を行った。疼痛評価は逃避行動を起こす頻度(陽性率)・最小の刺激強度(閾値)、up-down method を用いた 50% 閾値にて評価を行った。

### (2) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルの下肢骨当該領域後根神経節での疼痛関連タンパクの検索

### 域後根神経節での疼痛関連タンパクの検索

上記1でのモデルマウスにおいて下肢骨当該領域の後根神経節である第3から5腰髄神経根を採取し、免疫組織学的に疼痛関連タンパクを評価した。疼痛関連タンパクは calcitonin gene-related peptide (CGRP)および酸感受性受容体である transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)を評価した。**(3) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルを用いての薬物治療による評価・検討**

生後8週齢のメス ddY マウスに全身麻酔下に、両側卵巣摘出術(OVX)を行い、OVX 後に vehicle(V)を投与する OVX-V 群、ビスフォスフォネート製剤であるアレンドロネート(ALN)を投与する OVX-ALN 群と Sham 手術後に vehicle を投与する Sham 群の3群に分けた。OVX4 週後に von-Frey filament による後肢足底刺激を行って疼痛閾値を評価した。安楽死後  $\mu$ CT で大腿骨遠位および脛骨近位骨幹端において骨形態計測を、また下肢骨当該領域の後根神経節(第3から5腰髄神経根)を採取し、疼痛関連タンパクとして calcitonin gene-related peptide (CGRP)および transient receptor potential cation channel subfamily V member 1 (TRPV1)の発現を免疫組織学的に評価した。

## 4. 研究成果

### (1) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルの確立

いずれの疼痛評価においても OVX 群が Sham 手術群(コントロール群)と比較して有意に疼痛閾値が増加し、疼痛過敏が認められた。安楽死後  $\mu$ CT を用いて骨塩定量および骨形態計測を行い評価したところ大腿骨遠位部および脛骨近位部の骨塩定量および骨形態計測では OVX 群が Sham 手術群と比較して有意に骨の粗鬆化が認められた。骨粗鬆症モデルにおいて疼痛評価を確立して骨粗鬆症性疼痛動物モデルを確立した。

### (2) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルの下肢骨当該領域後根神経節での疼痛関連タンパクの検索

第3から5腰髄の各神経根において CGRP および TRPV1 は Sham 手術群(コントロール群)と比較して OVX 群では有意にタンパクの発現が上昇していることを見出した。

### (3) 骨粗鬆症性疼痛動物モデルを用いての薬物治療による評価・検討

OVX-V 群は Sham 群(コントロール群)と比較して有意に疼痛閾値が低下し、疼痛過敏が認められたが、OVX-ALN 群は疼痛閾値の低下が有意に抑制されていた。 $\mu$ CT による骨形態計測では大腿骨遠位部と脛骨近位部の骨塩定量および骨形態計測は OVX-V 群が Sham 手術群と比較して有意に骨の粗鬆化が認められ、OVX-ALN 群は有意に骨の粗鬆化が抑制されていた。

後根神経節での疼痛関連タンパクの発現は CGRP および TRPV1 共に OVX-V 群は Sham 群と比較して有意に発現が増加し、

OVX-ALN 群は有意に CGRP と TRPV1 の発現増加が抑制されていた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 1 件)

Naito Y, Wakabayashi H, Kato S, Nakagawa T, Iino T, Sudo A. Alendronate inhibits hyperalgesia and suppresses neuropeptide markers of pain in a mouse model of osteoporosis. J Orthop Sci. 2017 in press. doi: 10.1016/j.jos.2017.02.001. 査読有り

##### [学会発表](計 8 件)

Nagao N, Wakabayashi H, Kato S, Miyamura G, Naito Y, Sudo A. Alendronate decreased mechanical hyperalgesia in ovariectomized mice with prevention of bone loss and inhibition of inflammatory cytokines ORS Annual Meeting (March 10-13 2018, New Orleans)

Nagao N, Wakabayashi H, Kato S, Miyamura G, Naito Y, Sudo A. Teriparatide and alendronate improved bone loss and hyperalgesia in a mouse model of osteoporosis EULAR Annual European Congress of Rheumatology (June 14-17 2017, Madrid Spain)

宮村岳、若林弘樹、長尾信人、内藤陽平、湊藤啓広  
後肢非荷重骨粗鬆症疼痛モデルマウスを用いたアレンドロネートの治療効果および免疫組織学的検討  
第 35 回日本骨代謝学会学術集会(平成 29 年 7 月 27 日～29 日 福岡県福岡市)

長尾信人 若林弘樹 宮村岳 加藤祥  
内藤陽平 湊藤啓広  
骨粗鬆症性疼痛モデルマウスにおけるアレンドロネートの治療効果の検討  
第 35 回日本骨代謝学会学術集会(平成 29 年 7 月 27 日～29 日 福岡県福岡市)

宮村岳、若林弘樹、長尾信人、加藤祥、中川太郎、内藤陽平、湊藤啓広  
後肢非荷重骨粗鬆症疼痛モデルマウスを用いたテリパラチドの治療効果および免疫組織学的検討  
第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会(平成 29 年 10 月 26 日～27 日 沖縄県宜野湾市)

長尾信人、若林弘樹、宮村岳、加藤祥、内藤陽平、湊藤啓広  
閉経後骨粗鬆症モデルマウスにおけるアレンドロネートの疼痛改善効果の検討  
第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会(平成 29 年 10 月 26 日～27 日 沖縄県宜野湾市)

Kato S, Wakabayashi H, Naito Y, Miyamura G, Sudo A  
Teriparatide Improved Bone Loss and Hyperalgesia in a Mouse Model of Osteoporosis  
EULAR Annual European Congress of Rheumatology (June 8-11 2016, London UK)

Miyamura G, Wakabayashi H, Kato S, Nakagawa T, Naito Y, Sudo A  
Effects of osteoporosis treatments for bone loss and pain-related behavior in the hind limb-unloaded mouse model of disuse osteoporosis  
ACR/ARHP 2016 Annual Meeting (November 11-16 2016, Washington DC)

##### [図書](計 0 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

若林弘樹(WAKABAYASHI, Hiroki)  
三重大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号: 50362687

##### (2)研究分担者

須藤啓広 (SUDO, Akihiro)  
三重大学・医学系研究科・教授  
研究者番号：60196904

加藤祥 (KATO, Sho)  
三重大学・医学系研究科・リサーチアソシエ  
イト  
研究者番号：30741152

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )