

令和 5 年 6 月 19 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19871

研究課題名（和文）脛骨神経損傷マウスを用いた神経障害性疼痛の慢性化メカニズムと改善する運動療法開発

研究課題名（英文）Analysis of the mechanisms underlying chronic neuropathic pain using tibial nerve injury model mice and the effect of exercise therapy

研究代表者

小坂 祥範 (Kosaka, Yoshinori)

琉球大学・医学（系）研究科（研究院）・客員研究員

研究者番号：10835242

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）：坐骨神経痛をはじめとする神経障害性疼痛は、世界規模の健康問題である。しかし、その詳細なメカニズムに関して不明の点が多く、治療に結びつく結果も知られていない。本研究は、この不明な点を解決し、治療法の開発を目指すことを目的として研究を行った。脛骨神経の結紮または切断によりモデルマウスを作製し、次の事を明らかにした。

長期間持続する神経障害性疼痛モデルマウスを確立した。神経障害性疼痛発症と慢性化の基盤にGABAの機能異常がある。継続した運動療法を加えることで、疼痛の軽減につながる。ミクログリアの活性化抑制が運動療法の作用点の1つと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの、神経障害性疼痛モデルは2か月以内に疼痛閾値が正常化するため、厳密な意味での慢性疼痛のモデルではなかった。今回の脛骨神経結紮モデルは、3か月以上にわたって疼痛閾値が低い状態を維持できるので、臨床症例に近いモデルマウスとなり、利用が広まると考えられる。

運動療法が疼痛改善効果があることは、臨床的には知られていた。しかしながら、完全に慢性化する動物が確立されていなかったために、モデルでの再現はされていない。その意味で、最初の例となる。さらに、その改善にミクログリアの活性化抑制が示されたことから、治療のメカニズムの一端が明らかにされたことになり、応用が広がると期待される。

研究成果の概要（英文）：Neuropathic pain, including chronic lumbar pain, is a serious problem worldwide. However, the underlying mechanisms and their treatment methods are still unclear. To reveal the mechanism underlying the development and persistence of the neuropathic pain, we examined the tibial nerve injury mouse model with and without exercise therapy. We demonstrated below three points.

(1) We established the chronic pain mouse model by loosely ligating tibial nerve. (2) Weakness of GABAergic inhibition by the way of KCC2 reduction after nerve injury and its persistence may cause the development and lasting of neuropathic pain. (3) Exercise therapy did not prevent the development of pain, but did reduce its persistence, chronic pain, probably by the way of microglial reduction.

研究分野：リハビリテーション医学

キーワード：GABA（アミノ酪酸） KCC2（K、Cl⁻共輸送体） 神経障害性疼痛 疼痛行動評価 脛骨神経 脊髄後角 ミクログリア 自走式回転ゲージ

1. 研究開始当初の背景

坐骨神経痛をはじめとする神経障害性疼痛は、人口の1～2割が罹患していると言われ、国際レベルの社会的問題である。現状、鎮痛剤、神経ブロックなどの対症療法が中心であり、根本的な治療法の開発が急がれている。これまでの研究で、末梢神経の外傷、持続的な圧迫、感染、局所の炎症などが誘因となって生じる末梢神経の持続的炎症や中枢神経系における神経伝達の変化などのメカニズムが示されている。しかしながら、神経障害性疼痛は単一の疾患ではなく、発症機序が複雑なため、病態は完全には解明されていない。その中において、Coull (2003, 2005)らが、神経損傷後に細胞外にCl⁻を排出する輸送体(K⁺, Cl⁻, co-transporter2 : KCC2)の発現が低下し、GABAの作用が抑制性から興奮性に変化することによって、脊髄レベルでの興奮/抑制バランスが崩れ、GABAの作用が痛みの増強に働くというメカニズムを提唱したことにより、解明されたと多くの研究者が考えた(Inoue & Tsuda 2018)。しかしながら、その後の解析で、主としてGABAの機能変化の点で問題が指摘され、懐疑的な意見もある。

2. 研究の目的

申請者は、理学療法士として、神経損傷後に生じる様々な障害に苦しむ患者と接した経験を持ち、神経傷害性疼痛発症のメカニズム解明に向き合いたいと考えている。

今最も受け入れられているCoullらの「GABAの作用が抑制性から興奮性に変化することにより痛みが増強、持続する」という仮説には、複数の問題点・疑問点がある。(1)再現性の問題、(2)採用されたモデルの問題、(3)痛覚の発症との因果関係、(4)持続性(慢性化)についてほとんど論じられていない点である。本申請の研究において、この問題点を解決し、GABAの作用の変化が痛覚を生じるという仮説が妥当であるか、また修正が必要かを検討し、最も妥当なメカニズム研究を行う事により、上記メカニズムを裏付けるとともに、将来の治療法の開発を見据えることである。2点目は、疼痛や炎症を軽減し、疼痛の慢性化を予防・改善する新たな治療法として注目されている運動療法の有効性及びその科学的メカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 疼痛の発症と慢性化に関するGABAの機能変化

