

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07853

研究課題名(和文) 骨格筋再生による疼痛性瘢痕治療法の研究：間葉系幹細胞の選択と細胞外環境の解析

研究課題名(英文) Research on pathophysiology toward a treatment method for painful scars by regenerating the skeletal muscle system

研究代表者

牛田 享宏 (Ushida, Takahiro)

愛知医科大学・医学部・教授

研究者番号：60304680

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では組織損傷の治療効果を評価するために、2つのモデル動物を作成。モデル1)では、マウスの足底部瘢痕性疼痛モデルを用い、機械閾値の低下と腫脹が確認。ワクシニアウイルス接種家兎の炎症皮膚抽出液(NTP)局所投与で腫脹減少、疼痛閾値改善を観察。モデル2)では、前脛骨筋剥離モデルを使用し、NTP局所投与で同様の結果が得られた。解析ではモデル1)を用いて組織再生に関する分子機序を探求。RT-PCR法とマイクロアレー法を用いて遺伝子発現を分析し、ECM-receptor interactionなどのカスケードがNTP治療で抑制され、これが瘢痕や疼痛増悪に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

瘢痕性疼痛モデル動物を用いて筋肉および周囲組織の再生に関わる細胞外環境と反応の分子機序の解明を目指した。DRGではTGF-beta signaling pathway、ECM-receptor interaction(以下ERI)とNeurotrophin signaling pathwayは瘢痕手術後に活性化されたが、NTP治療後に抑制された。また、足底瘢痕組織ではERIとCytokine-cytokine receptor interactionが活性化され、ERIがNTP治療で抑制が見られた。NTP治療で抑制されたカスケードが瘢痕やそれによる痛みの増悪への関与が推察された。

研究成果の概要(英文)：In this study, two animal models were created to evaluate the effects of treatment of tissue damage. In model 1), a mouse model of plantar cicatricial pain was used, and a decrease in mechanical threshold and swelling were observed. Observed decreased swelling and improved pain threshold after topical administration of an inflammatory skin extract (NTP) from vaccinia virus-inoculated house rabbits. In model 2), a tibialis anterior muscle avulsion model was used and similar results were obtained with topical administration of NTP. In our analysis, we used model 1) to explore molecular mechanisms related to tissue regeneration, and analyzed gene expression using RT-PCR and microarray methods, suggesting that cascades such as ECM-receptor interaction are suppressed by NTP treatment, which may be involved in scarring and pain exacerbation.

研究分野：慢性疼痛

キーワード：慢性疼痛 瘢痕性疼痛 遺伝子解析 ノイロトロピン

1. 研究開始当初の背景

損傷した筋組織では、線維芽細胞の増殖と筋芽細胞の分化による筋組織再生反応が起るが、過剰増殖と異常分化による癒痕化と筋萎縮を頻発し、さらに異常な血管新生と末梢神経伸長を伴って痛みや浮腫、運動機能障害を発症する。しかも、痛みは、神経の直接損傷による限局性から、時間と共に損傷部位外に伝播する慢性痛の特徴を持つものになり、患者の生活機能を障害し、大きな社会問題になっている (Pain 2000;88:259, Pain 1999;80:95)。しかしながら、その治療法はリハビリテーション学の対称として運動などによる残存筋肉組織の能力維持やアップによる代償的なもの以外になく、分子や遺伝子レベルで作用する直接的で有効な治療方法の開発が待たれる。

2. 研究の目的

本研究の目的は筋肉や組織の損傷に対する組織学的および機能的な治療に有効な細胞と細胞外因子の解明である。具体的な方法論としては細胞移植や薬物療法など今後考えられるが、今回はワクシニアウイルス接種家兔の炎症皮膚抽出液による癒痕組織改善と同時にその際の痛み関連病態の変化などについても検討する。

3. 研究の方法

病態を再現するモデル実験系が必要であり、既存のラットモデル系に対して、技術革新により遺伝子改変が容易なマウス(癒痕化や痛み発症の候補分子の関与の検証が容易となる)を実験動物として、その前脛骨筋の人為的損傷に因る癒痕化慢性痛モデル系および足底の癒痕作成モデルを確立している (Biores Open Access 2013;2:295, J Biol Chem 2015;290:22771, Molecular Pain 2018 in press, J Aichi Med Univ Assoc 2015;43:17)。モデル動物では von Frey 刺激に対する反応閾値(以下機械閾値)が低下することが明らかになっており、今回モデル1(マウスの足底部を剥離する方法による)およびモデル2(前脛骨筋剥離モデル)に対して、von Frey 刺激に対する反応閾値(以下機械閾値)を調査したうえで、ワクシニアウイルス接種家兔の炎症皮膚抽出液(以下 NTP)を局所投与し、その際の機械的閾値の変化、癒痕を作成した末梢部位およびその部位に神経分布を持つ後根神経節細胞について、Total RNA を抽出した。さらに RT-PCR 法とマイクロアレー法を用いて発現遺伝子を同定し、Gene set enrichment 解析をした。

4. 研究成果

モデル1)マウスの足底部を剥離したモデルは、von Frey 刺激に対する反応閾値(以下機械閾値)の低下と足の腫脹が観察された。ワクシニアウイルス接種家兔の炎症皮膚抽出液(以下 NTP)を局所投与した結果、腫脹の減弱、疼痛閾値の改善がみられた。

