

令和元年5月25日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20120

研究課題名(和文) CRPSモデルラットにおけるTNF- $\alpha$  阻害薬の低用量局所静脈内投与の検討研究課題名(英文) Therapeutic efficacy of intravenous regional block with low-dose TNF- $\alpha$  antibody in Complex Regional Pain Syndrome (CRPS) model rat.

研究代表者

柴田 志保 (Shibata, Shiho)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：50708063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：複合性局所疼痛症候群(CRPS)は難治性の慢性疼痛である。CRPSの病態機序は解明されておらず、新しい治療の開発が望まれている。本研究では、CRPSモデル動物を作成し、腫瘍壊死因子(TNF- $\alpha$ )中和抗体局所投与の治療効果を検討した。TNF- $\alpha$  中和抗体局所投与後、痛みの閾値は正常化し、傷害坐骨神経で誘導されていた炎症反応も改善した。以上の結果から、TNF- $\alpha$  中和抗体の局所投与はCRPSに有効な治療となり得ると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、原因不明の難治性疼痛疾患であるCRPSの新しい治療の開発を目指すものである。慢性疼痛の形成と維持に深く関わっている可能性が示唆されているTNF- $\alpha$  を阻害することは、CRPSの症状を劇的に改善し、重症化を防ぐことが予想される。TNF- $\alpha$  阻害薬の全身投与は免疫低下による合併症のリスクを伴うが、低用量の局所投与であれば、合併症発生リスクを軽減し、より安全に治療できる可能性がある。さらに、他の難治性慢性疼痛への応用も可能かもしれない。慢性疼痛によって生じる経済的、社会的損失は世界的にも問題視されており、社会的意義の高い研究であると思われる。

研究成果の概要(英文)：Complex regional pain syndrome (CRPS) is an intractable chronic pain. The cause of CRPS is mostly unknown, so the elucidation of the pathophysiological mechanism and the clinical application of new therapeutic drugs for CRPS are necessary. In this study, we developed a CRPS model animal, and then evaluated the therapeutic efficacy of TNF- $\alpha$  neutralizing antibody (Ab). After local administration of TNF- $\alpha$  Ab, the pain threshold almost completely recovered after 6 weeks. In the ipsilateral nerves of CRPS model animals, various inflammation-related factors including TNF- $\alpha$  were highly expressed. These inflammatory reactions were also suppressed after local administration of TNF- $\alpha$  Ab. TNF- $\alpha$  Ab may be useful therapeutically for CRPS.

研究分野：医歯薬学

キーワード：複合性局所疼痛症候群 TNF- $\alpha$  TNF- $\alpha$  中和抗体 局所投与

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群 (CRPS) は、発症率 10 万人あたり 5.46 人 (0.00546%) と稀な疾患である。しかし、その症状は激しく、四肢の堪え難い痛み、浮腫、血流障害、発汗異常、運動障害、萎縮性変化などを伴い、日常生活が著しく障害される。原因が解明されておらず、治療法が確立されていないため、治療に難渋することが多く、新しい治療の開発が望まれている。

近年、CRPS の症状の発現には腫瘍壊死因子- (TNF-) が関与していることが推察されており、CRPS 患者では局所の TNF- 濃度が上昇している報告や CRPS 患者に TNF- 阻害薬を投与した報告が散見される。CRPS の患者に低用量の TNF- 阻害薬 (インフリキシマブ: 0.3mg/Kg) を局所静脈内投与した報告では、投与開始 2 週間後には痛みが消失し、投与中止半年後にも痛みは再燃せず、浮腫、関節可動域制限、握力、皮膚温の異常も半年後にも改善した状態を保っていた<sup>1)</sup>。インフリキシマブは、関節リウマチ治療において、効果発現が早く、寛解後に中止しても症状が再燃しない患者が多いことが知られており<sup>2)</sup>、CRPS でも同様の効果が得られるとすれば、有効な治療法の 1 つになり得る。TNF- 阻害薬は既に関節リウマチ、クローン病、乾癬などの自己免疫疾患に使用され、良好な治療成績を得ているが、免疫を抑制することに起因する合併症の発現に注意が必要であり、使用にはリスクを伴う。しかし、CRPS 患者では、TNF- 濃度上昇は局所に限られているとする報告も多いため、局所に低用量を投与することで、感染症などの全身性のリスクを軽減することが可能と思われる。

また、TNF- 阻害薬を使用している関節リウマチ患者では、帯状疱疹を発症しても帯状疱疹後神経痛になりにくいことが報告されており<sup>3),4)</sup>、他の神経障害痛の治療への応用の可能性もある。低用量 TNF- 阻害薬の局所投与は、多くの難治性疼痛に苦しむ患者の治療に役立つ可能性がある。

