

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390063

研究課題名(和文)

筋性疼痛における筋由来神経成長因子(NGF)の役割

研究課題名(英文)

Role of nerve growth factor (NGF) in muscular pain

研究代表者：

水村 和枝(MIZUMURA KAZUE)

名古屋大学・環境医学研究所・教授

研究者番号：00109349

研究成果の概要(和文)：筋性疼痛(機械痛覚過敏)の末梢性機構を解明するため、筋由来神経成長因子(NGF)の役割を解析した。遅発性筋痛では、伸張性収縮(LC)負荷中に筋より遊離されるブラジキニンがB2受容体を活性化し、筋におけるNGF産生を高め、このNGFが筋細径線維受容体の機械感受性を高めることを明らかにした。他の筋痛モデルでは、繰り返し寒冷ストレス(RCS)の筋機械痛覚過敏には筋NGFの関与はなく、脊髄神経損傷モデルでは関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To clarify the peripheral mechanism of muscular mechanical hyperalgesia, we analyzed roles of nerve growth factor (NGF) produced in the muscle in a few muscular pain models. We demonstrated that delayed onset muscle soreness was a result of sensitization of thin-fiber receptors by NGF that was up-regulated in the muscle after activation of B2 bradykinin receptors during exercise. We also demonstrated that NGF was not involved in muscular mechanical hyperalgesia in the repeated cold stress model, whereas it was involved in the spinal nerve ligation/cut model.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
2009年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：疼痛の神経生理学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学

キーワード：筋性疼痛、神経成長因子、遅発性筋痛、ブラジキニン

1. 研究開始当初の背景

筋性疼痛は頻度が高く、医療上大きな問題である。しかし、表面痛と比べて研究が遅れている。また、筋性疼痛の多くは非炎症性であるにもかかわらず、多くの研究は炎症モデルか、外的に炎症メディエーターを投与することによる筋性疼痛をモデルと

して研究されてきた。申請者らは非炎症モデルとして、運動後に生じる遅発性筋痛に着目した。ちなみに本症は以前には炎症だとされていたが(*Aust. J.Sci. Med. Sport* 26(3-4):49-58, 1994)、最近次第に否定的な報告が多くなっている。申請者はそのモデルを筋神経の電気刺激を用いた伸張性収縮負

荷により作成した。申請者らは、筋機械逃避反応閾値測定法を実験的 (Somatosens. Mot. Res. 22:299-305, 2005) 及び有限要素法を用いたコンピューターシミュレーション法により検討し、①覚醒動物で筋機械痛覚過敏を測定する方法を確立し、②伸張性収縮負荷後1日目から3日目まで機械痛覚過敏が生じることを明らかにした (Taguchi et al. J. Physiol. 2005)。また③取り出し標本による筋細径線維受容器活動の解析法を確立し、機械痛覚過敏がピークである④運動後2日目の筋において、細径線維受容器の機械感受性が亢進していることを明らかにした (J. Neurophysiol. 2005)。さらに、運動前に投与したシクロオキシゲナーゼ (COX) 2 阻害剤やブラジキニン B2 受容体拮抗薬が遅発性筋痛発生を抑制することを見出し、⑤運動中に生じるブラジキニンや、おそらくそれによって誘導された COX2 によって産生されたプロスタグランジンが、遅発性筋痛を生じる過程の引き金をひく、と言う結果を得ていた。しかし、これらの実験結果からは、何が機械痛覚過敏を生じる物質か不明のままであった。一方、神経成長因子(NGF)が筋細径線維受容器を感作し、筋痛覚過敏を起こす物質として注目されていた (Pain 114: 168-176, 2005, IASP Research Symposium in Aalborg, 2007.5, J. Orofac. Pain 20 :325-336, 2006)。申請者らも NGF が遅発性筋痛における感作物質である可能性を示唆する結果を得ていたが、さらなる検討が必要な状態であった。

