

令和 2 年 5 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16H02678

研究課題名(和文) 痛み治療のための再生医療の開発：細胞移植技術と徐放製剤を活用した新規アプローチ

研究課題名(英文) Development of regenerative medicine for chronic pain: novel treatment with cell transplantation and drug delivery system.

研究代表者

齋藤 繁 (SAITO, SHIGERU)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40251110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,400,000円

研究成果の概要(和文)：新規の実験手法も導入して慢性疼痛治療開発につながる下行性抑制メカニズムの解明を試みた。大脳皮質から脊髄後角への局所抑制回路では、脊髄後角I層およびII層外側のGABA系統が重要であるが、II層内側より深部ではグリシンが重要であると報告しているものを再確認した上で、神経障害性疼痛のモデル動物の脊髄、青斑核、その投射系の細胞活動について行動生理学的、薬理的に検証した。

行動実験：疼痛閾値の測定では、様々な薬剤を投与した上で、Paw-pressureテストを用いラットおよびマウスの実験を行った。機械的侵害刺激を動物の後肢に与え、逃避した時の圧を逃避閾値として算出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、末梢神経障害性の痛みでは下行性制御系の活動が重要である事が再確認されたことは痛みメカニズムの解明に寄与したと考えられる。また、抗てんかん薬、抗ケイレン薬系統の薬剤による慢性痛治療を更に有効にするための基礎データを得ることができた

研究成果の概要(英文)：Pain and impaired endogenous analgesia are risk factors of chronic postsurgical persistent pain (CPSP). A Chronic neuropathic pain model induced by spinal nerve ligation shows impaired endogenous analgesia and delayed recovery from incisional pain. Repeated pharmacological treatment can restore the endogenous analgesia, but its effects on delayed recovery are not clear.

In this research project, several animal chronic painful practices including plantar incision were made on the side uni- and contralateral to the nerve ligation in chronic pain rats. Withdrawal thresholds were measured by pain assessment standards, such as von Frey filament test until 28 d after surgery. Among several tested drugs, amitriptyline (10 mg·kg-1·d-1) was considered effective for 13 d perioperatively. To examine the roles of noradrenergic and cholinergic signals in the spinal dorsal horn,

研究分野：麻酔科学

キーワード：慢性疼痛 再生医療 抑制ニューロン 脊髄後角 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

本邦国民において罹病率が高く、大きな社会損失をもたらしている「長引く痛み」「慢性痛」に対しては早期に革新的治療の開発が必要である。このテーマは、「社会還元性の高い研究に対する資金投入」「国民に分りやすい研究プランの提案」という学術研究に求められる現在の社会的要件に合致する。また、再生医療の促進は日本の学術・産業の強化のための重点課題であり、「痛み」に対する再生医療が全く手つかずの現状においては、「痛み」に対する再生医療の開発に迅速に着手すべきである。

近年、様々な疾患に対して再生医療の考え方に基づいた新しい治療法が開発されるようになってきた。我々は、閉塞性動脈硬化症の患者に basic-fibroblast growth factor (FGF) を注入して血管新生を促す治療法を開発した (Ito et al. 2008)。昨今では、パーキンソン病・脳梗塞・脊髄損傷といった、再生が難しいと考えられていた中枢神経領域の疾患も再生医療のターゲットとして考えられるようになってきている。いずれの疾患に対しても、「低下したニューロン群の機能を、同様の機能を持ったニューロンの移植によって補う」という共通の戦略による治療が試みられている。そこで、我々は、脊髄後角において抑制ニューロンが減少するならば、外部から抑制ニューロンの前駆細胞を移植することで、神経障害性疼痛の症状を改善できるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

