

機関番号：16401
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21791401
 研究課題名（和文） 変形性膝関節症の疼痛発生機序における関節液の酸性化と末梢神経酸感知機構の役割
 研究課題名（英文） Role of synovial fluid acidity and acid sensing ion channel in osteoarthritic pain
 研究代表者
 池内 昌彦（IKEUCHI MASAHIKO）
 高知大学・教育研究部医療学系・講師
 研究者番号：00372730

研究成果の概要（和文）：変形性関節症の痛みの発生機序は不明な点が多い。著者らは関節液の酸性化が痛みを生じている可能性について検討した。一般に変形性関節症では関節液が酸性化することが知られている。組織の酸性化に伴って増加するプロトンは、末梢神経の酸感知機構を介して侵害受容器を興奮させる。本研究では、変形性関節症の動物モデルを作成し、末梢神経酸感知機構を介した痛みが病変部位にとどまらない他部位に拡がる痛みの形成に重要である所見を得た。

研究成果の概要（英文）：The mechanism of osteoarthritic pain is largely unknown. Nociceptors are excited by acidity through acid sensing ion channels. We examined the possibility that synovial fluid acidity might play a role in osteoarthritic pain. Our results showed that acid sensing ion channels are essential for producing widespread pain in osteoarthritis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,400,000	420,000	1,820,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：変形性関節症、関節痛、酸感受性イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

関節機能の障害は、日常生活動作を困難なものにし生活の質の低下を招く。関節疾患はそれぞれ異なった病態をもつが、関節機能の障害の主因は共通して関節痛であることが多い。変形性関節症や関節リウマチなどの病態解析により、疾患修飾作用をもつ薬剤の開発が進む一方で、関節痛の発生機序に関する研究は驚くほどに少ない。関節疾患において患者が望む医療は、究極的には痛みのある関節を痛みのない状態にすることである。し

かし、関節痛の発生機序は未だ不明な点が多いため、既存の治療法は除痛を主目的としているにも関わらず、効果が不十分で予測不能であり、思わぬ副作用を引き起こす問題点を有する。関節痛の発生機序の解明は、より効果的な治療法の開発につながることを期待される。

酸感受性イオンチャネル（ASIC）はプロトンによって開口するナトリウムイオンチャネルである。炎症、虚血、関節症などさまざまな病的状態において組織は酸性化す

るが、その pH の低下を感知する受容器である。これまでに 6 つのアイソフォームが確認されており、その中で ASIC3 は末梢神経に豊富に存在し、炎症性疼痛や筋肉痛の発生に深く関係していることが報告されている。申請者は独自に、関節痛と ASIC3 の関係について解明することを目的に基礎実験を重ねてきた。これまでに、マウスのカラゲナン急性関節炎モデルにおいて、ASIC3 は関節痛、特に炎症部位を超えて広がる疼痛の形成に重要であることを明らかにした。一方、炎症性関節疾患よりも common disease であり、炎症の関与が少ないとされる変形性関節症 (OA) の関節痛の発生機序に関しては未着手である。今回、これまでの研究成果を踏まえて、疼痛発生機序に不明な点が多い OA の痛みと ASIC3 の関連性を調査するに至った。

2. 研究の目的

炎症の関与の少ない OA の関節痛発生機序に、末梢神経に存在する ASIC3 を介した酸感知機構が関連するか否か明らかにすることである。

3. 研究の方法

ラット膝 OA モデルを作製し、疼痛行動と脊髄後根神経節 (DRG) 細胞における ASIC3 発現率の定量評価を行った。また、潤滑作用を有する治療薬として用いられるヒアルロン酸ナトリウムの末梢神経に与える影響を調査した。具体的内容は以下の通りである。

1) 膝 OA モデルの作製：雄 SD ラットの左膝関節に 2% Monosodium Iodoacetate (MIA) 50 μ L を関節注射して作製した。MIA 注射後 30 日目に膝関節を摘出し、組織学的に OA 病変を確認した。OA 病変はスコアリングシステムにより評価し、非 OA と比較検討した。

2) 疼痛行動の評価：MIA 注射後 28 日目まで定期的に (3, 7, 14, 21, 28 日目) 行動学的疼痛評価を行った。評価項目は、①荷重分布と②足底の痛覚過敏 (二次痛覚過敏) とした。①荷重分布は、incapacitance meter (Linton Instruments) を用いて計測し、患健比で表した。②足底の痛覚過敏は、von Frey フィラメント (0.04 g) 10 回反復刺激でみられる足引っ込み回数を測定した。