### 2. 研究の目的

- (1) CRPS モデル動物を作成し、TNF- 阻害薬局所投与の有効性を確認する。
- (2) CRPS 発症の病態機序を明らかにし、新規治療法を考案する。

### 3. 研究の方法

#### (1) モデル動物の作成

当初の計画では、成熟ラットの坐骨神経を部分結紮し、患肢をギプス固定によって 2 週間不動状態として CRPS モデルを作製した上で、局所静脈内ブロックの手法で低容量の TNF- 阻害薬を投与し、有効性と安全性を検討する予定であった。TNF- 阻害薬としてインフリキシマブ (抗ヒト TNF- モノクローナル抗体) を投与する計画であったが、齧歯類への有効性が確立していないため、齧歯類への有効性が確立している抗マウス/ラット TNF- モノクローナル抗体 (市販の中和抗体) の投与に変更することとした。その結果、当初の予定よりも薬剤購入費が高騰したため、モデル動物をラットからマウスに変更した。

全ての実験は、5 週齢の雄性 ddY マウスを用いて実施した。坐骨神経を部分結紮する坐骨神経部分結紮 (pSNL) モデルは、イソフルラン麻酔下に左後肢の大腿中央部より中枢側の坐骨神経を部分結紮し、作成した。CRPS モデルは、pSNL モデルと同様に左坐骨神経を部分結紮した後に、左下肢を最大伸展位でギプス固定し、2 週間左下肢を不動状態として作成した。対照群として、左坐骨神経を露出するのみで、結紮を行わなかった sham 手術群も作成した。

#### (2) sham 群、pSNL 群、CRPS 群の比較

##### 痛み閾値の比較

pSNL 処置を行った 2 週間後から 1 週間ごとに痛みの閾値を測定した。痛み閾値の測定には von Frey フィラメントを用いた触圧刺激試験を実施した。痛み閾値は、von Frey フィラメントをマウス後肢足蹠に押し当て、刺激に対する行動 (後肢を挙上する、後肢を舐める) を観察した結果を解析して算出した。

##### マイクロアレイ解析

pSNL 処置の 4 週間後に、sham、pSNL、CRPS の各モデルマウスから坐骨神経組織を採取した。pSNL および CRPS の坐骨神経は、神経結紮部位の両側 5mm を採取した。sham の坐骨神経は、左後肢の大腿中央部より中枢側で 1cm の長さで採取した。採取した坐骨神経組織でマイクロアレイ法により、各遺伝子の発現変化を解析した。

#### (3) 坐骨神経周囲への薬物局所投与法の確立

薬物はラットの局所静脈内へ投与する予定であったが、実験動物をラットからマウスに変更し、局所静脈内への投与が困難となったことから、神経周囲への局所投与によって対応することにした。そこで、マイクロシリンジを用いた坐骨神経周囲への薬物局所投与法を確立した。イソフルラン麻酔下に、大腿骨をメルクマールに左後肢の大腿中央部より中枢側にトリパンブルー溶液を 10  $\mu$ L 投与した後、左後肢を切開し、坐骨神経を露出して坐骨神経が染色されていることを確認した。

#### (4) 薬物局所投与実験

##### 痛み閾値の評価

pSNL 処置の 2 週間後、ギプスを抜去した CRPS モデルマウスの坐骨神経周囲に薬物局所投与を行った。薬物の局所投与は、イソフルラン麻酔下に行い、マイクロシリンジを用いて 1 回あたり 10  $\mu$ L とした。投与薬物には、生理食塩液、control IgG、TNF- 中和抗体 (0.1  $\mu$ g, 1  $\mu$ g)。

MMP-9 阻害薬 (1 µg) を用いた。治療効果は、von Frey テストを用いた痛み閾値によって判定した。von Frey テストは、投与前、投与 1 時間後、2 時間後、3 時間後、24 時間後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後に実施し、急性期の効果と長期効果を確認した。また、pSNL 処置のみを行い、ギプス固定は行わなかった pSNL 群にも同様の薬物局所投与を行った。pSNL 群では、生理食塩液、control IgG、TNF- 中和抗体 (0.1 µg, 1 µg) MMP-9 阻害薬 (1 µg) recombinant TNF (0.01 µg) を投与した。治療効果は、von Frey テストを用いた痛み閾値によって判定した。von Frey テストは、投与前、投与 1 時間後、2 時間後、3 時間後、24 時間後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後に実施し、急性期の効果と長期効果を確認した。

#### 免疫組織染色

薬物局所投与後に適宜、坐骨神経組織を採取し、免疫組織染色を実施した。免疫組織染色には、TNF- 、S100- 、CD68、Iba-1 の各抗体を用いた。

#### リアルタイム PCR

薬物局所投与後に適宜、坐骨神経組織を採取し、リアルタイム PCR を実施した。

## 4 . 研究成果

### (1)CRPS モデル動物の作成

従来の神経障害痛モデルに不動の時期を加えることで、CRPS 患者に類似した皮膚の色調変化、患肢の腫脹が発現し、痛み閾値が著明に低下した CRPS モデル動物を作成することができた。pSNL モデル動物では痛み閾値が正常化する術後 6 週目においても、今回作成した CRPS モデル動物では強い痛みが持続していた。

マイクロアレイ解析、免疫組織染色、リアルタイム PCR の結果から、CRPS 群では、坐骨神経組織において、sham 群および pSNL 群よりも強い炎症反応が観察された。