NGF は神経因性疼痛モデルにおいて後根神経節細胞で増加し、また慢性の線維筋痛症患者の髄液中でも増加していることが報告されており、炎症以外の病態での役割が示唆されている。しかし、これらの病態における NGF の起源は不明である。一方、筋における NGF 産生は、筋神経の切断や伝導遮断 (Neurosci.Lett. 132: 5-7, 1991)、筋の虚血 (Neurosci.Lett. 323:109-112, 2002) によっても生じるという報告がある。しかし、これらの報告は多くの研究者の目にはとまらなかつたらしく、筋の NGF は埋もれたままであった。このようにして産生された NGF が筋性疼痛に関与していることを明らかにすることは、今まで不明であった炎症以外の筋性疼痛の理解を高め、治療方策を立てる上で大いに役立つと考えられ、

本研究を申請した。

2. 研究の目的

筋性疼痛、特に機械痛覚過敏 (圧痛) の末梢性機構を解明することが大きな目的である。その中で本研究は、最近申請者らのグループが遅発性筋痛モデルを用いて発見した、筋由来 NGF の役割を解明することが目的である。より具体的には次の2点を明らかにすることを目的とする。

- 1) 非炎症性疼痛 (神経因性疼痛等) への筋由来 NGF の関与の有無を明らかにする。
- 2) 筋由来 NGF がどのような機構を介して筋痛覚過敏を引き起こすか、その末梢性機構を明らかにする。

3. 研究の方法

イ) 伸張性収縮(LC)負荷方法

Taguchi らの方法 (J.Physiol.2005) に則って実施した。

ロ) 繰り返し寒冷ストレス負荷法

Nasu らの方法 (Eur.J.Pain 2010) に則って実施した。

ハ) L5 脊髄神経結紮・切断法

麻酔下で SD ラットの L5 脊髄神経を結紮・切断し、脊髄神経結紮・切断モデル (Chung モデルの改変、Pain 9: 369-376, 1994)を作成する。切断した神経の支配筋で NGF が増大することを予想するので、L4 脊髄神経が主たる支配神経である筋として長指伸筋を、L5 が主として入っている筋として腓腹筋を取り出し、NGF を測定した。

ニ) 筋逃避反応閾値測定法

太いプローブ(直径 2.6 mm)を装着した Randall-Selitto 装置を用いて測定した (Nasu et al., Eur. J. Pain, 2010) .

ホ) 筋一神経標本からの単一神経記録法

Taguchi ら (J.Physiol.2005) の方法によって実施した。

ヘ) RT-PCR および ELISA 法

PCRに用いたNGFのプライマーは、sense: 5'-ttcggacactctggatttagact-3'; antisense: 5'-gatttggggctcggcacttg-3'である。NGFの ELISAはNGF Emax ImmunoAssay System (Promega) を用いて実施した。

ト) 培養後根神経節細胞のパッチクランプ法

生後二週間以内のラットから後根神経節細胞を採取し、1-2日間培養した。小型細胞から whole cell patch clamp 記録を行い、ガラス棒で~5 μ m 押した時に生じる機械感受性電流を記録した。

4. 研究成果

イ) 遅発性筋痛モデルにおける NGF の関与

① 伸張性収縮負荷の筋における NGF 蛋白の発現を ELISA で調べたところ、mRNA とほぼ同じ運動負荷 12 時間後にピークを持ち 2 日目まで続いて増大を示した(図 1)。

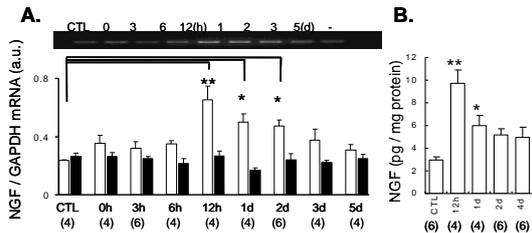


図 1. NGF 増大の時間経過 (A: mRNA, B: ELISA)