3) DRG 細胞の ASIC3 発現率の評価：MIA 注射後 30 日目に両側 L3-5DRG を摘出した。10 μ m 厚の凍結切片を作製し、ASIC3 の免疫蛍光染色を行った。同時に疼痛マーカーとして知られている CGRP (Calcitonin gene related peptide) も免疫染色を行った。蛍光顕微鏡で無作為に抽出した 10 切片中の ASIC3 陽性 DRG 細胞を数えた。結果は、単位面積当たりの陽性細胞個数で表し、OA と非 OA で比較検討した。

4) ヒアルロン酸ナトリウムの検討：分子量 900,000 のヒアルロン酸ナトリウムを膝 OA モデルに MIA 注射後 7, 14, 21 日目の 3 回関節内注射し、疼痛行動と 28 日目の膝組織学的検討および DRG 細胞の ASIC3 と CGRP の発現率を検討した。

4. 研究成果

本研究を遂行し、以下の成果を得た。

1) 膝 OA モデルの確立：MIA 関節注射後 28 日目の膝関節組織像では、OA に特徴的な関節軟骨の変性・摩耗と軟骨下骨の粗造化を認めた (図 1)。OA 病変のスコアリングシステムでコントロールと比べて、OA モデル群において有意に OA 変化が形成されていた (図 2)。一方で、カラゲナン急性関節炎モデルにみられるような炎症細胞浸潤はほとんど見られず、炎症の要素の少ない OA の臨床に近いモデルを確立した。

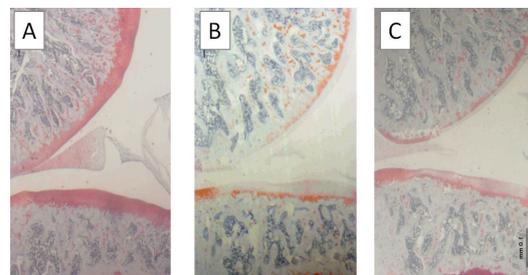


図 1 膝関節組織像 A) コントロール群 B) OA 群 C) OA+ヒアルロン酸群

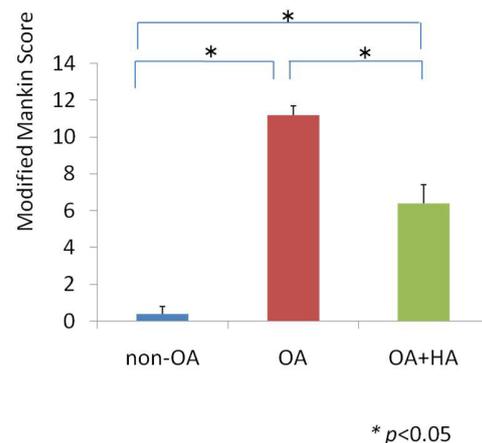


図 2 膝関節組織スコア結果

2) 行動学的評価：膝 OA モデルにおいて、関節痛のため生じる荷重分布の不均衡 (図 3) だけでなく、足底の機械的刺激に対する

痛覚過敏（二次痛覚過敏）も認めた（図4）。この疼痛の拡がりは、膝 OA の臨床に近いパターンであることを確認した。

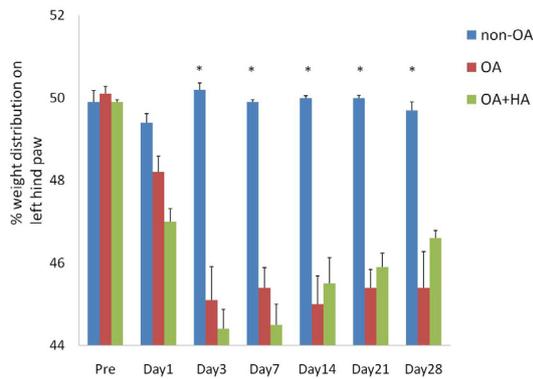


図3 荷重分布の結果

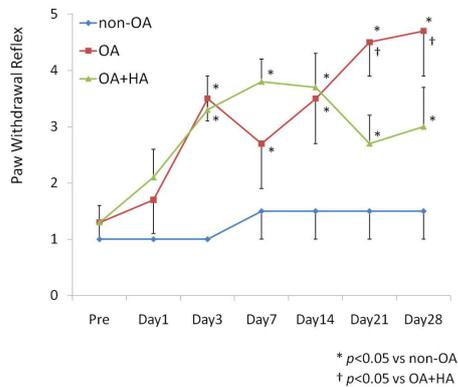


図4 von Frey test 結果（二次痛覚過敏）

3) DRG 細胞の ASIC3 発現率: DRG に ASIC3 を発現する細胞が多数あり、小型細胞に発現することが多い CGRP と比べて中～大型細胞にも ASIC3 は発現していた（図5）。免疫組織学的検討では、膝 OA モデル作成後 14、28 日目いずれにおいても後根神経節において ASIC3 の顕著な発現増加を認めた。また、本モデルでは DRG 細胞の CGRP 陽性細胞数の増加も伴っていた（図6）。

