

令和元年6月20日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17246

研究課題名(和文)女性ホルモンが神経障害性疼痛に及ぼす影響とその制御機構の解明

研究課題名(英文)The effect of female hormone on neuropathic pain and the elucidation of its control mechanism

研究代表者

山形 和彰(Yamagata, Kazuaki)

鹿児島大学・医歯学域附属病院・助教

研究者番号：40784195

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛の疫学的特徴として、男性よりも女性に多いことが知られている。しかし、神経障害性疼痛に対するエストロゲンの作用については未解明な点が多い。本研究では性周期におけるエストロゲンの多寡を再現した神経障害性疼痛モデルラットを用いてエストロゲンが神経障害性疼痛に及ぼす影響とその作用機序について検討を行った。その結果、エストロゲンは神経障害性疼痛を増悪させ、その機序として一次感覚神経または脊髄路核尾側亜核が関与している可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛の疫学的特徴として、男性よりも女性に多いことが知られている。このような性差が生じる原因として、月経周期が疼痛閾値に大きく関与していることから、女性ホルモンであるエストロゲンが、症状を増悪することが示唆されている。しかし、神経障害性疼痛に対するエストロゲンの作用については未解明な点が多い。本研究では、エストロゲンは神経障害性疼痛を増悪させる機序として一次感覚神経または脊髄路核尾側亜核が関与している可能性を明らかにした。今後はこの二つの領域で詳細なエストロゲン作用部位を検討予定である。これにより神経障害性疼痛の新たな創薬ターゲット部位を提示できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In the neuropathic pain, women experience more severe levels of pain than men. Previous studies have shown that estrogen can affect the generation and transmission of neuropathic pain. However, the specific regulatory mechanism is still unclear. Thus, to determine whether the estrogen status modulates neuropathic pain, we performed behavioral and immunohistological experiments in ovariectomized rats treated with high-dose estrogen (HE) or low-dose (LE) for 2 days. In the behavioral experiment, the HE group showed significant potentiation of nocifensive behavior compared with the LE group. Immunohistochemistry showed that HE evoked a significantly greater number of cells that were immunoreactive pERK in the trigeminal subnucleus caudalis than LE. Thus, estrogen may be a risk factor for neuropathic pain, and modulate pain sensitivity by affecting signaling pathways in the trigeminal subnucleus caudalis or primary afferents.

研究分野：外科系歯学

キーワード：エストロゲン 神経障害性疼痛 性差 pERK

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

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、国際疼痛学会によって「体性感覚伝導路の損傷や病変によって生じる痛み」と定義される難治性疼痛である。自発痛に加え、触覚刺激で激しい痛みを誘発するアロディニアや、痛覚過敏と呼ばれる病的な痛みを特徴とし、侵害刺激に対する警告系として機能する生理的な痛みとは区別される。米国では約1億1,600万人の慢性痛患者のうち、17.9%が神経障害性疼痛であるとされている(Toth et al. Pain Med 2009)。また、ヨーロッパでの試算では、個人の苦痛に加えて、その経済的損失は600億ドルにも達すると言われている(Breivik et al. Eur J Pain 2006)。このように神経障害性疼痛は克服すべき課題であるが、現在まで有効な治療法が確立されておらず、患者に生活の質を低下させるに十分な苦痛を与えている。

神経障害性疼痛の疫学的特徴として、男性よりも女性に多いことが知られている。フランスやオランダでの調査によると、約2/3が女性であると報告されている(Bouhassira et al. Pain 2008, Dieleman et al. Pain 2008)。このような性差が生じる原因として、女性ホルモンであるエストロゲンが、症状を増悪することが示唆されている(Ammandusson et al. Neuroendocrinol 2013)。我々もこれまでに、エストロゲンがラットの一次感覚神経で、侵害受容器としての機能を果たすTRPV1やAnoctamin1といった受容体の発現を亢進し、疼痛を増悪させることを報告した(Yamagata et al. Endocrinology 2016)。しかしながら、神経障害性疼痛に対するエストロゲンの作用については未解明な点が多い。神経障害性疼痛は、動物モデルを用いてその発症メカニズムが明らかとなりつつあるが、性差に着目した研究は少ない。

女性ホルモンが神経障害性疼痛に及ぼす影響を検討する本研究により、新たな創薬部位を提示できる可能性や神経障害性疼痛に対する性差医学の一助となる可能性があると考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