モデル2)前脛骨筋剥離モデルでは、足底部癒痕モデルと同様に、機械閾値の低下と足の腫脹が観察された。NTP を局所投与した結果、腫脹の減弱および機械閾値の改善が得られた。解析はモデル1)を用いて筋肉および周囲組織の再生に関わる細胞外環境と反応の分子機序の解明を目指した。Sham 群、Sham + NTP 治療群、癒痕群、癒痕 + NTP 治療群から、足底組織および L4-L5 部位の DRG を採取し、Total RNA を抽出。RT-PCR 法とマイクロアレー法を用いて発現遺伝子を同定し、Gene set enrichment 解析をした。DRG では TGF-

beta signaling pathway、ECM-receptor interaction と Neurotrophin signaling pathway は癒痕手術後に活性化されたが、NTP 治療後に抑制された。また、足底癒痕組織では ECM-receptor interaction と Cytokine-cytokine receptor interaction が活性化され、ECM-receptor interaction が NTP 治療で抑制が見られた。NTP 治療で抑制されたカスケードが癒痕やそれによる痛みの増悪に関与している可能性があるものと推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yabuki S, Ip AKK, Tam CK, Murakami T, Ushida T, Wang JH, Shin HK, Sun WZ, Williamson OD. | 4. 巻 57(2) |
| 2. 論文標題 Evidence-Based Recommendations on the Pharmacological Management of Osteoarthritis and Chronic Low Back Pain: An Asian Consensus. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Asian J Anesthesiol. | 6. 最初と最後の頁 37-54 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.6859/aja.201906_57(2).0003 | 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 Li Yuqiang, Iida Hiroki, Kimata Koji, Zhuo Lisheng, Ota Akinobu, Kimura Shinya, Yin Xiaojian, Deie Masataka, Ushida Takahiro | 4. 巻 15 |
| 2. 論文標題 Establishment of a mouse model for injury-induced scar formation and the accompanying chronic pain: Comprehensive microarray analysis of molecular expressions in fibrosis and hyperalgesia | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Pain | 6. 最初と最後の頁 1.74481E+14 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806919892389 | 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 寺嶋祐貴, 井上真輔, 牛田享宏 | 4. 巻 38(1) |
| 2. 論文標題 特集 腰痛診療perspective II 腰痛診療 (3)慢性腰痛に対する集学的治療. | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pharma Medica | 6. 最初と最後の頁 33-37 |
| 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 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 6)寺嶋祐貴, 牛田享宏. | 4. 巻 77(12) |
| 2. 論文標題 【慢性疼痛update-実地診療に役立つ最新知見-】慢性疼痛治療ガイドライン. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 日本臨床 | 6. 最初と最後の頁 1917-1922 |
| 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 - |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 尾張慶子, 牛田享宏 | 4. 巻 32(5) |
| 2. 論文標題 【整形外科医が知っておきたい薬の知識-私はこちら使う-】病態からみた治療薬 非特異性腰痛. | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Orthopaedics | 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) 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8件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 3件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 飯田博己, 李玉強, 木全弘治, 太田明伸, 周軒, 木村伸也, 牛田享宏 |
| 2. 発表標題 ノイロトロピンの疼痛緩和効果に関わる遺伝子発現変化の網羅的解析 |
| 3. 学会等名 第42回日本疼痛学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ushida Takahiro |
| 2. 発表標題 Electro and other neurophysiological assessment of chronic intractable neuropathic pain |
| 3. 学会等名 8th Asian Pain Symposium in Korea Presidential Lecture (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ushida Takahiro |
| 2. 発表標題 Neurophysiological mechanisms in chronic intractable musculoskeletal pain. |
| 3. 学会等名 3rd SUSTech International Forum of Pain Medicine (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牛田享宏, 西原真理, 柴田由加, 神谷妙子, 山羽亜実 |
| 2. 発表標題 疼痛と神経科学 疼痛の神経生理学研究 |
| 3. 学会等名 第49回日本臨床神経生理学会学術大会シンポジウム (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牛田享宏 |
| 2. 発表標題 慢性疼痛の分類の開発の必要性とその取り組み |
| 3. 学会等名 第34回日本整形外科学会基礎学術集会スイーツセミナー (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 牛田享宏 |
| 2. 発表標題 痛み政策の現状と課題 |
| 3. 学会等名 第24回日本ペインリハビリテーション学会学術大会特別講演 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 牛田享宏 |
| 2. 発表標題 神経障害性疼痛の病態と治療 |
| 3. 学会等名 第26回日本脊椎・脊髄神経手術手技学会学術集会Spine Leader's Lecture (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ushida Takahiro |
| 2. 発表標題 Assessment and Treatment of Musculoskeletal Chronic Pain |
| 3. 学会等名 The 15th Asian and Oceanic Society of Regional Anesthesia and Pain Medicine Congress (AOSRA-PM2019) Educational Lecture. (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計2件

| | |
|------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 大川 淳、平田 仁 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 中山書店 | 5. 総ページ数 240 |
| 3. 書名 整形外科診療のためのガイドライン活用術 | |

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 大鳥精司、高相晶士、出家正隆、吉矢晋一 | 4. 発行年 2019年 |
| 2. 出版社 南山堂 | 5. 総ページ数 484 |
| 3. 書名 TEXT整形外科学 | |

〔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 | 木全 弘治 (Kimata Koji) (10022641) | 愛知医科大学・疼痛医学講座・名誉教授 (33920) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 | 太田 明伸 (Ohta Akinobu) (30438048) | 愛知医科大学・医学部・講師 (33920) | |

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 |
|---------|---------|
| | |