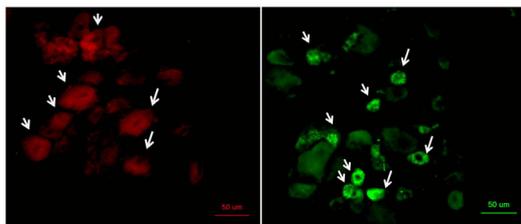
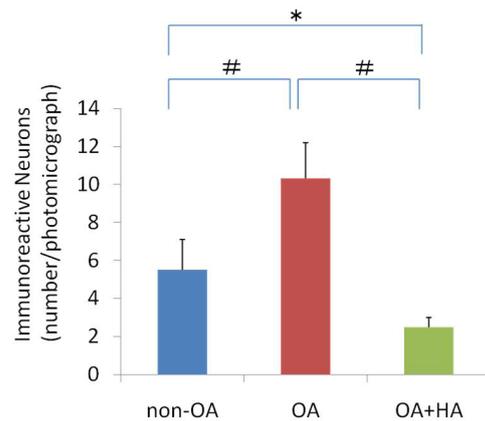
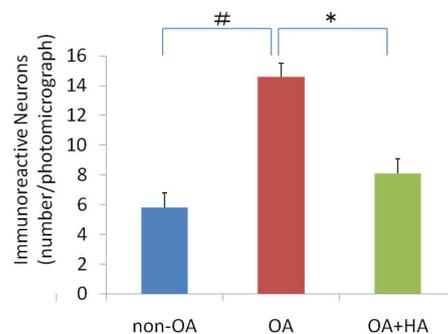


図5 後根神経節の免疫染色結果 左: ASIC3、右: CGRP



ASIC3



CGRP

* $p < 0.05$ # $p < 0.01$

図6 ASIC3 および CGRP 発現細胞数

4) ヒアルロン酸ナトリウムの検討: OA 群と OA にヒアルロン酸を注入した群の比較を行った。行動学的には、荷重分布に群間の有意差はなかったが（図3）、二次痛覚過敏は 21、28 日目に改善していた（図4）。膝関節の組織像では、ヒアルロン酸注入により OA 変化は軽くなっていた（図1、2）。また、DRG 細胞における ASIC3 発現率の低下を伴っており（図6）、ヒアルロン酸ナトリウムの末梢神経系への影響が示された。ASIC3 の発現率と二次痛覚過敏は相関しており、本モデルにおいても ASIC3 は病変を超えて拡がる痛みの形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

関節痛発生機序における ASIC の役割に関する報告は他になく、申請者らが新しく提唱したものである。既にこれまでの研究成果が引用され、ASIC が関節痛の治療における新しいターゲットになりうるとの review 報告が

あり国際的にも注目されている。本実験により得られたこれらの新知見は、OAの関節痛発生機序の一部を新たに解明するものであり、将来的な酸感受性イオンチャネルをターゲットにした新規治療法の開発に寄与するものと見込まれる。

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1件)

①泉仁、池内昌彦、陳乃峰、谷俊一、変形性関節症モデルにおける酸感受性イオンチャネル(ASIC3)の発現変化、日本整形外科学会雑誌、査読有、84巻、2010、1295-1295

[学会発表] (計3件)

①泉仁、池内昌彦、陳乃峰、谷俊一、ASIC3 upregulation in a rat model of osteoarthritis、IASP 13th world congress of pain、2010年8月30日、カナダ・モントリオール

②池内昌彦、変形性関節症における関節痛～臨床像と病態に関する検討～、第3回日本運動器疼痛学会、2010年11月28日、名古屋

③泉仁、池内昌彦、陳乃峰、谷俊一、Intraarticular hyaluronan injection changes ASIC3 expression in dorsal root ganglia in a rat model of osteoarthritis、2011 annual meeting of the orthopaedic research society、2011年1月14日、アメリカ・ロングビーチ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池内 昌彦 (IKEUCHI MASAHIKO)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：00372730

(2) 研究協力者

Kathleen Sluka (KATHLEEN SLUKA)

アイオワ大学理学療法科・教授

泉 仁 (IZUMI MASASHI)

高知大学大学院