②短縮性収縮(SC)、伸張(Str)では痛覚過敏および NGF 発現増大は見られなかった。

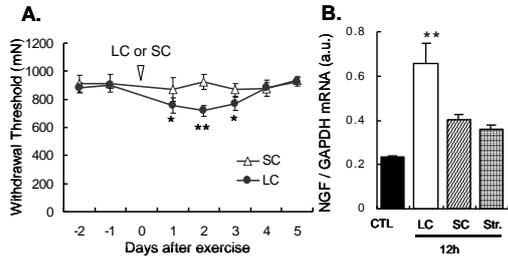


図 2. 短縮性収縮では筋痛覚過敏も筋 NGF mRNA の増大も生じなかった。

③痛覚過敏が最も顕著な伸張性収縮負荷 2 日後に抗 NGF 抗体を筋注したところ、筋機械痛覚閾値は 3 時間後からほぼ運動負荷前の値に戻り、その後同じレベルに止まった。

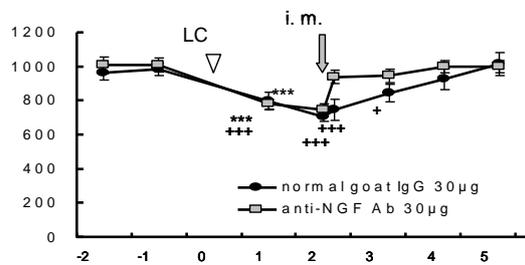


図 3. 抗 NGF 抗体の筋注は筋機械痛覚過敏を減弱した。

④NGF の筋注は用量依存的に筋機械痛覚過敏を引き起こした。

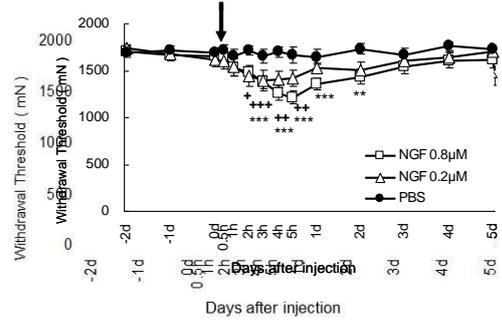


図 4. NGF の筋注は用量依存的に機械痛覚過敏を生じた。

⑤ 筋-神経標本より細径線維受容体の単一神経活動を記録し、その受容野近傍に NGF を投与したところ、10~20 分後から機械反応閾値は低下し、反応の大きさは増大した。

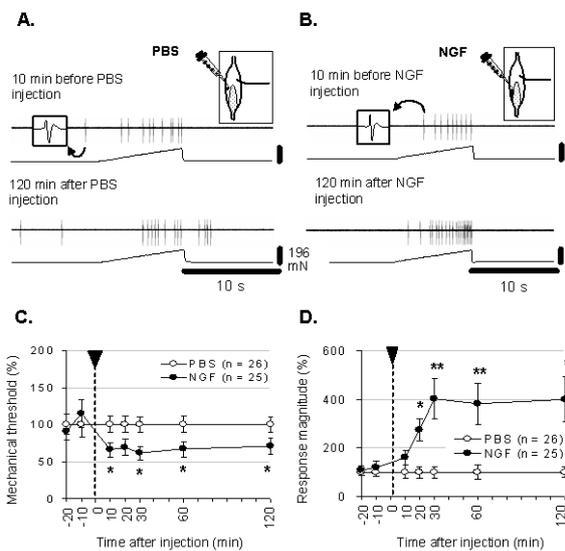


図 5. NGF の筋注により筋細径線維受容体の機械刺激に対する反応閾値は低下し (C), 反応の大きさは増大した (D)

⑥ブラジキニン B2 受容体拮抗薬である HOE140 の運動前皮下投与は、遅発性筋痛発現を完全に抑えた。これと一致して、NGF 発現増大を抑制した。

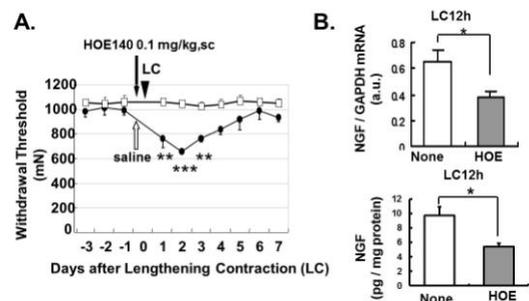


図 6. B2 受容体拮抗薬の運動前投与は、遅発性筋痛の発現を抑制し、NGF 発現増大も抑制した。

⑦NGF を産生する細胞については、筋細胞である可能性について培養筋細胞を用いて、またその他の可能性も含めて in situ hybridization により検討した。培養筋細胞も収縮負荷により NGF を産生できることが判明した。また in situ hybridization では血管平滑筋細胞でメッセージの増大が見られた。筋細胞での増大の有無については、現在再検討中である。