研究の背景にも述べたように、神経障害性疼痛の疫学的特徴として、男性よりも女性に多いことが知られている。このような性差が生じる原因として、月経周期が疼痛閾値に大きく関与していることから、女性ホルモンであるエストロゲンが、症状を増悪することが示唆されている。しかし、神経障害性疼痛に対するエストロゲンの作用については未解明な点が多い。

以上のことから本研究では性周期におけるエストロゲンの多寡を再現した神経障害性疼痛モデルラットを用いて、エストロゲンが神経障害性疼痛に及ぼす影響とその作用機序について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

<動物モデルの作製>

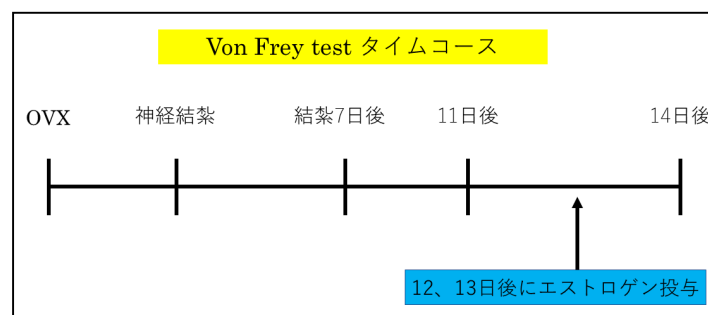
本モデルはラットの性周期におけるエストロゲン血中濃度の多寡を再現したモデルである。

- (1) 体重210~230g 雌性SDラットの卵巣を摘出する(OVX)。エストロゲンのみの作用を検討するモデルを作製するため、卵巣を摘出することで、エストロゲンを含む卵巣ホルモンを一度枯渇させる。
- (2) 卵巣摘出7日後に眼窩下神経をナイロン糸で結紮し、神経障害性疼痛モデルを作製する。
- (3) 卵巣摘出前、眼窩下神経結紮前、結紮7日後、11日後に眼窩下神経支配領域を機械刺激することで神経障害性疼痛の発症を確認する。
- (4) 神経障害性疼痛を発症したラットを2群に分け、高容量(40 µg:HE群)または低容量(4 µg:LE群)のエストロゲンを眼窩下神経結紮後12日目、13日目に2日間連続皮下注射する。
- (5) 実験日にエストロゲン投与後の膣スミアの変化を検鏡で観察し、実験終了後、心臓の左室より動脈血を採取し、血清エストロゲン濃度を測定した。

<行動学的検討>

・非侵害性機械刺激(von Frey test)

エストロゲンの神経障害性疼痛に対する修飾作用を行動学的に検討するため、von Frey testを行った。ラットを安静状態とした後、神経障害性疼痛の発症の程度を評価するため、1~26gの規定の荷重を負荷できる6種類のプラスチックモノフィラメントを、最小の1gから傷害側の口髭パット部を刺激し、逃避閾値を測定した。これによりエストロゲンは神経障害性疼痛を増悪させるのか?を検討した。



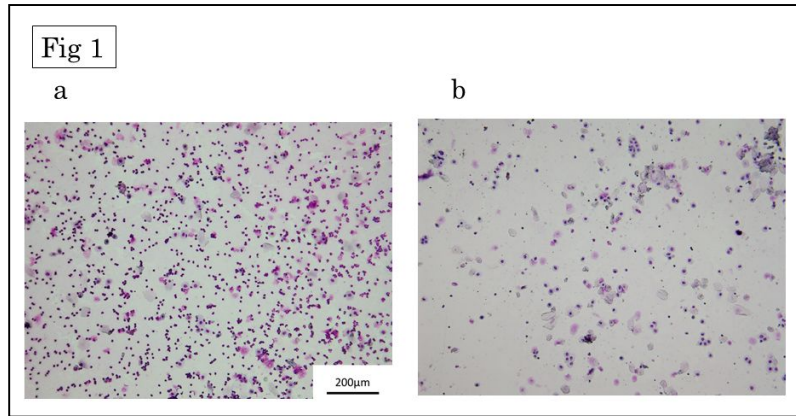
<免疫組織学的検討>

エストロゲンの神経障害性疼痛に対する修飾作用を免疫組織学的に検討するため、ニューロン興奮性の指標である pERK の免疫反応を調査した。神経結紮 14 日後の実験終了後、モノフィラメントで 1Hz・15 分間刺激し、灌流固定した。その後、厚さ 50 μm の凍結切片を作成し、通法に従い pERK の免疫染色を行った。

