

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10370

研究課題名（和文）肥満および脂質異常症による術後痛増強メカニズムの解明

研究課題名（英文）High-fat diet increases postoperative pain in rats

研究代表者

城戸 幹太（Kido, Kanta）

神奈川県立歯科大学・歯学部・准教授

研究者番号：40343032

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）：本研究で、高脂肪食摂取により肥満となったラットは、手術後の自発痛の上昇と機械刺激に対する逃避行動の閾値の低下から、術後痛が増強・遷延した。末梢および中枢神経組織のトランスクリプトーム解析を行ったところ、脊髄では大きな遺伝子発現変化を認めず、末梢神経の細胞体である脊髄後根神経節で19個の遺伝子の発現変化を認めた。肥満の術後痛増強メカニズムの一つに脂質代謝関連遺伝子による末梢性感作の増強が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な肥満人口増加により、肥満患者の診療機会が増え、様々な周術期管理上の問題が顕在化している。近年、多くの肥満患者の術後痛が悪化・遷延し、生活の質が著しく損なわれていることが明らかとなった。しかし、なぜ肥満者は術後の痛みが増強・遷延するのか、その詳細なメカニズムは分かっていない。本研究から、脂質代謝に関わる遺伝子が神経の末梢性感作を増強して術後の痛みを増強遷延していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In the present study, obese rats induced by high-fat diet intake had enhanced and prolonged postoperative pain including elevated spontaneous pain score and lower mechanical threshold. Transcriptome analysis of peripheral and central nervous tissue revealed no major gene expression changes in the spinal cord and 19 gene expression changes in the dorsal root ganglia. Increased peripheral sensitization by genes related to lipid metabolism was suggested as one of the mechanisms by which obesity enhances postoperative pain.

研究分野：歯科麻酔学

キーワード：術後痛 肥満 トランスクリプトーム解析

1. 研究開始当初の背景

近年、世界の平均寿命延長を背景に肥満人口が急増し、すでに全世界人口の 30%を突破している。このため、肥満患者の診療機会が増加し、様々な医学管理上の問題が顕在化している。特に肥満患者が手術を受ける場合、術前からの種々の併存疾患に加え、術中術後の呼吸・循環障害、創傷治癒遅延・感染などの合併症が生じやすく、入院期間延長や生活の質の低下が生じ、医療経済上問題となっている。これらに加え、近年多くの肥満患者が手術後の痛みに対して十分な治療を享受できていないこと、その痛みが数ヶ月~数年にわたって遷延し、生活の質を著しく低下させていることが明らかとなった。術後痛は、特に肥満患者に必要な早期離床を阻害、ストレスを増強し、さらなる合併症発症の危険因子となる。肥満患者の術後疼痛管理が成功しない原因として、1つに肥満の臨床的病態による疼痛管理の困難性、すなわち薬剤の至適投与量決定の難しさ、呼吸機能低下や睡眠時無呼吸存在下での麻薬使用の制限、肝機能障害、神経ブロックの技術的困難性、などがあげられる。もう1つの原因として、肥満や高脂血症状態が細胞・分子レベルでの病態生理・組織学的変化を生じ、手術などの侵害刺激に対して疼痛増強を惹起する、いわゆる“痛がり”となるような何らかのメカニズムが存在している可能性が最新の基礎研究から示唆されている。しかし、この肥満が術後痛を増強するメカニズムに関して詳細は不明である。

2. 研究の目的

肥満や高脂血症の病態が、これまで報告されてきた術後痛成立機序に加え、どのような新しい機序で術後痛を増強するのだろうか、そしてその機序を解明することで、肥満患者に安全で効果的な新しい術後痛管理を提供できないだろうか。これらの疑問を解決するため、本研究では、以下の点の解明を具体的な目的とする。(1)ラット術後痛モデルの行動評価法を用いて体重の増減やカロリーコントロールが術後痛にどのような影響を与えるのか(肥満は本当に痛いのか・減量は効果があるのか)(2)電気生理学的手法を用いて切開後の一次知覚神経線維の侵害受容感作様式が肥満状態でどのように変化するのか、中枢性感作の可能性はあるのか(神経はどう修飾されるのか)(3)次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現網羅的解析法を用いて、肥満によって特異的に発現する術後痛関連遺伝子は何か、またタンパクは何か(何が痛みの責任分子か)