これらのことより、遅発性筋痛は、運動中に筋から遊離されるブラジキニンが B2 受容体を介して筋における NGF 産生を高め、この NGF が筋侵害受容体の機械感受性を高める結果、筋機械痛覚過敏が生じたものと考えられる。

⑧一方、運動前に投与した COX-2 阻害薬は遅発性筋痛の発現を完全に抑制するが、NGF 発現増大を抑制しなかった。この結果は予想とは異なり、COX-2 は NGF 発現には関わっていないと考えられた。

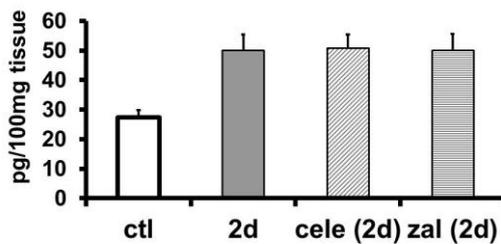


図7. COX-2 阻害薬は NGF 発現増大を抑制しなかった。

⑨COX-2 阻害薬で発現が抑制される物質を探したところ、NGF と同じ時間経過で発現増大するグリア細胞由来神経栄養因子 (GDNF) が見出された。

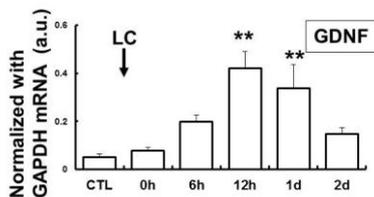


図8. 伸張性収縮負荷 (LC) 後 12hr~1 日後まで GDNF mRNA は発現が増大した。

⑩GDNF の筋注は用量依存的に痛覚過敏をおこし、抗 GDNF 抗体は伸張性収縮負荷 2 日後の機械痛覚過敏を有意に減弱した。

⑩COX-2 で産生されたプロスタグランジンがどの受容体を介して遅発性筋痛を起こしているかを、EP1, 3, 4 の受容体拮抗薬および EP2 ノックアウトマウスを用いて調べた。運動前に投与した EP1, 3, 4 受容体拮抗薬はいずれも遅発性筋痛の発現を抑制することができなかった。一方、EP2 ノックアウトマウスでは遅発性筋痛は発現しなかった。

以上のことから、遅発性筋痛を起こす経路には、ブラジキニン-B2 受容体-NGF と COX-2-EP2 受容体-GDNF の 2 つの経路があることが明らかになった。

ロ) 繰り返し寒冷ストレス (RCS) モデルにおける筋 NGF の役割

RCS (室温~4°C) 5 日間負荷後、筋機械痛覚過敏は 3 週間後まで観察された。1, 2, 3, 4, 5 週の時点で採取した腓腹筋、長指伸筋、僧帽筋、上腕三頭筋のいずれにおいても、NGF mRNA の有意な増加は見られなかった。従って、このモデルにおける筋機械痛覚過敏に、NGF は関与していない可能性が高いと考えられる。

ハ) L5 脊髄神経結紮・切断による神経障害性疼痛における NGF の役割

この方法による神経傷害によって、3 週間以上にわたって筋機械痛覚過敏が観察された。最も強く痛覚過敏が現れたのは、主として L5 後根神経節からの神経支配を受けている腓腹筋内側頭であった。L5 脊髄神経結紮・切断手術から 10 日目に腓腹筋内側頭に抗 NGF 抗体を筋注したところ、3 時間後から腓腹筋内側頭の機械逃避反応閾値は 60% 程度回復し、その後観察を続けた間 (約 2 週間) ずっとその状態を維持した。しかし、同側の長指伸筋の機械痛覚過敏は影響を受けなかった。

