

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11108

研究課題名(和文)内側不安定型膝関節症誘導モデルマウスの疼痛メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of pain mechanisms in a mouse model of medial instability-induced knee arthropathy

研究代表者

高橋 亜矢子 (AYAKO, TAKAHASHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70444544

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：モノヨド酢酸の関節内投与により誘導された膝関節症モデルマウスは、行動実験で膝痛を認めた。膝関節標本のサフラニン染色で軟骨組織の減少を認めた。脊髄スライスを用いたパッチクランプ法で脊髄後角膠様質細胞(SG細胞)より記録した微小興奮性後シナプス電流(mEPSC)は正常マウスと比較し、頻度、振幅に有意差を認めなかった。誘発性興奮性後シナプス電流(eEPSC)と、神経根入根部を一過性に高頻度刺激(100Hz、1秒間)後のeEPSCを記録し長期増強(LTP)の有無を検証した。eEPSCの振幅は正常マウスと比較し変化がなかった。現在、mEPSCの減衰時間と、LTPについてデータ解析中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

変形性膝関節症の膝痛のメカニズムは、変形や炎症による膝局所が関与するだけでなく、中枢神経の可塑性変化が関与している可能性が示唆されている。しかし、そのメカニズムは未知な部分が多い。本研究では痛みの伝導路として重要な役割を果たす脊髄後角神経細胞における神経伝達が膝関節症に伴う膝痛によりどのような変化が起きているかを解析しており、これらの結果より、よりメカニズムに沿った新しい鎮痛薬の開発や、既存の薬物が膝痛の鎮痛薬として使用できる可能性について新しい知見をもたらす可能性が期待できる。膝痛によるADL低下を改善することは要介護の高齢者を減らすことにつながり、社会貢献につながると考える。

研究成果の概要(英文)：Intra-articular administration of monosodium iodoacetate induces knee osteoarthritis and mouse showed knee pain in behavioral experiments. Safranin staining of the knee joint specimen showed a decrease in cartilage tissue. Miniature excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) recorded from spinal dorsal horn substantia gelatinosa cells (SG cells) using the patch-clamp technique with spinal cord slices showed no significant differences in frequency or amplitude compared to normal mice. Evoked excitatory postsynaptic currents (eEPSCs) and eEPSCs after transient high-frequency stimulation (100 Hz for 1 s) of the nerve root entry were recorded to verify the presence of long-term potentiation (LTP). The amplitude of eEPSCs was unchanged compared to normal mice. Data of mEPSC decay time and LTP are currently being analyzed.

研究分野：疼痛メカニズム

キーワード：変形性膝関節症 脊髄後角 興奮性シナプス伝達

1. 研究開始当初の背景

変形性膝関節症(osteoarthritis: OA)は関節軟骨の変性、退行性変化を主体とする病態で、進行とともに動作時痛や可動域制限が出現し、歩行困難を引き起こす。痛みは患者のQOLを著しく阻害し、高齢者の自立生活を制限する。国内の膝OA患者数は1,200万人とも言われており超高齢社会を迎えたわが国では今後さらなる患者数の増加が見込まれる。膝OAの痛みメカニズムを解明することは、メカニズムベースの安全で有効な鎮痛法の開発のために非常に有用である。膝OAは、関節軟の変性、退化、滑膜炎、骨棘形成など多面的な要因が関与する疾患で、障害部位が直接原因となる侵害受容性疼痛である。一方、痛みのメカニズムには、さらなる上流の因子が関与すると考えられる。なぜなら、主病変である軟骨には知覚繊維は無く、軟骨自体が疼痛の原因とならず、滑膜や関節包が痛みの原因部位であると考えられる。しかし、MRI検査などの画像撮影を行うと、60歳以上の高齢者では50%以上に軟骨、半月板などの異常を認めるが、痛みを伴う患者は一部であることから、局所の病変のみが痛みの原因ではないと考えられる。長期にわたる侵害刺激は痛みの伝達経路の可塑性を引き起こし、難治性疼痛を引き起こすと考えられる。膝OAの研究については、関節症発症のメカニズムや治療法についての研究はこれまでも活発に行われていたが、膝OAに伴う痛みのメカニズムについて、特に中枢感作に着目した研究は非常に少ない。

2. 研究の目的

そこで、本研究では膝OAの痛みのメカニズムを特に中枢神経に着目し解明することで、より安全で有効性の高いメカニズムベースの鎮痛薬の開発につなげ、膝OA患者の痛みを緩和しQOLの向上に役立てることを目的とした。