3. 研究の方法

当施設の動物実験倫理委員会の承認を受け、実験指針に従って実施した。本研究では 4 週齢または 9 週齢の雄性 Wistar 系ラットを用いた。

(1)術後痛モデルの作成：ラット手術後痛モデルは、Brennan の方法に準じて作成した。ラットに 3-4%のセポフルランを吸入させ、緩徐に麻酔を導入・維持した。次に、自発呼吸下に右足底の踵から 5 mm 足趾側から縦方向に 10 mm の切開を皮膚、筋膜に行った。切開部位から湾曲したピンセットを直下にある短趾屈筋の真下に挿入し、短趾屈筋に切開・伸展させた。皮膚を 50 ナイロン縫合糸によって 2ヶ所マットレス縫合で閉創し、ゲンタマイシン軟膏を塗布した。

(2)肥満ラットモデルの作成：4 週齢のラット 16 匹を 7 日間の馴化の後、高脂肪食群と対照群に無作為に割り付けた。高脂肪食群では高脂肪食(D12451, Research Diets, New Brunswick, NJ, USA)を与えた。対照群では標準食を与えた。両群とも割り付け時と割り付けから 1 週間ごとに体重を計測した。また、割り付けから 8 週間後の時点で、実験動物用体組成計(ImpediVET, impedimed Inc., Carlsbad, CA, USA)を用いて体脂肪量の測定を行った。別の実験として 9 週齢のラットを高脂肪食群と対照群に無作為に割り付け、すべてのラットで Brennan 手術を施行した。

(3)疼痛関連行動解析：術後痛の評価の指標として、3 つの疼痛関連行動(自発痛関連行動、機械刺激に対する逃避閾値、熱刺激に対する逃避潜時)を経時的に観察した。行動解析は手術前、手術 3 時間後、1 日後、2 日後、4 日後、7 日後、10 日後、14 日後、18 日後、21 日後に行った。

(4)電気生理学的解析：Brennan 手術後 4 日目にラット後脛骨神経ならびにそれらの神経支配領域の無毛の後足部皮膚を一塊として取り出した。この標本を人工合成間質液を灌流させたチャンパー内に維持した。皮膚を下にして後脛骨神経をパラフィン油で満たした記録チャンパーの小さな穴から引き出し、鏡の上に置いた後、顕微鏡下で神経束を鋭利なピンセットを用いて 1 本ずつに裂いた。単一神経を白金電極上に置き、活動電位の変化を記録した。皮膚を直径 1 mm のガラス棒で押すことによる活動電位の発生頻度の出現や変化を確認することで皮膚受容野を同定した。機械刺激はサーボモータ (Series 300C Dual Mode Servo System, Aurora Scientific, Aurora, Ontario, Canada)を用いて行い、2 分間活動電位を測定した後、受容野に 5、10、20、40、80 および 120 mN の機械刺激を 2 秒間、60 秒の間隔を空けて加えた。活動電位が誘発された時の刺激の強さを機械閾値とした。

(5)トランスクリプトーム解析：高脂肪食群と対照群のラットに Brennan 手術を行い、術後 4 日目に L3-5 の高さの脊髄と後根神経節(DRG)を採取した。NucleoSpin RNA/Protein Kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany)を用いて、全量 RNA を抽出した。イルミナ NovaSeq6000 シーケンサーを用い RNA シーケンスを行った。シーケンスリードは 150bp の paired-end リ