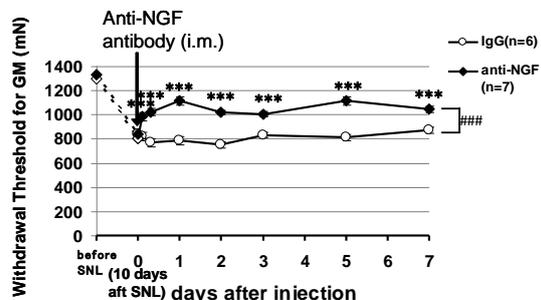


図9. SNL 手術後低下した筋機械逃避反応閾値は、抗 NGF 抗体の筋注 3 時間後から有意に回復した。

この結果から、この神経障害性疼痛のモデルにおいて、NGF は筋局所で痛覚過敏を引き起こしていることが示された。NGF 産生細胞の同定は現在進行中である。

ニ) 培養後根神経節細胞における機械電流のブラジキニンによる増強

1~5 μm の変位に対し、変位量依存的な電流が観察された。電流のパターンには速順応型(時定数<5 ms)、中間型(時定数 5-50 ms)、遅順応型(時定数>50 ms)の3種類が存在した(図10)。いずれの電流を持つニューロンもブラジキニン 10^{-8} M 1分間投与によって増強された。この増強はパッチピペット内のGTP濃度が0.2 mMの場合より2 mMの場合のほうが、増強される細胞の割合、増強程度も大きかった(図11)。

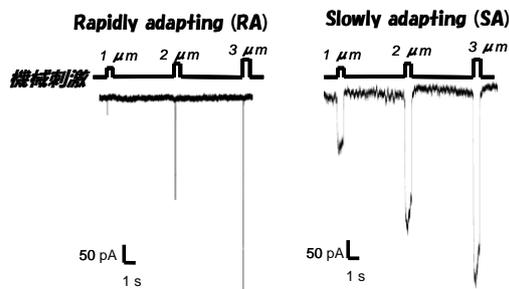


図10. 機械感受性電流の大きさは、偏位量に比例して大きくなった。

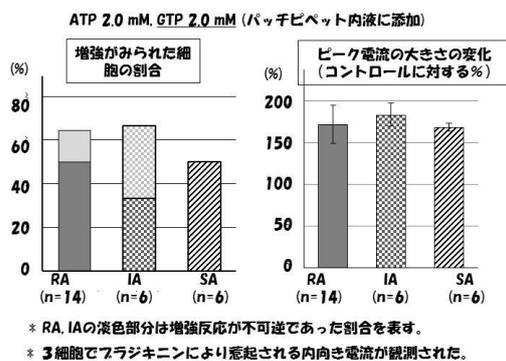


図11. 機械感受性電流の増大は、細胞内GTPが高いとよく見られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

- ① Taguchi, T. and Mizumura, K. Augmented mechanical response of muscular thin-fiber

receptors in aged rats recorded *in vitro*.

European Journal of Pain, 査読有, 15: 351-358, 2011

- ② Murase S, Terazawa E, Queme F, Ota H, Matsuda T, Hirate K, Kozaki Y, Katanosaka K, Taguchi T and Mizumura K.

Bradykinin and nerve growth factor play pivotal roles in muscular mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness). *Journal of Neuroscience* 査読有, 30: 3752-3761, 2010.

- ③ Hotta N, Taguchi T and Mizumura K. Low pH Enhances Response of Thin Muscle Afferents to Mechanical Stimuli. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 査読有, 669: 315-318, 2010.

- ④ Nasu T, Taguchi T and Mizumura K. Persistent deep mechanical hyperalgesia induced by repeated cold stress in rats. *European Journal of Pain*, 査読有, 14: 236-244, 2010.

- ⑤ 水村和枝 筋肉痛の末梢機構 関節外科 査読無, 29: 101-102, 2010

- ⑥ Gibson W, Arendt-Nielsen L, Taguchi T, Mizumura K and Graven-Nielsen T. Increased pain from muscle fascia following eccentric exercise: animal and human findings. *Experimental Brain Research*, 査読有, 194: 299-308, 2009.

