

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18238

研究課題名(和文)急性期疼痛時の脊髄におけるnNOSとCOX-2の関連性

研究課題名(英文)The relation of nNOS and COX-2 at the spinal cord in acute pain phase

研究代表者

大西 毅 (Onishi, Takeshi)

新潟大学・医歯学総合病院・助教

研究者番号：60804573

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経障害性疼痛など慢性的な疼痛に移行する初期段階の解明を目的に、1. 最適な疼痛モデルマウスの確立 2. 神経型一酸化窒素合成酵素(nNOS)と関連して初期段階の疼痛を誘発する物質の発見 を目指して実験を行った。

本実験系に最適なモデルマウスについて、刺激に対して緑色の蛍光を発するGCaMPマウスの安定的な入手が可能となったため、自然条件下や疼痛条件下における反応強度の違いについて多角的に検証している。期間中は様々な制約があり原因物質の同定など当初の予定通りに実験を遂行できていない状況であるが、成果を発信すべく現在も実験を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛はその発症機序について未解明な点が多く、また慢性的かつ難治性の疼痛の遷延によって患者の生活水準を著しく損なう。治療は対症療法が主体でその効果には個人差が大きい。本研究では伝導遮断直後の初期段階に着目し、その作用機序や疼痛に関与する物質を検証することで今後の治療における新たな創薬のターゲット確立につながることや、早期からの介入による新たな治療フェーズを設けられることによって神経障害性疼痛の慢性化への移行を阻止できる可能性が本疾患に困る患者の軽減や医療費削減などの社会的意義に繋がると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to elucidate the initial stage of transition to chronic pain such as neuropathic pain. We tried to result two problems, to establish the suitable pain model mouse, and to find a substance connected with neuronal nitric oxide synthase (nNOS), such as cyclooxygenase-2 (COX-2).

We could obtain GCaMP mice stably, which have green fluorescent calcium indicators and lighted strongly at the excited stage. We investigated neuronal potentiation (spinal cord and cortex) multimodally in pain phase or natural phase. We could obtain GCaMP mice stably, which have green fluorescent calcium indicators and lighted strongly at the excited stage. Using GCaMP mice and naive mice, We investigated neuronal potentiation (spinal cord and cortex) multimodally in pain phase or natural phase. We continue to research this study although we have not concluded yet, and we aim to submit the dissertation.

研究分野：麻酔科学，神経疼痛学

キーワード：一酸化窒素 神経障害性疼痛 伝導遮断

1. 研究開始当初の背景

末梢の侵害受容器の損傷により炎症性物質や興奮性神経伝達物質などが産生され、脊髄や脳などいわゆる中枢神経系の作用を変性させることで、神経障害性疼痛が発症することは広く知られている。神経障害性疼痛では神経由来の痛みが慢性的に続くため、患者の生活の質の低下や医療費の負担増につながる問題点を認めるが、未だ根本的な治療法は確立されていない。また、そのモデル動物作成には手術が必要かつ処置後一定の間隔を空けることが必要であるため、その急性期に生じる変化についてはあまり知られていない。また、研究的手法についても電気生理学や組織学などいわゆる生体外の標本を用いた報告が多く、生体を利用した研究手法や手技についてはこれまであまり盛んに行われていない。申請者は以前の研究においてマウスの後肢を虚血状態とすると、その直後から脊髄に存在する神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS) の活性化によって一酸化窒素 (NO) が産生され、両側性に神経活動を増強させることを明らかにした。継続的な疼痛につながり得る初期の段階において、nNOS 由来に産生される一酸化窒素 (NO) と関連する物質について検討することで、作用機序の解明や新たな創薬のターゲットを検討したいと考えたことが本研究を着想した背景である。

2. 研究の目的

本研究では、1. 神経障害性疼痛発症直後(急性期)の疼痛モデルマウスの作成と最適な生体内イメージング法の検討 2. 伝導遮断直後に nNOS と関連し疼痛の持続的な増強に関連する物質およびその作用部位の検討(脊髄か大脳皮質か)をテーマとした。

申請者はこれまでの研究において、ミトコンドリア内に存在するフラビン蛋白を利用した蛍光イメージング法を主に用いて生体内マウスの大脳皮質体性感覚野や脊髄の神経活動の変化を観察してきた。細胞興奮時に発する緑色の自家蛍光を利用した同手法の利点は、退色に強く繰り返し見の所見を観察できることや定量的評価ができることが利点であるが、捕捉できる蛍光強度が最大でも 1~1.5%程度と他のイメージング法と比べて弱いことが問題点として考えられた。近年では刺激に対して強力な蛍光発色を行う遺伝子改変マウスを用いた研究が盛んに行われており、生体内における特定条件下でのイメージングの報告も徐々に行われている。今回、特定の刺激に対して緑色の蛍光を発する GCaMP マウスを導入したマウスを使用し、同様に緑色の自家蛍光応答を捕捉するフラビン蛋白蛍光イメージング法で確立した生体内神経活動の観察手技を応用することで、より明瞭かつ強力に神経活動を観察できるのではないかと考えた。実験によって最適な条件や手法を検討し確立することで、申請者が先行研究でその一端を明らかにした、末梢組織の損傷後急性期中枢神経系の可塑性変化についてより詳細に作用機序を解明できるのではないかと考えた。

