

令和元年6月13日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K01472

研究課題名(和文) 運動器障害で生じる広範囲慢性痛の病態解明：若齢期の特異性によるバイオマーカー探索

研究課題名(英文) Study of pathophysiology of musculoskeletal chronic pain : search for biomarkers by young age specificity

研究代表者

櫻井 博紀 (SAKURAI, Hiroki)

常葉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：60454419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に線維筋痛症、CRPS Iなどの慢性痛において小児の発症が少ないという報告があり、生後の発達過程における要因が慢性痛発症に関与している可能性がある。そこで我々の開発した運動器障害モデルで若齢期処置を行ったところ、成熟処置と異なり慢性痛が発症しなかった。障害筋の筋組織では処置急性期および慢性期において3週齢処置、9週齢処置で大きな差が見られなかったが、慢性期において筋および脊髄におけるmyogeninの発現に違いがみられたことから、運動器慢性痛発症に筋回復過程における関与の可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

運動器障害をはじめとした神経損傷以外の原因で発症する慢性痛は、病態が複雑で治療法、リハビリテーションが構築されておらず、ADL、QOLの低下を引き起こし、社会的に大きな問題となっている。ここに筋の回復過程に注目していくことで、運動器慢性痛のメカニズムの解明と効果的な慢性痛リハビリテーションの基礎の構築につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Clinically, it is known that the incidence of chronic pain is much lower in children than in adults. The low-incidence may disclose some important factors to develop chronic pain in the adulthood. In this study, we treated to the young rat in the musculoskeletal chronic pain model procedure we have developed. The treatment to adult rats produced long-persisting pain behaviors, on the contrary, the treatment to young rats did not develop chronic pain behaviors. In damaged skeletal muscle, time course of recovery observed almost same between young and adult rat. Though, the expression level of myogenin in muscle and spinal cord were different in chronic phase. These results suggest that muscle developmental factor coordinate the pathogenesis of musculoskeletal chronic pain.

研究分野：疼痛学、リハビリテーション医学

キーワード：慢性痛 運動器 生後発達

## 1. 研究開始当初の背景

運動器障害による慢性痛は、発症起点より空間的・時間的拡大を示す慢性広範囲痛を呈する。この病態は複雑で治療法、リハビリテーションが構築されておらず、ADL、QOLの低下を引き起こし、社会的に大きな問題となっている。臨床的に、運動器慢性痛は小児での発症が少ないという報告があり、このような若齢期での発症率の低さは生後の発達過程における何らかの要因が慢性痛発症に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

運動器慢性痛のメカニズム解明を進めるために、独自に開発した運動器慢性痛モデルを用いて、特に、若齢期において慢性痛が発症しにくいことに注目し、若齢処置における慢性痛発症の有無を調べるとともに、生後発達により異なる因子から慢性痛発症・維持要因を明らかにするため、若齢期と成熟期を比較し、障害部位である筋だけでなく、運動器慢性痛では痛みが広範囲に拡がることから、脊髄および血液での解析により全身的な検討を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 運動器慢性痛モデルの作成

SD系雄ラットを用い、片側腓腹筋に lipopolysaccharide (LPS; 2 µg/kg (dissolved in saline), 0.3 ml/kg, SIGMA, E. Coli, 0111: B4) を投与し、その 24 時間後に 6% 高張食塩水 (HS; 0.3 ml/kg) を 90 分間隔で 5 回投与して作成した (LH 処置)。成熟処置として 9 週齢、若齢処置として 3 週齢での処置を行った。

### (2) 行動学的実験

障害側および対側における、足底部の皮膚痛覚閾値 (VFF: von Frey filaments)、下腿筋圧痛閾値 (push-pull gauge)、下腿周囲径を処置後 10 週以上にわたって経時的に測定する。また、成熟・若齢処置それぞれの age-matched control 群を作り、処置群と並行して測定した。さらに、3 週齢正常群および 9 週齢正常群を作成し、それぞれの週齢時点での反応性を比較した。