ードとして FASTQ 形式ファイルで作成した。HISAT2 ソフトウェアを用いて、シークエンスデータをラット参照ゲノム (rn6) にマッピングして BAM ファイルを作成した。StringTie ソフトウェアを用いて、データをアセンブルしてスプライシングバリエーションの差も考慮した mRNA の発現量を定量した。さらに 2 群間で、DESeq2 ソフトウェアを用いて、発現差異解析を行った。個々の遺伝子の発現量についての確率分布 (負の二項分布) を推定し、群間差を検定した。Benjamini-Hochberg 法で多重比較を補正して q 値 (補正 p 値) が 0.05 より小さい場合を発現変動遺伝子 (DEG: differentially expressed gene) と定義した。

4. 研究成果

(1) 高脂肪食の投与はラットを肥満させる

高脂肪食群のラットの体重は対照群より増加した (図 1 A)。高脂肪食投与から 8 週目の体脂肪率は高脂肪食群で $46.2 \pm 4.0\%$ (平均 \pm SEM)、対照群で $37.6 \pm 6.3\%$ であった (図 1 B, $p = 0.002$)。

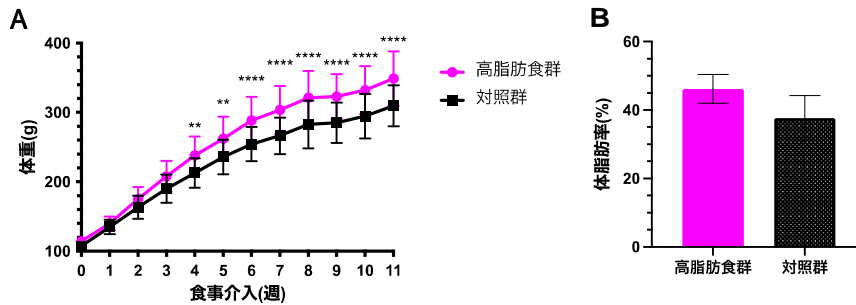


図 1. 高脂肪食投与による肥満の形成

(2) 肥満ラットは術後痛が増強・遷延する

Brennan 手術後のガーディングペインスコアは、高脂肪食群では術後 2 日目までは対照群より高かった (図 2 A)。機械刺激に対する閾値は、両群とも手術後直ちに低下したが、対照群では術後 7 日目で術前値まで回復したのに対し、高脂肪食群では回復に 21 日を要した (図 2 B)。熱刺激に対する潜時は、高脂肪食群で術後 14 日目と術後 21 日目のみ低下した (図 2 C)。

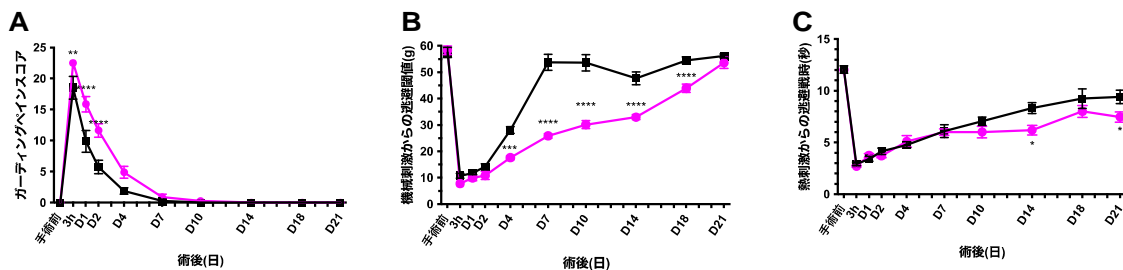


図 2. 疼痛関連行動

(3) 手術後肥満ラットは機械刺激による末梢神経の興奮性は変化しない

記録したすべての神経は機械感受性 C 線維であった。活動電位を誘発する機械閾値は高脂肪食群と対照群で統計的に有意差はなかった (図 3 A, $p = 0.473$)。また、段階的荷重による総活動電位数も、高脂肪食群でやや総数が多い傾向であったものの、有意差は認められなかった (図 3 B, $p = 0.448$)。