麻酔科医がペインクリニックの現場で遭遇することの多い神経障害性疼痛の発症においては、脊髄を含めた痛覚伝導神経回路の器質的・機能的な可塑的变化が原因であることが示されている。我々はその中でも、脊髄後角の脱抑制、すなわち GABA 受容体やグリシン受容体など脊髄後角ニューロンの興奮を抑制するシステムの機能低下が、重要な役割を果たすことを示してきた。実際に、神経障害性疼痛のモデル動物では脊髄後角の GABA 作動性ニューロン数が減少することが報告されている。脊髄後角での制御された神経再生は「慢性痛」治療に必須である。また、機能的脳画像 (主に fMRI) により、疼痛認知におけるペインマトリックスの存在が明らかにされ、それを構成する脳部位の特定が進んでいる。当科ではいわゆる感情面からの疼痛認知修飾を同法を用いて明らかにして来た。現実の臨床においても認知行動療法など高次脳機能の修飾が疼痛治療の主軸の一つとして捉えられるべきであると広く認知されつつある。こうした部位での神経可塑性制御も慢性痛治療には欠かせない。

そこで、本研究では、抑制性介在ニューロンの前駆細胞を、神経障害性疼痛モデル動物に生着させるための技術の可能性に関して検討を進めることとした。また、研究の後半では、特定領域の神経細胞群が疼痛閾値の低下を改善するメカニズムについてについても調べることにした。fMRI を用いて慢性疼痛患者のペインマトリックス領域の変調を検出することも併せて計画した。下行性調節系作動薬投与前後での変化を検討することで新規の治療戦略開発の可能性を検討した。

3. 研究の方法

行動実験：疼痛閾値の測定では、様々な薬剤を投与した上で、Paw-pressure テストを用いたラットおよびマウスの実験を行った。機械的侵害刺激を動物の後肢に与え、逃避した時の圧を逃避閾値として算出した。正常ラットの逃避閾値は 200g 程度であるが、SNL ラットでは神経切断後 100g 前後まで低下する。この実験では、SNL ラットの機械的痛覚過敏が薬理的介入によってどの程度改善するかを観察した。従来の研究よりも経過の長いモデルを作成・使用して、より臨床例に近い条件での検証を行なった (図 1)。

薬理学的前処置後に実施した免疫組織学的実験では、慢性疼痛モデルラットを灌流固定し、脊髄を取り出して形態観察用の切片を作成した。この実験はこれまで継続的に行っている青斑核の投射経路の検索であり、本研究では特に、脊髄後角の抑制性介在ニューロンは主に頭尾側方向に神経突起を伸ばすことの確認作業を実施した。横断面のみならず矢状断切片を作成し、この切片から共焦点顕微鏡による連続的な写真撮影を行なっている。

ギャバペンチノイドに分類される薬剤の臨床使用が拡大しており、末梢神経障害性の痛みでは下行性制御系の活動が重要である事が再確認されている。臨床での薬物使用に準じて、動物実験において三環系抗うつ薬が末梢神経障害後の痛み誘発性鎮痛の減弱を回復させることが確認され、ギャバペンチンやプレギャバリンなどの作用の更なる解析を行った。臨床的研究として、ペインクリニック外来を訪れた顔面痛をはじめとする慢性痛患者を対象として、問診票による神経障害性スコア (painDETECT Questionnaire) と MRI 画像での大脳形態 (voxel-based morphometry) の相関結果に基づき、同様な手法で感情面の検証を継続的に行なった。

4. 研究成果

脊髄後角を下行性に制御する青斑核に関する研究の結果を進展させ、神経投射路の活性化により疼痛が減弱するとの結果に関してこれまでの知見において確度の不十分であったところを補強することができた。さらに、その背景にある分子機構に関して、生理学的実験結果と整合性を取るための実験として、本研究においては形態学的実験手法を用いた多面的な解析を行った。その結果、青斑角からの出力の重要な要素が解明できた。特に、かねてより疼痛慢性化の機軸部