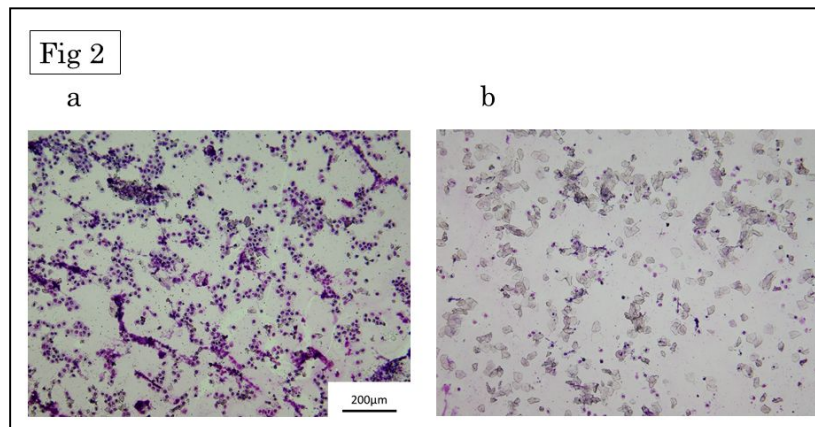
4. 研究成果

<動物モデルの作製>

エストロゲン投与後のスメア像は、LE 群では発情休止期に類似した白血球を主体とする像 (Fig.1.a) または発情後期に類似した白血球や少数の有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像が見られた (Fig.1.b)。



一方、HE 群では発情前期に類似した有核上皮細胞のみ (Fig.2.a) または有核上皮細胞と角化上皮細胞が混在した像が見られた (Fig.2.b)。



エストロゲン投与後の血中濃度は、HE 群では 101.8 ± 14.9 pg/ml、LE 群では 5.71 ± 1.7 pg/ml であった。これまでエストロゲンの侵害受容に対する修飾作用を検討するために、OVX 動物に徐放性のペレットを埋入する方法や皮下投与する方法が用いられてきたが、生理的な血中濃度を再現する方法は未だコンセンサスが得られていない。ラットの生理的な血中エストロゲン濃度は約 2~145 pg/ml であることから、本研究では血中エストロゲン濃度の多寡を生理的範囲内で再現したモデルを作製できたと考えられる。

<行動学的検討>

26 g をカットオフ値とし、1~26 g の 6 種類のモノフィラメントで触刺激に対する逃避閾値を計測した。エストロゲン投与前はいずれのポイントでも、閾値に有意差は認めなかったが、エストロゲン投与後は HE 群の方が有意に逃避閾値が低下した (Fig3)。

以上のことからエストロゲンは神経障害性疼痛を増悪することを確認した。

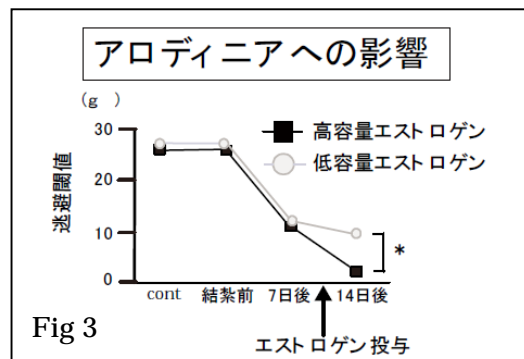


Fig 3

< 免疫組織化学的検討 >

pERK陽性細胞発現は門 (obex; 最後野の上端) を基準に、-3.5 mm までの10枚毎の切片を顕微鏡下 (×100) で観察し、陽性細胞数をHE群とLE群とで比較した。

その結果HE群の方が有意にpERK陽性細胞数を発現していることが分かった (Fig 4)。以上のことから、エストロゲンは神経障害性疼痛を増悪させることが、免疫組織化学的検討からも明らかとなった。また、エストロゲンの作用部位として一次感覚神経または脊髄路核尾側亜核であることが示唆された。