10—12週齢雄マウスを用いて、坐骨神経の1枝である脛骨神経を結紮して径を半分にする「結紮モデル」と、完全切断する「切断モデル」を作製し、以下の点を解析した。

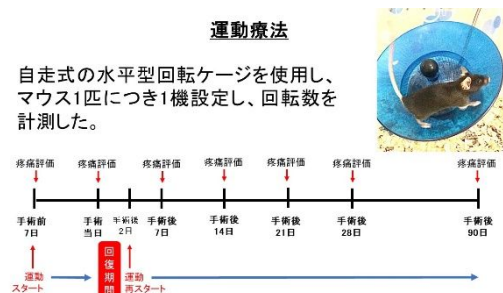
von Freyフィラメントを用いた疼痛閾値の測定

第4-5腰髄後角におけるシグナル分子の発現変化

脛骨神経の組織学的変化。

(2) 慢性疼痛に対する運動療法の有効性

上記で確立した3か月に渡って疼痛が持続するマウス(「結紮モデル」を用いて、水平型の回転ケージ(右図)を用いて運動負荷を加えると同時に、運動量を解析した。

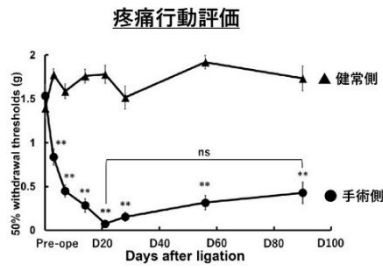


4. 研究成果

(1) 疼痛の発症と慢性化に関するGABAの機能との関係に関する研究

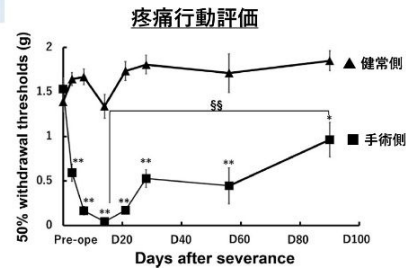
疼痛行動評価の結果、「結紮モデル」「切断モデル」とともに、初期には疼痛閾値が低下した。長期に観察を行った結果、「切断モデル」は2か月以降回復したが、「結紮モデル」は長期間疼痛が持続する神経障害性疼痛モデルとして適していることが明らかになった。（下図）

結紮モデル



術後21日目で疼痛閾値が最も低下し、90日目においても閾値の低下が継続した。

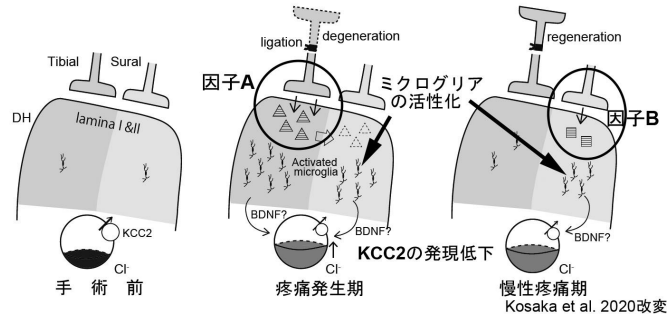
切断モデル



手術後14日目で疼痛閾値が最も低下した。結紮モデルと異なり、術後90日目では、術後14日目と比較して有意に回復を示した。

「結紮モデル」、「切断モデル」両方において、脛骨神経の変性が早期から進行し、やがて両方で再生し、28日目以降では損傷前と同程度の密度に回復していた。

いずれのモデルにおいても、閾値の低下（疼痛）とGABAの作用を抑制的に導く K^+ 、 Cl^- 共輸送体（KCC2）の発現低下（抑制性の低下）が同調し、KCC2低下よりも先んじてミクログリアが増加していた。このことから、脛骨神経の変性がミクログリア活性化、KCC2の発現低下を導き、GABAの抑制作用が減弱する事で、疼痛を発生・持続させるという経路が示された。



両モデルの90日時点での違いから、神経疼痛の発症と持続では異なる要因によって惹起されると考えられた。すなわち、発症には、損傷された神経終末から放出され

た因子Aが関与し【上図中】、慢性期には、障害を受けなかった神経終末から放出される因子Bが関与する【上図右】。これら因子の放出は共通して ミクログリアを活性化し、GABA/グリシンの作用を抑制的に導く輸送体（KCC2）の発現を減少させ、最終的に γ -アミノ酪酸（GABA）の抑制性が減弱することにより痛みにつながることを明らかにした。