以前に報告されている CRPS モデル動物<sup>5)</sup>よりも手技を簡便にする目的で、本研究では、神経傷害には坐骨神経部分結紮を、不動化にはギプス固定を用いたが、病態形成の再現性が高く、CRPS 様症状を安定的に示すモデル動物の作成に成功した。

### (2)TNF- 中和抗体局所投与の治療効果

TNF- 中和抗体 (抗マウス TNF- 抗体) を局所投与した CRPS モデルマウスでは、痛み閾値が徐々に上昇した。1 µg/回で投与した群では、6 週間後には痛みの閾値が対照群レベル (1.50 ± 0.18g) まで有意に回復した (P<0.05)。一方、0.1 µg/回で投与した群では、回復傾向は見られなかったが、効果は限定的であった。

また、CRPS 群の傷害神経では、マイクロアレイ解析により TNF- を含む各種炎症関連因子の発現増加が、免疫組織染色によりマクロファージの浸潤・活性化が認められたが、TNF- 中和抗体を局所投与した CRPS 群の傷害神経ではそのような炎症反応が抑制されていた。

### (3)pSNL 群に対する recombinant TNF- の作用

pSNL 群では、患肢の外観に CRPS 様の変化は見られず、痛み閾値も自然に改善した。そのため、TNF- 中和抗体を局所投与しても有意な治療効果は発現しなかった。しかし、recombinant TNF- を局所投与した pSNL 群では、痛みの回復が遅れる傾向がみられた。

以上の結果より、痛みの増大と遷延に TNF- が関与している可能性が考えられた。CRPS の発症には TNF- を介した炎症性シグナルが重要であり、TNF- 阻害薬 (中和抗体) の局所投与が CRPS の治療に有効である可能性が示唆された。

#### < 引用文献 >

- 1) Bernateck M, Rolke R, Birklein F, et al. Successful intravenous regional block with low-dose tumor necrosis factor-alpha antibody infliximab for treatment of complex regional pain syndrome 1. *Anesth Analg* 2007; 105: 1148-1151.
- 2) Tanaka Y, Takeuchi T, Mimori T, et al. Discontinuation of infliximab after attaining low disease activity in patients with rheumatoid arthritis: RRR (remission induction by Remicade in RA) study. *Ann Rheum Dis* 2010; 69: 1286-1291.
- 3) Strangfeld A, Listing J, Herzer P, et al. Risk of herpes zoster in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF-alpha agents. *JAMA* 2009; 301: 737-744.
- 4) Javed S, Kamili QU, Mendoza N, et al. Possible association of lower rate of postherpetic neuralgia in patients on anti-tumor necrosis factor- . *J Med Virol* 2011; 83 : 2051-2055.
- 5) Ota H, Arai T, Iwatsuki K, et.al. Pathological mechanism of musculoskeletal manifestations associated with CRPS type II: an animal study. *PAIN* 155; 1976-1985, 2014.

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 6 件)

柴田志保、田頭秀章、鈴木沙理、喜多紗斗美、山浦健、岩本隆宏。  
複合性局所疼痛症候群モデルマウスの構築と治療法確立への応用。  
第 70 回日本薬理学会西南部会，2017 年 11 月 18 日，鹿児島市。

柴田 志保、田頭 秀章、鈴木 沙理、喜多 紗斗美、岩本 隆宏、山浦 健  
複合性局所疼痛症候群モデルマウスに対する TNF- 中和抗体局所投与の治療効果  
日本麻酔科学会第 65 回学術集会, 2018 年 5 月 17 日-5 月 19 日, 神戸市  
Shiho Shibata, Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Sari Suzuki, Ken Yamaura, Takahiro  
Iwamoto.

Therapeutic efficacy of TNF- $\alpha$  neutralizing antibody in Complex Regional Pain Syndrome  
(CRPS) model mice.

18th WORLD CONGRESS OF BASIC AND CLINICAL PHARMACOLOGY, 2018.7. 1-7.6. Kyoto (Japan)

柴田志保、田頭秀章、鈴木沙理、喜多紗斗美、岩本隆宏.

複合性局所疼痛症候群モデル動物の開発と TNF- 中和抗体の治療効果.

第 13 回トランスポーター研究会年会, 2018 年 7 月 21 日, 福岡市

柴田志保、田頭秀章、鈴木沙理、喜多知、喜多紗斗美、山浦 健、岩本隆宏.

複合性局所疼痛症候群モデルマウスに対する TNF- 中和抗体局所投与の治療効果.

第 71 回日本薬理学会西南部会, 2018 年 11 月 17 日, 福岡市.

Shiho Shibata, Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Tomo Kita, Sari Suzuki, Ken Yamaura,  
Takahiro Iwamoto.

Perineural expression of TNF- contributes to long-term mechanical allodynia in CRPS  
model mice.

The 9th Federation of the Asian and Oceanian Physiological Societies Congress,  
2019.3.28-3.31. Kobe (Japan)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

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。