

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18232

研究課題名(和文)オピオイド因性痛覚過敏における小胞体ストレスの関与の検証

研究課題名(英文) Involvement of endoplasmic reticulum stress in opioid-induced hyperalgesia

研究代表者

飯田 高史 (IIDA, TAKAFUMI)

旭川医科大学・医学部・助教

研究者番号：40468442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：頭部よりL3までのカテーテル留置後(day5)でラットのCCIモデルを作成した。疼痛閾値が低下したことを確認した後(day15)モルヒネを5日間腹腔内投与した。day15とday20で、モルヒネ投与によるHyperalgesiaの出現頻度はなかなか安定せずむしろ疼痛閾値は上昇する個体も認められた。当初MnSOD産生ベクターとして考えていたHSVは国内の供給がなく、マイアミ大学でも既に生産が中止していたため、当初の研究計画に加えて神経細胞内でSOD2を産生するvectorを作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昨今の医療の進歩によって、患者の平均寿命、ガン患者の生存率は上昇している。これに伴い癌性、非癌性を問わず慢性疼痛患者は増加し、それがここ10年のオピオイドの使用量の急増を引き起こしている。この問題のひとつに鎮痛のために使用しているオピオイドが逆説的に疼痛を誘発するオピオイド因性痛覚過敏(OIH)がある。本研究の成果はそのメカニズムに繋がるものであると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rat CCI model was created after catheter placement from the head to L3 (day 5). After confirming that the pain threshold was lowered (day 15), morphine was intraperitoneally administered for 5 days. On day 15 and day 20, the frequency of occurrence of Hyperalgesia due to morphine administration was not stable, and the pain threshold increased in some individuals. Since HSV, which was initially considered as an MnSOD production vector, was not supplied in Japan and production had already been discontinued at the University of Miami, a vector that produces SOD2 in neuron cells was created in addition to the initial research plan.

研究分野：入力

キーワード：活性酸素 オピオイド 小胞体 MnSOD

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

昨今の医療の進歩によって、患者の平均寿命、ガン患者の生存率は上昇している。これに伴い癌性、非癌性を問わず慢性疼痛患者は増加し、それがここ10年のオピオイドの使用量の急増を引き起こしている。この問題のひとつに鎮痛のために使用しているオピオイドが逆説的に疼痛を誘発するオピオイド因性痛覚過敏(OIH)がある。OIHに関してはこれまでもいくつかの研究がなされているがそのメカニズムに対する結論は出ていない。

2. 研究の目的

本研究において我々はなぜオピオイド因性痛覚過敏がおこるのかを問いとし、ここにミトコンドリア由来活性酸素と小胞体ストレスが関与しているという仮説をたてて検証することとした。慢性疼痛に対して連続してモルヒネを腹腔内投与することで、OIHをきたしているモデルを作製する。これは従来 of クモ膜下にオピオイドを投与しただけのモデル(Science 1991; 251: 85-87, Brain Res 1995; 677: 257-267, Pain 2002; 94: 245-253)に比べて、より臨床に沿っていると考えられる。Vectorにより脊髄レベルでMnSODを産生させると疼痛閾値が上昇することを示し、MnSODの産生がOIHを軽減し、mtROSの産生と小胞体ストレスを軽減することを分子生物学的に示し、これによりOIHの病態にミトコンドリア由来のROS、小胞体が関与しているかを検証することは大量のオピオイドが慢性疼痛の治療に使用されている昨今において、不要な痛覚過敏の抑制とその治療に臨床応用されるものと考えられる。具体的にはMnSODを産生するvectorをオピオイドに先行して投与することで、mtROSの産生や小胞体ストレスを抑制し、疼痛閾値を上昇させるといった点が臨床的に期待され、ペインクリニックや緩和医療においてMnSODの遺伝子導入を行うことでオピオイド因性痛覚過敏を抑制するといった新たな治療の可能性が期待できると考えた。

3. 研究の方法

本研究において我々は、事前にラットの坐骨神経を結紮することで慢性疼痛をきたしたCCIモデル(J Neurosci Methods 193:47-53.)を作製し、頸部より挿入したカテーテルをとおして、第2-4腰髄レベルにMnSODを産生するように調整されたHSV vectorを投与する。次に疼痛閾値が低下したことを確認したうえでモルヒネを5日間腹腔内投与する。MnSODが産生されるモデル(QHMnSOD)ではMnSODが産生されることでmtROSが抑制されOIHが緩和され、その結果としてCCIモデルの疼痛閾値が週単位で改善していくことが予想される。