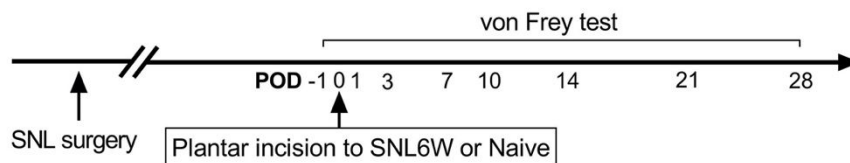
位とされる脊髄後角の局所抑制回路に関して、これまでの研究で I 層および II 層外側では GABA が重要であるが、II 層内側より深部ではグリシンが重要であると報告されている。本研究においては、それらに加えノルアドレナリン系やアセチルコリン系との連携に関しても神経障害性疼痛のモデル動物の脊髄、青斑核、その投射系の細胞活動について、分子標識を用いた形態学的検討で確認することができた。

既に臨床適用が行われている薬剤に関しても、その作用メカニズムが明快であるわけではないことから、Paw-pressure テストを含む行動学的実験において、機械的侵害刺激を動物の後肢に与え、逃避した時の圧を逃避閾値として算出している。明確な結果として、正常ラットの逃避閾値は 200g 程度であるところ、SNL ラットでは神経切断後 100g 前後まで低下するが、今回の実験でも、SNL ラットの機械的痛覚過敏が薬理的介入によってどの程度改善するかを観察することができた (図 2)。これはこれまでの我々の研究成果のみならず、国際的な各研究グループの推論と整合するものである。

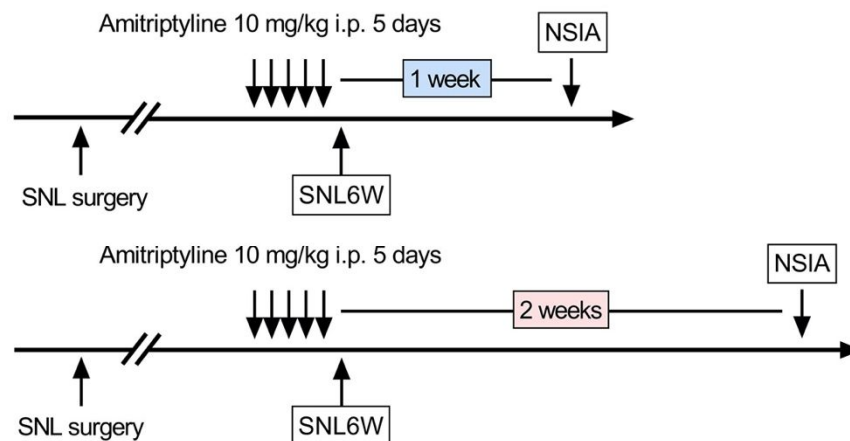
薬理的処置後の免疫組織学的実験では、PFA を用いてラットを灌流固定し、脊髄を取り出して形態観察用の切片を作成する手法を用いたが、それにより、青斑核の投射経路がこれまでより明瞭に検索でき、脊髄後角の抑制性介在ニューロンの役割についても示唆を得た。

ギャバペンチノイドに分類される薬剤の臨床使用に関する研究では、末梢神経障害性の痛みでは下行性制御系の活動が重要である事が再確認された。臨床での薬物使用に準じて、動物実験において三環系抗うつ薬が末梢神経障害後の痛み誘発性鎮痛の減弱を回復させることが確認され、ギャバペンチンやプレギャバリンなどの作用の更なる解析を行ったが、それに対応する臨床的研究として、ペインクリニック外来を訪れた顔面痛をはじめとする慢性痛患者を対象として、問診票による神経障害性スコア (painDETECT Questionnaire) と MRI 画像での大脳形態 (voxel-based morphometry) の相関結果の解析で感情面の検証を行ったが、その結果両側前帯状回、右後帯状回との正の相関が明瞭に認められた。また並行して実施した社会環境的因子と疼痛受容性の関連解析でも同様部位の関与が示唆された (図 3)。