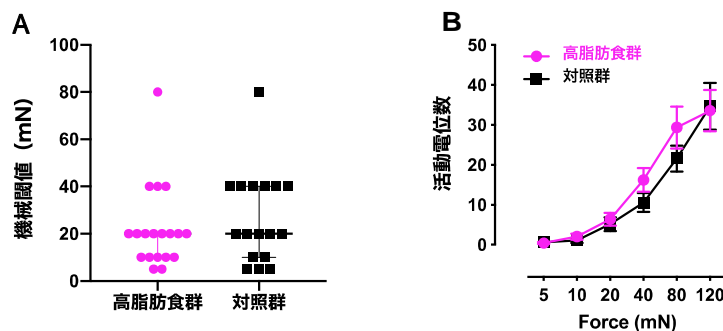


図 3. ラット後脛骨神経における単一活動電位記録

(4) Brennan 手術をした肥満ラットの脊髄での全遺伝子発現特性は変化しない
260/280 比は 2.16 ± 0.13 であった。シーケンスされたリード長の平均は 7,087,841,181bp であり、リード数の平均は 47,617,083 本であった。平均の GC 含有(塩基配列に占めるグアニンとシトシンの割合)は 50.0% であった。HISAT2 ソフトウェアでのマッピング率は 87.1% であった。StringTie ソフトウェアを用いて発現が確認できた遺伝子は 32,884 個であった。脊髄では DEG は 293 個であった。しかし、すべての DEG は変動の差が 2 倍以下であった。

(5) Brennan 手術をした肥満ラットの後根神経節(DRG)では内分泌疾患や脂質代謝と関連する遺伝子の発現変化が起きている
260/280 比は 2.12 ± 0.05 であった。シーケンスされたリード長の平均は 7,190,179,598bp であり、リード数の平均は 47,398,293 本であった。平均の GC 含有(塩基配列に占めるグアニンとシトシンの割合)は 49.9% であった。HISAT2 ソフトウェアでのマッピング率は 87.4% であった。StringTie ソフトウェアを用いて発現が確認できた遺伝子は 32,884 個であった。DRG では DEG は 19 個であった。もっとも差があったのは Rps6 遺伝子であった。

本研究で高脂肪食摂取により肥満となったラットは、ガーディングペインスコアの上昇と機械刺激に対する逃避行動の閾値の低下から、術後痛が増強・遷延していると思われた。肥満したラットで末梢神経(一次求心性線維)の手術による侵害受容感作を観察したが、神経の興奮性にほぼ違いは認めなかった。末梢および中枢における未知の分子生物学的メカニズムを探索するために、トランスクリプトーム解析を行ったところ、脊髄では大きな遺伝子発現変化を認めず、中枢性感作の可能性は小さいと思われた一方で、末梢神経の細胞体である DRG では、19 個の遺伝子で発現変化を認め、疼痛伝達・認知を増強させる末梢性感作に、遺伝子レベルで関与している可能性が示唆された。

以上から、肥満の術後痛増強メカニズムの一つに、脂質代謝関連遺伝子が末梢性に関与していることが推察された。今後さらに研究を進めて行く予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Kido Kanta, Katagiri Norika, Kawana Hiromasa, Sugino Shigekazu, Konno Daisuke, Suzuki Jun, Yamauchi Masanori, Sanuki Takuro	4. 巻 534
2. 論文標題 Effects of magnesium sulfate administration in attenuating chronic postsurgical pain in rats	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 395 ~ 400
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.11.069	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 Kido Kanta, Katagiri Norika, Kawana Hiromasa, Sugino Shigekazu, Yamauchi Masanori, Masaki Eiji	4. 巻 11
2. 論文標題 Nociceptive Sensitization by Activation of Protease-Activated Receptor 2 in a Rat Model of Incisional Pain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 144 ~ 144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/brainsci11020144	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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	杉野 繁一 (Sugino Shigekazu) (00423765)	東北大学・大学病院・講師 (11301)	

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
---------	---------