一方コントロールvectorを投与されたモデルでは、疼痛閾値が上昇するのにより長期の経過を要することが予想される。さらに我々はQHMnSOD群では小胞体ストレスの指標であるGRP78・ATF6aの産生も抑制されるとの仮説を立てた。これまでの予備実験を基にMnSODの産生がモルヒネの退薬兆候を軽減させるのみならず、モルヒネによって治療されている慢性疼痛モデルにおいても神経細胞内のミトコンドリア由来活性酸素に影響を及ぼし、小胞体ストレスを軽減することでオピオイド因性痛覚過敏の形成を阻害することを明らかにする。免疫染色、ウェスタンブロットに用いる検体の採取はCCIモデルの痛覚過敏が改善してきた時点とするが、これまでの報告からはモルヒネ投与から5-6週(day55-62)であると考えられる。

(1) 脊髄くも膜下腔内へのカテーテル留置

MnSOD産生vectorとMitoSox Redを投与するために、第2-4腰髄付近のくも膜下にカテーテル先端を留置する。全身麻酔下の雄性Sprague-Dawleyラット(約220g)を両耳道で固定し、両耳間の正中線に沿って皮膚を切開し、筋肉を左右に剥離する。環椎後頭膜に20G針先を用いて切開

をおき、脊髄液が溢れ出るのを確認する。PE-10 カテーテルをくも膜下腔に 8.5cm すずめ留置し、縫合を行う。術後、運動麻痺の発生を注意深く確認し、5 日間の回復期間が経過してから本研究に使用する。運動麻痺が出現したラットは本研究より除外する。

(2) オピオイド因性痛覚過敏モデルの作製

カテーテル留置後 5 日でまず CCI モデルを作製する (day5)。全身麻酔下の雄性 Sprague-Dawley ラットの左大腿部を 1.5-2.0cm 程度切開した後、坐骨神経を露出させ 4-0 chromic gut; Ethicon を 4 回ゆるくまきつける (Pain. 1988;33:87-107.)。その 10 日後 (day15) に機械性痛覚過敏の出現を確認したのちに MnSOD 産生 vector (QMnSOD) と control である vector (QGFP) をクモ膜下の留置したカテーテルから 30 μ l (1 \times 10⁹ plaque-forming units) 投与する。

翌日からモルヒネ、0.9%NaCl を 5 日間、1 日 2 回 12 時間の間隔で腹腔内に投与 (モルヒネ投与量: day 1;10 mg/kg, 15mg/kg. day2;20, 25 mg/kg. day 3;30, 35 mg/kg. day 4;40, 45 mg/kg. day5;50, 55mg/kg) し、QMnSOD+モルヒネ、QMnSOD+0.9%NaCl と QGFP+モルヒネ、QGFP+0.9%NaCl の 4 群を作製する (day16-20)。また、同様の実験を慢性疼痛をきたしていない sham についても行うことで、two-hit theory について検証する。

(3) 機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応の評価

アロディニアの刺激閾値は、Von Frey フィラメントを用いて測定する。底に格子状の金属を貼りつけたプラスチックケージにラットを収容し、少なくとも 30 分以上かけラットを環境に順応させる。Von Frey フィラメントを後肢足底に押し付け、逃避反応を起こす閾値を測定する。15.1g の刺激によっても反応がない場合、それをラットのカットオフ値とする。刺激閾値は、up-and-down 方法を用いて 50%閾値を計測することとする。温熱性痛覚過敏反応は Hot plate テストを用いて測定する。熱刺激の温度設定は、予備実験の結果から 51.0 度とする。この温度設定における正常なラットの潜時は 10 秒程度となる。熱刺激による熱傷等の組織損傷を防ぐ為、カットオフ値は 40 秒とする。

(4) 免疫染色法

脊髄後角の MnSOD、TLR4、GRP78、ATF-6a、ミクログリアの発現と分布を免疫染色法により評価する。4%PFA を含む 0.1M リン酸溶液を心臓より灌流し固定を行った後、第 4-5 腰神経が起始する脊髄を取り出す。組織は同溶液で 1 晩固定し、その後、30%スクロースを含む PBS 不凍液に 2 日間浸す。一次抗体は、mouse anti-MnSOD (1:300, Millipore Billerica, MA), rabbit anti-GRP78 (1:3000, Sigma, St Louis, MO), rabbit anti-ATF6 α (1:200, Santa Cruz Biotechnology,), mouse anti-NeuN (1:800, Millipore, Billerica, MA), mouse anti-GFAP (1: 3000, Sigma, St Louis, MO), mouse anti-OX-42 (1:100, Millipore, Billerica, MA), rabbit anti-Iba1 (1:2000, Wako, Osaka, Japan) を使用する。二次抗体は、anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488, 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA)、anti-goat IgG (Alexa Fluor 488, 1:1000; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いることとする。オールインワン顕微鏡 (BZ-X, KEYENCE) を用いて観察を行い、得られた画像は PC 上画像レタッチソフトにて処理を行う。