A Assessment of incisional pain



B Noxious stimulus-induced analgesia (NSIA)



C Perioperative treatment of amitriptyline

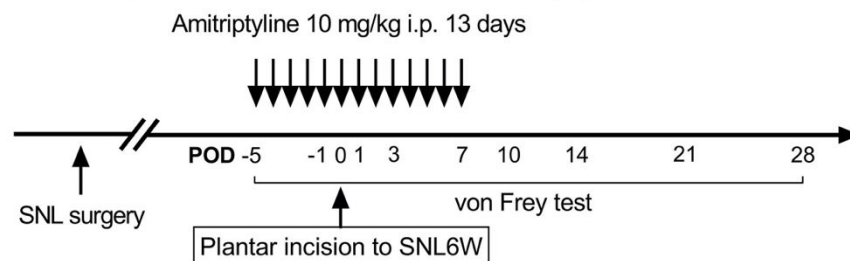


図 1 (Ohta J

, Brain

図2 (Ohata J, Brain Res. 2020 Jan 15; 1727:146568.より引用)

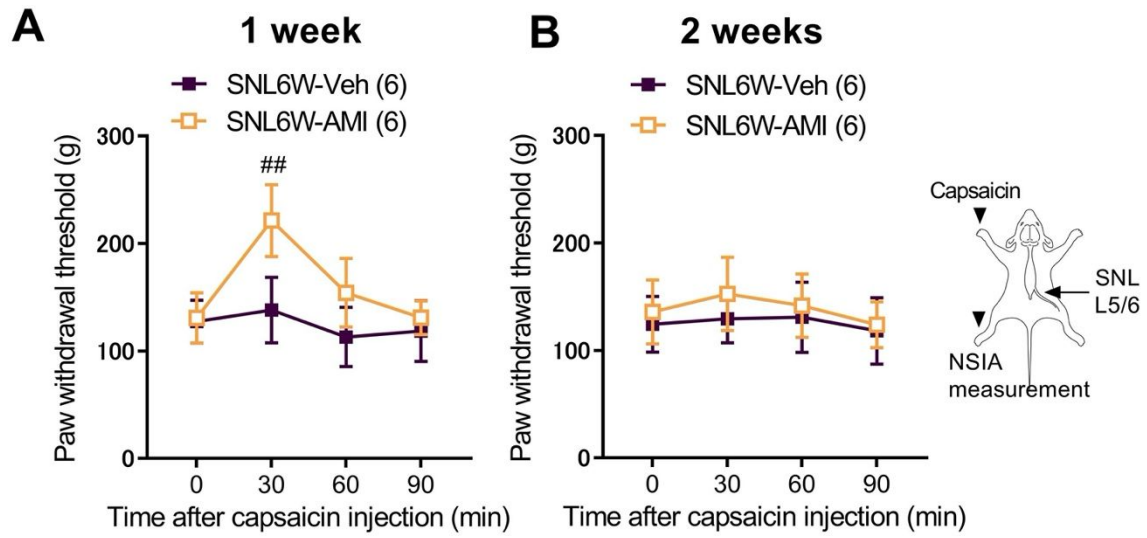
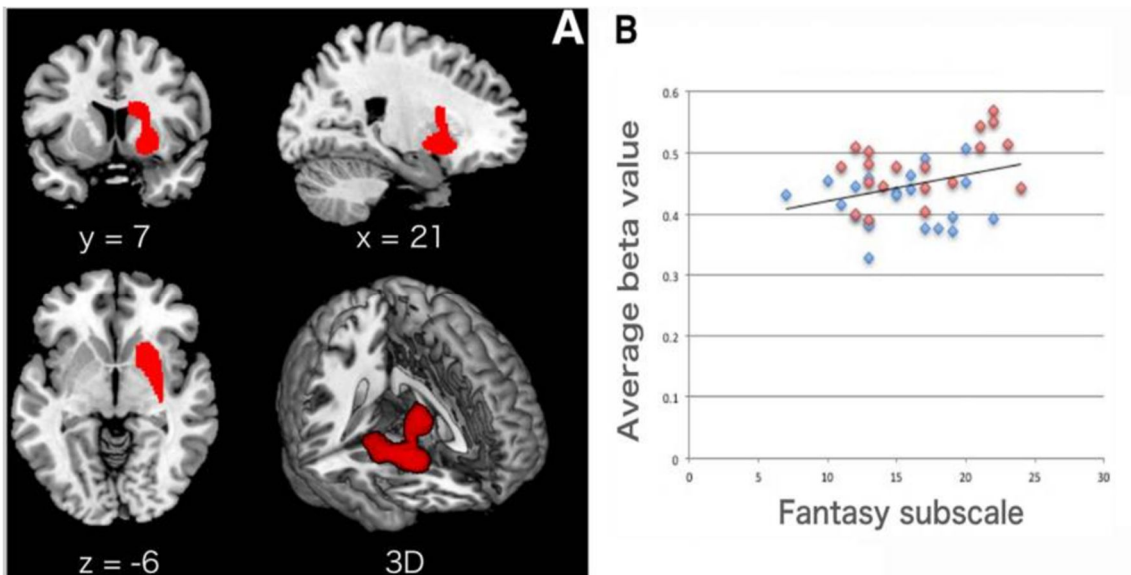