### (3) 組織学的・分子生物学的実験

障害筋である下腿三頭筋の凍結切片を作成し H-E 染色後に光学顕微鏡で検鏡する。処置後の急性期および慢性期を時間軸として、それぞれの時期における筋組織での好中球、単球、リンパ球、中心核線維など損傷像、再生像を観察した。また、摘出筋、および摘出脊髄より mRNA を採取し、Real - Time PCR 法により炎症性サイトカインである TNF、筋の分化・成熟に関与する Myogenin、および、加齢変化に関連する抗酸化酵素の SOD1 の定量を行った。PCR には ViiATM7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用し、TaqMan Probe 方式で内部標準遺伝子として GAPDH を使用し、比較 Ct 法により、目的遺伝子の発現量の相対定量を行った。ELISA に関しては、採血により得られた血漿成分を R&D Systems Inc. ELISA Kit により、同様にサイトカイン、Myogenin、SOD1 の解析を行った。

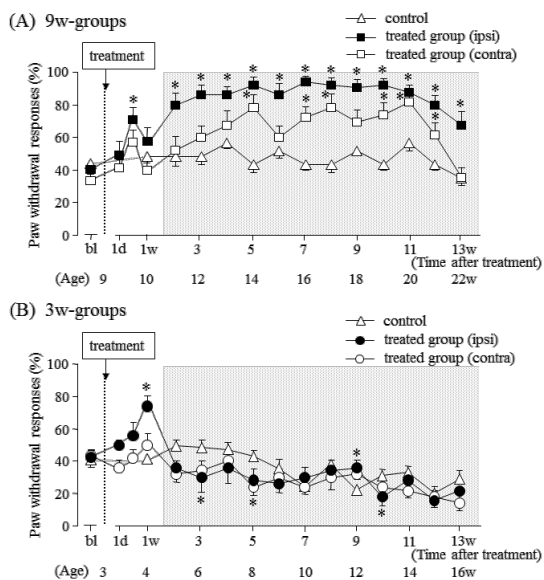
## 4. 研究成果

### (1) 運動器慢性痛モデルでの若齢処置

9 週齢処置群では、傷害部位の圧痛閾値低下および下腿周径増加は処置後 1 週目までには回復を示した。足底 VFF 刺激に対しては処置後 3 日目で一時的な反応の亢進がみられ、その亢進は処置後 1 週目で一旦減弱を示したが、処置後 2 週目から 10 週以上にわたり両側性に亢進が長期持続した (Fig.1 (A))。

3 週齢処置群では、傷害部位の圧痛閾値低下および下腿周径増加は 9 週齢処置群と同様に処置後 1 週目までに回復を示した。足底 VFF 刺激に対しては一時的な反応の亢進が処置後 1 週目でみられたが、処置後 2 週目以降では 9 週齢処置群とは異なり、反応は急速に減弱した。非処置側も反応の亢進はみられなかった (Fig.1 (B))。

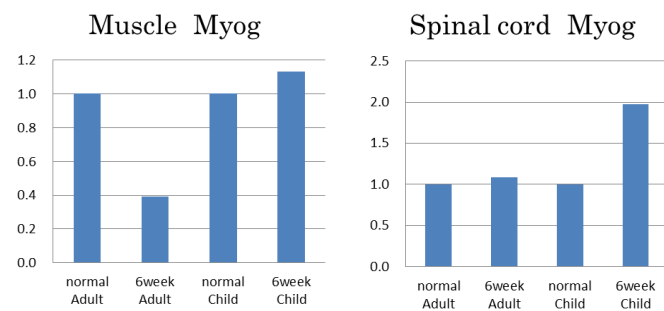
Fig.1



(2) 障害筋における組織・分子生物学的検討

3週齢と9週齢ラットにLH処置（LPS投与24時間後にHS（高張食塩水）5回投与）を行い、急性期であるLH処置後1日目（LH1d）、慢性期であるLH処置後6週目（LH6w）に未固定の下腿三頭筋を取り出して凍結切片を作成し、H-E染色後に光学顕微鏡で検鏡した。正常な筋は規則正しく並んだ筋線維と、筋線維間にある少量の細胞間質とで構成されているが、急性期として、LH処置1日目では、HSによる浸透圧ショックによる広範囲な筋細胞の壊死が観察され、壊死した筋細胞への大量のマクロファージの浸潤や小リンパ球の浸潤が観察された。慢性期として、LH処置後6週目では、ほぼ正常な筋組織像に近いが、まだ、中心部に核を持つ再生筋細胞が大小不同で多く残っていた。これらの所見は、3週齢処置群、9週齢処置群のどちらでも見られ、週齢による大きな差は見られなかった。また、処置筋および、その髄節の脊髄においてReal-Time PCR 法により、TNF $\alpha$ 、myogenin、SOD1の定量を行った。筋において、TNF $\alpha$ の発現は、痛みに差がある慢性期において成熟に比べて若齢処置ではやや高い傾向にあり、脊髄ではほぼ同等であった。また、筋の分化・成熟に関するmyogeninの発現は、慢性期で処置前より成熟処置では減少、若齢処置ではほぼ同等であり、脊髄では若齢処置で高い傾向にあった。SOD1については、筋および脊髄において成熟・若齢ともほぼ同様の傾向を示した（Fig.2）。また、血漿成分では、慢性期においてSOD1が成熟処置では減少を示し、若齢処置においては増加を示した。