3. 研究の方法

5週齢の雄マウスを用い、全身麻酔下に右膝の内側側副靭帯を横切開し右関節内側部から関節包を切開し内側半月板を切除する内側不安定型膝関節症誘導モデルマウスを作成した。膝痛について下肢への荷重の左右差や痛み刺激に対する過敏性を行動実験で検証した。膝痛発症までの期間が長期となったため、より早期に膝痛を発症するモデルとして、全身麻酔下に膝関節内にモノヨード酢酸を投与し、膝関節症を誘導するモデルを作成し、当該マウスでも行動実験を行い膝痛について検証した。

また、膝関節組織より凍結切片を作成し、サフラニンO染色を行った。さらに、膝関節組織および脊髄後根神経節より抽出したmRNAを用い、rt-PCR法にてTNF- α 、IL-6、CGRPの発現量を測定した。

神経活動の記録はマウスより脊髄スライスを作成し、人工脳脊髄液で灌流し、パッチクランプ法を用いた。脊髄後角は神経伝達に重要な役割を果たしているため、脊髄後角膠様質細胞(substantia gelatinosa:SG)に微小電極を挿入し、細胞を-70mV電位固定し興奮性のシナプス電流を測定した。記録したシナプス電流の頻度、振幅、減衰時間を正常マウスと比較した。

4. 研究成果

本研究の計画では当初、関節不安定型膝関節症モデルを作成し、行動実験で膝関節痛を確認した。しかし、疼痛行動に有意差が出るのに術後6週以上を要し、生後12週前後のマウス脊髄スライ

スを用いた電気生理学実験は難航した。

そこで、膝関節症をモノヨード酢酸の関節内投与により誘導するモデルに変更した。マウスの左右後肢の荷重の割合を測定する Weight bearing test ではモノヨード酢酸投与後 3-14 日目に患肢への荷重が有意に減少した。また、マウスの歩行時における左右の歩幅を測定する Foot stamp test では、健側と患側の歩幅に差が生じ、患側の歩幅が有意に減少した。

膝関節のスライス標本を用いた、サフラニン O 染色を施行では、軟骨組織の減少を認め膝 OA が確認できた。これらの結果より、モノヨード酢酸の膝関節内投与マウスは、膝関節症による膝関節痛のメカニズム研究に適切なモデルであると判断した。

次に当該モデルマウスの脊髄スライスを作成し、人工脳脊髄液灌流下にパッチクランプ法を用いて SG 細胞より微小興奮性後シナプス電流(miniature Excitatory post synaptic current:mEPSC)を記録した。モノヨード酢酸投与マウスの SG 細胞における mEPSC の頻度、振幅は正常マウスと比較し変化がなかった。現在、mEPSC の減衰時間についてデータ解析中である。

また、脊髄神経根入根部を電気刺激し、誘発性興奮性後シナプス電流(evoked EPSC)を記録した。さらに、神経根入根部を一過性に高頻度刺激 (100Hz、1 秒間)を行った後、再度 evoked EPSC を記録し、刺激前と刺激後の振幅を比較することで長期増強(long term potentiation: LTP)の有無を検証した。LTP についても現在データ解析中である。

rt-PCR で膝関節および脊髄における炎症性サイトカイン TNF- α 、IL-6、CGRP の発現量を正常マウスと比較検討した。膝関節における TNF- α 、IL-6、CGRP の mRNA の発現量は正常マウスと比較し、膝関節症マウスでは有意に増加していた。脊髄での発現量については現在解析中である。本研究では、モノヨード酢酸の関節内投与により誘導された関節症による関節痛マウスの脊髄後角における神経伝達の可塑性について検証を行った。結果について現在解析中で最終的な結論は述べられないが、脊髄レベルでの神経伝達の長期増強が、難治性の膝痛のメカニズムに関与している可能性が示唆される。今後、脊髄レベルにとどまらず、視床や海馬での神経伝達の変化についても検証し、より詳細なメカニズムの解明を目指す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 弓場智雄、小山佳久、高橋垂矢子、藤野裕士、島田昌
2. 発表標題 膝関節症に対するパルス高周波法（PRF）の抗炎症作用
3. 学会等名 日本麻酔科学会第69回学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 弓場智雄、小山佳久、高橋垂矢子、藤野裕士、島田昌
2. 発表標題 膝関節症モデルマウスに対する坐骨神経パルス高周波法（PRF）の鎮痛効果と抗炎症作用について
3. 学会等名 NUER02022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 弓場智雄、小山佳久、高橋垂矢子、藤野裕士、島田昌
2. 発表標題 変形性膝関節症に対するパルス高周波法（PRF）の抗炎症作用とそのメカニズム
3. 学会等名 第98回日本解剖学会近畿支部学術集会
4. 発表年 2022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	井浦 晃 (IURA AKIRA) (40467551)	大阪大学・大学院医学系研究科・助教 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------