図3 (Ogino Y, Front Hum Neurosci. 2019 Jun 11;13:197.より引用)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 5件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Kawamichi H, Sugawara SK, Hamano YH, Makita K, Kochiyama T, Kikuchi Y, Ogino Y, Saito S, Sadato N.	4. 巻 14
2. 論文標題 Prosocial behavior toward estranged persons modulates the interaction between midline cortical structures and the reward system.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Soc Neurosci	6. 最初と最後の頁 618-630.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17470919.2018.1553797	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto T, Kato D, Obata H, Saito S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Tropomyosin Receptor Kinase B Receptor Activation in the Locus Coeruleus Restores Impairment of Endogenous Analgesia at a Late Stage Following Nerve Injury in Rats.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pain	6. 最初と最後の頁 600-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2018.11.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ogino Y, Kawamichi H, Kakeda T, Saito S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Exploring the Neural Correlates in Adopting a Realistic View: A Neural Structural and Functional Connectivity Study With Female Nurses.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Front Hum Neurosci	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fnhum.2019.00197	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ohta J, Suto T, Kato D, Hiroki T, Obata H, Saito S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Loss of endogenous analgesia leads to delayed recovery from incisional pain in a rat model of chronic neuropathic pain. Brain Res.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 neuropathic pain. Brain Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2019.146568.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Suto T, Kato D, Obata H, Saito S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Tropomyosin Receptor Kinase B Receptor Activation in the Locus Coeruleus Restores Impairment of Endogenous Analgesia at a Late Stage Following Nerve Injury in Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2018.11.008.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamichi H, Sugawara SK, Hamano YH, Makita K, Kochiyama T, Kikuchi Y, Ogino Y, Saito S, Sadato N.	4. 巻 28
2. 論文標題 Prosocial behavior toward estranged persons modulates the interaction between midline cortical structures and the reward system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Social Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17470919.2018.1553797.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki T, Kosugi K, Suto T, Tobe M, Tabata Y, Yokoo S, Saito S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sustained-release lidocaine sheet for pain following tooth extraction: A randomized, single-blind, dose-response, controlled, clinical study of efficacy and safety.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200059.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato D, Suto T, Obata H, Saito S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Spinal Activation of Tropomyosin Receptor Kinase-B Recovers the Impaired Endogenous Analgesia in Neuropathic Pain Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesia and Analgesia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000003592.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tobe M, Suto T, Saito S.	4. 巻 32
2. 論文標題 The history and progress of local anesthesia: multiple approaches to elongate the action.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Anesth.	6. 最初と最後の頁 632-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-018-2514-8.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suto T, Kato D, Obata H, Saito S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Tropomyosin Receptor Kinase B Receptor Activation in the Locus Coeruleus Restores Impairment of Endogenous Analgesia at a Late Stage Following Nerve Injury in Rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 600-609