Fig.2



今回、3週齢処置で9週齢処置と異なり、慢性痛が発症しなかったことは、3週齢で完成していない部分が慢性痛発症に関与していることが示唆された。筋組織において、処置急性期および慢性期において若齢処置、成熟処置で炎症像・筋回復像には大きな差は見られなかったが、転写因子レベルにおいて、痛みに差がある慢性期においては、成熟処置で筋でのmyogeninのmRNA発現が減少しており、逆に若齢処置では脊髄において増加しており、筋回復における差異が運動器慢性痛の発症・維持要因に関連がある可能性が考えられる。

社会的に大きな問題となっている運動器慢性痛において、その動物モデルで臨床と類似して若

齢での発症が少ないことが確認できたことは、運動器慢性痛のメカニズム解明への有用性が示唆され、また、運動器として筋回復過程に関連した系の動きに着目していくことが、さらなる解明に貢献すると考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

(1) Izumi Makino, Young-Chang Arai, Shuichi Aono, Masayuki Inoue, Hiroki Sakurai, Yusuke Ohmichi, Kazuhiro Shimo, Makoto Nishihara, Jun Sato, Noboru Hatakeyama, Takako Matsubara, Tatsunori Ikemoto and Takahiro Ushida: Jaw Exercise Therapy and Psychoeducation to Reduce Oral Parafunctional Activities for the Management of Persistent Dentoalveolar Pain. Pain Res Manag. Sep 12, Article ID 5042067, 7pages, 2018. DOI:10.1155/2018/5042067

(2) Inoue M, Ikemoto T, Inoue S, Nakata M, Nishihara M, Arai YP, Miyagawa H, Shimo K, Iida H, Hasegawa T, Wakabayashi T, Sakurai H, Hasegawa Y, Owari K, Hatakeyama N, Ushida T : Analysis of follow-up data from an outpatient pain management program for refractory chronic pain. J Orthop Sci. 22(6):1132-1137, 2017. DOI:10.1016/j.jos.2017.07.005

(3) 櫻井博紀, 牛田享宏 : 骨関節疾患の疼痛と運動機能障害, THE BONE 30(3), 229-232, 2016. [http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0002\\_3003](http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0002_3003)

(4) 泉仁, 葛西雄介, 櫻井博紀 : 筋・筋膜性疼痛, 脊椎脊髄ジャーナル30(6), 633-637, 2017. [https://www.miwapubl.com/products/detail.php?product\\_id=1996](https://www.miwapubl.com/products/detail.php?product_id=1996)

### 〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 佐藤純, 櫻井博紀, 青野修一, 牛田享宏 : 天気により痛みが影響を受ける慢性疼痛患者の特徴. 第 48 回日本慢性疼痛学会, 2019.2. 岐阜.

(2) H. Sakurai, M. Inoue, S. Inoue, T. Ikemoto, Y. Arai, M. Nakata, M. Nishihara, N. Hatakeyama, K. Shimo, H. Miyagawa, T. Hasegawa, Y. Hasegawa, Y. Ohmichi, C. Suzuki, J. Sato, T. Ushida : Improvement of body image in chronic pain patients after multidisciplinary group treatment program. IASP 16th World Congress on Pain, 2016.9. Yokohama, Japan.

(3) 櫻井博紀 : 筋痛・筋圧痛の病態を探る . シンポジウム 2 (筋肉の痛み) シンポジスト, 第 38 回日本疼痛学会, 2016.6. 札幌.