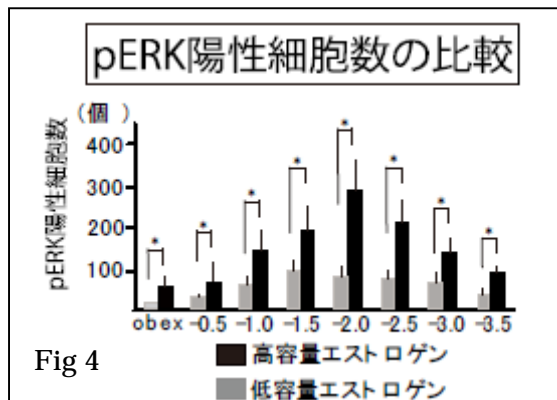
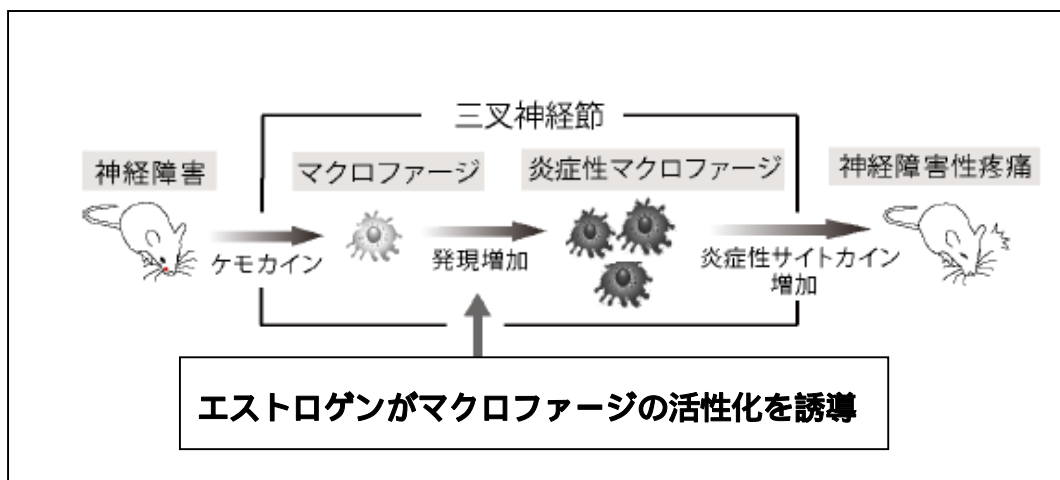


Fig 4

< 今後の展望 >

本研究では、エストロゲンが神経障害性疼痛を増悪すること、さらにその作用部位が一次感覚神経または三叉神経脊髄路核尾側亜核である可能性を明らかにした。今後は、この二つの部位で更なる詳細なエストロゲン作用部位を明らかにしていく予定である。例えば近年、一次感覚神経において、マクロファージの活性化を介した神経炎症が神経障害性疼痛の増強を導くことが報告されている (Ji RR et al. Science 2016)。また、第一枝、第二枝、第三枝の各細胞体が近接するという解剖学的特徴を持つ頭頸部領域の神経障害性疼痛では、特にマクロファージの活性化が重要であることが示唆されている (Batbold et al. J Neuroinflammation 2017)。

しかし、マクロファージに対するエストロゲンの作用については明らかとなっていない。これまでに、リウマチなどの自己免疫疾患モデル動物のマクロファージには、エストロゲン受容体が過剰発現しており、エストロゲンがマクロファージの活性化を誘導することで炎症症状を増悪する可能性が報告されている (Cutolo et al. Ann N Y Acad Sci 2006)。この事実は、女性に多いとされる神経障害性疼痛においても、エストロゲンが一次感覚神経でマクロファージの活性化を促進することで、神経障害性疼痛を増悪する可能性を示すものである。以上のことから今後はマクロファージを介したエストロゲンによる神経障害性疼痛増悪機序を解明する予定である。



5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

Yamagata K., Hirose Y, Tanaka K, Yoshida M, Ohnuki T, Sendo R, Niwa H, Sugimura M
Anesthetic Management of a Patient with a Vagus Nerve Stimulation Device (査読有)
Anesth Prog (In Press)

Yamagata K., Kawamura A, Kasai S, Akazawa M, Takeda M and Tachibana K
Anesthetic management of a child with Kagami-Ogata syndrome complicated with marked tracheal deviation: a case report (査読有)
2018 JA Clinical Reports. 4:62-65
<https://jaclinicalreports.springeropen.com/articles/10.1186/s40981-018-0199-5>

〔学会発表〕(計 2 件)

山形 和彰

舌弁切離術の麻酔管理 11 例の検討 日本小児麻酔学会第 24 回大会 2018 年

山形 和彰

Kagami-Ogata 症候群の麻酔経験 日本小児麻酔学会第 23 回大会 2017 年