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpain.2018.11.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kawamichi H, Sugawara SK, Hamano YH, Makita K, Kochiyama T, Kikuchi Y, Ogino Y, Saito S, Sadato N.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Prosocial behavior toward estranged persons modulates the interaction between midline cortical structures and the reward system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Social Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/17470919.2018.1553797.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki T, Kosugi K, Suto T, Tobe M, Tabata Y, Yokoo S, Saito S.	4. 巻 13
2. 論文標題 Sustained-release lidocaine sheet for pain following tooth extraction: A randomized, single-blind, dose-response, controlled, clinical study of efficacy and safety.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0200059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0200059.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kato D, Suto T, Obata H, Saito S.	4. 巻 Epub ahead of print
2. 論文標題 Spinal Activation of Tropomyosin Receptor Kinase-B Recovers the Impaired Endogenous Analgesia in Neuropathic Pain Rats.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anesthesia and Analgesia	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000003592.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tobe M, Suto T, Saito S.	4. 巻 32
2. 論文標題 The history and progress of local anesthesia: multiple approaches to elongate the action.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Anesth.	6. 最初と最後の頁 632-636
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-018-2514-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugimine S, Ogino Y, Kawamichi H, Obata H, Saito S.	4. 巻 12
2. 論文標題 Brain morphological alternation in chronic pain patients with neuropathic characteristics.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Free PMC Article	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1744806916652408.	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka H, Suto T, Saito S, Obata H.	4. 巻 August
2. 論文標題 Amitriptyline, but Not Pregabalin, Reverses the Attenuation of Noxious Stimulus-Induced Analgesia After Nerve Injury in Rats.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Anesthesia & Analgesia	6. 最初と最後の頁 504-510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 太田 浄、須藤 貴史、齋藤 繁
2. 発表標題 内因性鎮痛は急性痛の程度とその回復に關与するか
3. 学会等名 日本麻酔科学会第64回學術集會
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣木 忠直、須藤 貴史、齋藤 繁、小幡 英章。
2. 発表標題 神經障害性痛に対するアミトリプチリン連続投与は、ノルアドレナリン作動性下行性抑制系を修飾する。
3. 学会等名 第39回日本疼痛学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hiroki T, Suto T, Saito S, Obata H.
2. 発表標題 Effects of repeated administration of amitriptyline on modulation of noradrenergic descending inhibitory system in a rat model of neuropathic pain.
3. 学会等名 Euroanaesthesia 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 廣木 忠直 須藤 貴史 齋藤 繁 小幡 英章
2. 発表標題 神經障害性痛ではモルヒネの鎮痛作用が減弱する-セロトニン作動性下行性痛み調節系の可塑性変化についての検討-
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回學術集會
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tadanao Hiroki, Takashi Suto, Jo Ohta, Shigeru Saito, Hideaki Obata.
2. 発表標題 The plasticity of spinal -aminobutyric acid interneurons reduces analgesic effects of morphine in neuropathic pain.
3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	荻野 祐一 (Ogino Yuichi) (20420094)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	高澤 知規 (Takazawa Tomonori) (30400766)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	田畑 泰彦 (Tabata Yasuhiko) (50211371)	京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・教授 (14301)	
研究分担者	須藤 貴史 (Suto Takashi) (60739621)	群馬大学・医学部附属病院・講師 (12301)	
研究分担者	久保 和宏 (Kubo Kazuhiro) (80546531)	群馬大学・大学院医学系研究科・助教 (12301)	