(5) ミトコンドリアからの活性酸素の発現

脊髄後角における活性酸素の発現をマーカーである MitoSox Red を用いて評価する。方法は免疫染色法に準ずるが抗体は必要としない。4%PFA による固定後、オールインワン顕微鏡 (BZ-X, KEYENCE) を用いて画像を作成する。細胞核周囲に斑点状の MitoSox Red による染色が認められる神経細胞を陽性細胞と定義する。脊髄後角の各 laminae、DRG に存在する MitoSox Red に染

色された細胞の個数を計測する。

(6) Western Blotting 法

発現蛋白質の定量的評価を Western Blotting 法で行う。検体は第 4-5 腰神経が起始する脊髄後角および DRG とする。これらの組織は蛋白溶解バッファーを使用して均質化され、その蛋白溶解バッファーはプロテアーゼ阻害薬とフォスファターゼ阻害薬を含むものとする。ホモジネートは、18000g 摂氏 4 度で 20 分間遠心分離され、その上澄みを収集し、DC protein assay を使用して蛋白定量を行うこととする。30ug ずつ蛋白を分注し、buffer を加え、次に 95 度で 5 分間、蛋白変性させる。蛋白は、10-12%の gel を用いて電気泳動により展開され、メンブレンに転写する。メンブレンを rapid block solution を用いて固定し、その後一次抗体を含んだ溶液中に摂氏 4 度で 1 晩、振盪させる。一次抗体は、rabbit anti-MnSOD, 1:2000, Millipore, Billerica, MA; mouse anti-GRP78, 1:2000, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA; rabbit anti-ATF6 α 1:1000, Santa Cruz biotechnology, Dallas, TX; mouse monoclonal anti- β -actin, 1:8000, Sigma, St Louis, MO) を使用する。メンブレンは 2 次抗体 (Santa Cruz Biotechnology) に浸され、次に chemiluminescence solution を用いて検出する。得られたバンドは ImageJ を用いて PC 上で定量し比較する。

以下、当初の研究計画からの追加

(7) ウイルスベクターの作製

MnSOD 産生ベクターとして考えていた HSV は国内の供給がなく、マイアミ大学でも既に生産が中止していたため、当初の研究計画に加えて神経細胞内で SOD2 を産生する vector 作製を行った。ヘルペスウイルスではなく、アデノ随伴ウイルスを使用して作製を行った。

4. 研究成果

頭部より L3 までのカテーテル留置後 (day5) で雄性 Sprague-Dawley ラットの CCI モデルを作製した。疼痛閾値が低下したことを確認した後 (day15) モルヒネを 5 日間腹腔内投与した (モルヒネ投与量: day 1:10, 15 mg/kg. day2:20, 25 mg/kg. day 3:30, 35 mg/kg. day 4:40, 45 mg/kg. day5:50, 55mg/kg) (day20)。day15 と day20 で、モルヒネ投与による Hyperalgesia の出現頻度はなかなか安定せずむしろ疼痛閾値は上昇する個体も認めた。これはモルヒネの全身投与によって 必ずしも疼痛閾値が低下せず、鎮痛効果が得られる個体、期間が存在する事を意味すると考える。モルヒネ投与期間のさらなる延長が必要と考えられ、55mg/kg のモルヒネを継続投与したところ day45 の時点でも再度疼痛閾値の低下は認められなかった。一方、MnSOD 産生ベクターとして考えていた HSV は国内の供給がなく、関連施設であるマイアミ大学では既に生産が中止していたため、当初の研究計画に加えて神経細胞内で SOD2 を産生する vector 作製を当初の研究計画と並行して試みた。ここではアデノ随伴ウイルスを使用して作製し、作製したウイルスベクターの機能評価を行った。細胞実験レベルでは、作製したベクターの機能が目的を果たしていることを確認した。

以上より、当初の研究計画通りには進まなかったが、新たな研究計画を加え、一定の成果を得ることが出来た。今後さらに本研究を進めていき、ウイルスベクターによる MnSOD の投与、産生が ROS を抑制し、これが OIH の改善をもたらすことを証明する。加えて、脊髄レベルでは活性酸素の減少をもたらすことを示し、その分子生物学的機序を明らかにしていく。また、作製したベクターの機能評価を今後も継続して行っていく、細胞実験から動物実験へと応用させていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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