以上の研究結果はBrain Research誌に受理され、2020年4月号に掲載された。

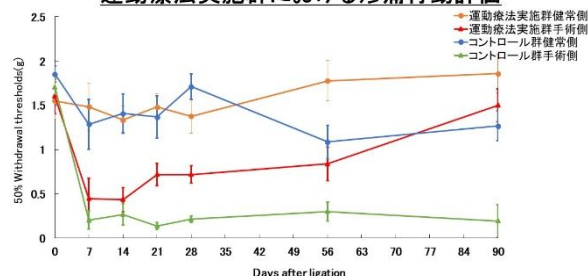
（2）慢性疼痛に対する運動療法の有効性

手術前後で、マウスの運動量に変化はなく、運動機能に大きな障害はなかった。

運動療法を行わないコントロールでは90日後も疼痛閾値が極めて低いままであった。

運動療法を行ったマウスでは、術後56日目以降顕著に回復し、疼痛閾値は健常側と有意差が無いレベルに回復した。

運動療法実施群における疼痛行動評価



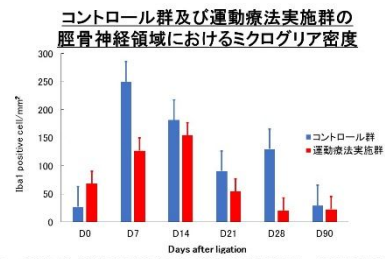
運動療法実施群では、術後14日目には、疼痛閾値が低値となったが、術後21日目以降、疼痛閾値が上昇し、90日目では、ほぼ健常側と同程度まで改善した

運動療法実施群の脛骨神経領域において術後7日目では、コントロール群を比べてミク

ログリアの密度が減少する傾向が見られた。

これらの結果から、継続した運動療法は、疼痛改善に有効であると考えられた。また、そのメカニズムの1つとして運動療法によりマイクログリアが示唆された。

現在、これらの結果を論文にまとめている。



コントロール群では、術後7日目よりマイクログリア密度が増加し、14日目に減少に転じた。術後7日目におけるマイクログリア密度は運動療法実施群の方が少ない傾向であった。運動療法実施群では、術後14日目に最大となり、21日目以降に減少傾向となった。

引用文献 Coull, et al. (2005) *Nature*, **438**, 1017-1021. (2003) *Nature*, **424**, 938-942.

Inoue & Tsuda (2018) *Nat Rev Neurosci*, **19**, 138-152

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kosaka Yoshinori, Yafuso Tsukasa, Shimizu-Okabe Chigusa, Kim Jeongtae, Kobayashi Shiori, Okura Nobuhiko, Ando Hironobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 1733
2. 論文標題 Development and persistence of neuropathic pain through microglial activation and KCC2 decreasing after mouse tibial nerve injury	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Research	6. 最初と最後の頁 146718 ~ 146718
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2020.146718	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 該当する
1. 著者名 Kobayashi Shiori, Shimizu-Okabe Chigusa, Kim Jeongtae, Kosaka Yoshinori, Sunagawa Masanobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of the GABAergic network in the mouse spinal cord	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Factors Affecting Neurodevelopment - Genetics, Neurology, Behavior, and Diet	6. 最初と最後の頁 273 ~ 286
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/B978-0-12-817986-4.00024-9	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 該当する
1. 著者名 Yafuso Tsukasa, Kosaka Yoshinori, Shimizu-Okabe Chigusa, Okura Nobuhiko, Kobayashi Shiori, Kim Jeongtae, Matsuda Koyata, Kinjo Daichi, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 177
2. 論文標題 Slow progression of sciatic nerve degeneration and regeneration after loose ligation through microglial activation and decreased KCC2 levels in the mouse spinal cord ventral horn	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 52 ~ 63
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2021.10.009	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 該当する
1. 著者名 Shimizu-Okabe Chigusa, Kobayashi Shiori, Kim Jeongtae, Kosaka Yoshinori, Sunagawa Masanobu, Okabe Akihito, Takayama Chitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Developmental Formation of the GABAergic and Glycinergic Networks in the Mouse Spinal Cord	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 834 ~ 834
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms23020834	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl-共輸送体(KCC2)の発現低下は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 日本解剖学会第75回九州支部学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 KCC2の発現低下は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 第125回 日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsukasa Yafuso, Yoshinori Kosaka, Chigusa Shimizu-Okabe, Shiori Kobayashi, Jeongtae Kim, Hironobu Ando, Akihito Okabe, Chitoshi Takayama
2. 発表標題 De- and Regeneration of sciatic nerves through microglial activation and KCC2 decreasing in the spinal cord after loose ligation.
3. 学会等名 第43回 日本神経科学大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤博之、屋富祖司、小坂祥範、小林しおり、大倉信彦、清水千草、高山千利
2. 発表標題 K+-Cl-共輸送体2(KCC2)の発現減少は、脛骨神経損傷による運動障害を軽減する
3. 学会等名 第70回日本理学療法学会
4. 発表年 2022年

〔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
---------	---------