- ⑦ Mizumura K, Sugiura T, Katanosaka K, Banik RK and Kozaki Y. Excitation and sensitization of nociceptors by bradykinin: What do we know? *Experimental Brain Research*, 査読有, 196: 53-65, 2009.

- ⑧ Mizumura K. Peripheral mechanism of muscle pain: An update. *Current Anaesthesia & Critical Care*, 査読無, 20: 183-187, 2009.

- ⑨ Taguchi T, Tomotoshi K and Mizumura K. Excitatory actions of mushroom poison (acromelic acid) on unmyelinated muscular afferents in the rat. *Neurosci Letters*, 査読有, 456: 69-73, 2009.

- ⑩ 水村和枝 筋性疼痛研究の最新の進歩 現代医学, 査読無, 57(1): 59-67, 2009

[学会発表] (計 47 件)

- ① Mizumura K, Murase S, Taguchi T. Role of nerve growth factor (NGF) in muscular pain. 第33回日本神経科学大会, 2010年9

月 4 日, 神戸コンベンションセンター (神戸)

- ② **Murase S, Queme F, Taguchi T, Mizumura K.** COX-2-GDNF pathway to delayed onset muscle soreness in rats. 13th World Congress on Pain, 2010 年 8 月 31 日, Palais de congres de Montreal (Montreal, Canada)
- ③ **Queme F, Nie H L, Mizumura K, Graven-Nielsen T.** Experimental muscle pain and muscle hyperalgesia after intramuscular injection of heated saline or capsaicin. 13th World Congress on Pain, 2010 年 8 月 30 日, Palais de congres de Montreal (Montreal, Canada)
- ④ **Mizumura K.** Mechanical hyperalgesia after exercise- involvement of bradykinin and nerve growth factor. IUPS2009 Wholeday symposium IV-8 'Comprehensive approaches to pain -from molecule to organism-. 2009 年 8 月 1 日, 京都
- ⑤ **Taguchi T, Queme F, Murase S, Mizumura K.** Nerve growth factor-induced muscular mechanical hyperalgesia and sensitization to mechanical stimulus of muscular C-fiber afferents in rats. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009 年 7 月 30 日, 京都
- ⑥ **Murase S, Katanosaka K, Taguchi T, Mizumura K.** B2 bradykinin receptor antagonist blocked muscular mechanical hyperalgesia after exercise by inhibiting NGF up-regulation in the muscle. The 36th Congress of the International Union of Physiological Sciences (IUPS2009), 2009 年 7 月 30 日, 京都
- ⑦ **Nasu T, Taguchi T, Mizumura K.** Repeated cold stress induced chronic hyperalgesia in the muscle as well as in the skin depending on the cold temperature used. 12th World Congress on Pain. 2008 年 8 月 20 日 Glasgow, Scotland, UK
- ⑧ **Taguchi T, Matsuda T, Nasu T, Mizumura K.** Muscular mechanical nociceptive threshold and mechanical sensitivity of muscular C-fiber receptors recorded in vitro of aged rats. Official Satellite Meeting of the 12th World Congress on Pain

"Nociceptors-New Biology" 2008 年 8 月 15 日-16 日, Edinburgh, Scotland, UK

- ⑨ **Mizumura K, Senoo S, Matsuda T, Taguchi T.** Mechanism of muscular mechanical hyperalgesia after exercise (DOMS) - Involvement of NGF-. The 3rd Asian Pain Symposium 2008 年 7 月 19 日, 福岡

[図書] (計 1 件)

- ① **Mizumura K and Taguchi T.** Facilitated response of muscle receptors after eccentric contraction. In: FUNDAMENTALS OF MUSCULOSKELETAL PAIN, edited by Arandt-Nielsen L, Graven-Nielsen T and Mense S. Seattle: IASP Press, 2008, p. 47-59.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水村和枝 (MZUMURA KAZUE)
名古屋大学・環境医学研究所・教授
研究者番号: 00109349

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

片野坂 公明 (KATANOSAKA KIMIYAKI)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 50335006

小崎康子 (KOZAKI YASUKO)
金城学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 20126882

田口 徹 (TAGUCHI TORU)
名古屋大学・環境医学研究所・助教
研究者番号: 90464156