また、申請者の先行研究では伝導遮断直後の急性期に nNOS 由来に NO が産生されその後の持続的な神経活動増強につなげることが判明したが、NO 自体は生体内に数秒しか安定して存在することができないため、炎症誘発性サイトカインや疼痛を誘発するたんぱく質など何らかの物質に作用することが現象の持続には必要不可欠であると考えた。NO によって活性化あるいは抑制される物質を特定することにより、これまで根本的な治療が難しかった神経障害性疼痛の新たな治療法やそのタイミングについて考えることが、本研究をデザインした主要な目的である。

3. 研究の方法

まず、研究に最適な疼痛観察用モデルマウスについて検討した。当初は、ウイルスベクターの一種であるアデノウイルス随伴ウイルス(AAV)を用いて GCaMP を末梢からの刺激が投射される脊髄の後角に注入し、生着させることで実験に適したマウスを作成する予定とした。マウスへの生着性が高いと報告されていた AAV9.CAMK .GCaMP6s と AAV.CAG.GCaMP6s を購入し、過去に報告のある低侵襲な方法で脊髄に注入、4週間ほど間隔をあけ生着を狙う手法を予定していた。事前研究で投与方法の確認や最適な生着期間など検討中に GCaMP マウスを身近に入手可能な状況であることが判明し、そちらを主に実験に用いる方針とした。触刺激については、従来の 1 秒間に 50 回(50 Hz)の正弦波による振動を用いたものの他に、1 Hz のいわゆる撫でるような刺激についても検討した。マウスの大脳皮質体性感覚野もしくは脊髄に対して 470 nm の青色波長の LED 光を照射し、その活動強度の変化を CMOS カメラで撮影し、解析用のコンピュータを用いて評価した。大脳皮質の観察は、マウスの頭皮のみ切離し、乾燥を予防する処置(ミネラルオイルの塗布)を行うことで低侵襲に観察が可能であった。脊髄については、麻酔下にマウスの背部より切開を加え、下位胸椎 2 椎間を切除し、脊髄後角部分を露出させたくうえで上記の装置を用いて観察を行った。後述するイメージング解析ソフトウェアの選定と納入の遅れ、また新型コロナウイルス感染症に伴う臨床業務への従事時間が長くなり、当初想定していた研究に対するエフォートを下回

る状況となったため、疼痛モデルマウスの作成や関連する物質の検討についてはまだ進行しておらず、現在研究を進めている段階である。

4. 研究成果

3. 研究の方法で前述の通り本研究に対する成果をまだ発信することができていない。理由としては

- ・画像解析用ソフトウェアの納入に時間がかかったこと

- ・新型コロナウイルス感染症に伴う臨床業務の比率が高くなり当初予定していたエフォートで行うことができなかったこと

が挙げられる。画像解析用ソフトウェアについては、これまで幅広い画像撮影を行う実験系に対応したソフトウェアを用いていたが、画像の再構築(空間フィルタ処理)や基準の画像所見に対する増加率(レシオ計算)の算出に難点があり、円滑な解析ができないことが欠点であった。そこで、イー・アイ・ソル株式会社が開発した画像解析用のソフトウェアとハードウェアについて購入した。このシステムは、本実験系に必要な前述の再構築の手法を円滑に行う機能が備えられていること、実験結果の解析についても最大反応を示す領域を瞬時に表す機能や複数の領域における反応の割合の算出、一定の反応強度を示す面積の算出など様々な解析を瞬時に行える機能が搭載されており、解析にかかる時間の短縮や結果に対する評価や知見をさらに踏み込んで検討することができるようになった。当初は2021年夏頃納入予定であったが、世界的な半導体の生産不足の影響等もあり、2021年12月のシステム導入となった。現在は新たな知見を得るべく実験中であるが、GCaMPマウスとwild typeマウスを用いたフラビン蛋白蛍光イメージング法との反応エリアや強度の違い、周波数の異なる触刺激に対する応答の違いなど興味深い所見が得られつつある。反応に対する応答やその強度、発現の傾向について所見をまとめ、できるだけ早い段階で発信していきたいと考える。また、疼痛モデルマウスや触刺激以外の刺激法に対する反応の観察など引き続き神経障害性疼痛発症直後の病態解明に力を注いでいく予定である。

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〕

期間中は様々な制約があり原因物質の同定など当初の予定通りに実験を遂行できていない状況であるが、成果を発信すべく現在も実験を行っており、その成果をできるだけ早く発表することを目標とする。また、本研究に関連した内容で引き続き研究費を獲得しており、今回と併せて機序解明につなげていきたいと考える。

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