

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08971

研究課題名（和文）老化に伴う慢性痛発症における脳内神経炎症の役割と治療応用への可能性の検討

研究課題名（英文）The role of neuroinflammation in the onset of chronic pain associated with aging and its potential for therapeutic target

研究代表者

河野 崇（Kawano, Takashi）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：40380076

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）：神経障害性痛モデル（SNL）ラットを用いて、加齢が痛覚発症機序に与える影響を検討した。若年ラットは高齢ラットと比較して、刺激による痛覚過敏様行動の発生頻度が高かった。障害神経繊維の刺激反応性には年齢差はなかったことから、加齢による痛み増強は上位中枢機序が関与すると考えられた。次に、SNLラットの海馬でのBDNF発現およびサイトカインレベルを検討した。その結果、SNL手術により、高齢ラットでは若年ラットと比較して海馬BDNF発現が有意に低下し、炎症性サイトカインの上昇が生じていた。また、海馬BDNF発現量および炎症性サイトカインレベルが痛覚過敏様行動の発現頻度と有意に相関していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者の慢性痛はQOLを大きく損なうだけでなく、認知障害や抑うつなどの神経認知異常の引き金ともなる。今回、我々は高齢者の慢性痛の代表である神経障害性痛の病態において、脳由来神経栄養因子（BDNF）の低下および脳内神経炎症が重要な役割を果たしていることを明らかにした。特に、BDNFは加齢とともに低下し、ミクログリア機能にも影響を与えることから、高齢者の慢性痛の症状に共通する機序として脳内神経炎症が関与していると推測される。本研究成果により、高齢者の慢性痛治療において、脳内神経炎症を標的とした有効でQOLを向上させる新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：Using a neuropathic pain model (SNL) rat, we explored the impact of aging on pain mechanisms. Young rats displayed a higher frequency of stimulation-induced hyperalgesia-like behavior compared to older rats. As there was no age-related difference in the stimulus responsiveness of the affected nerve fibers, it is inferred that central mechanisms contribute to the age-related intensification of pain. Subsequently, we assessed BDNF expression and cytokine levels in the hippocampus of SNL rats. The results revealed that SNL surgery significantly reduced hippocampal BDNF expression and elevated inflammatory cytokine levels in aged rats compared to young rats. Additionally, a significant correlation was found between hippocampal BDNF expression, inflammatory cytokine levels, and the frequency of hyperalgesia-like behavior.

研究分野：麻酔科学、疼痛学

キーワード：慢性痛 神経障害性痛 高齢

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会においては健康寿命を延伸することが喫緊の課題である。国民生活基礎調査によると、要支援・要介護に至る要因の実態は運動器の障害が最も多く、そのほとんどは痛みが主症状である。慢性痛とそれに伴う神経認知異常は互いに負のスパイラルを形成し、高齢患者のQOLを著しく低下させる。高齢者の慢性痛は、単に有病率が高いだけでなく、早急な対処が求められる重要な課題である。

2. 研究の目的

神経障害性痛は、体性感覚神経系の一次病変または機能不全によって引き起こされる病理学的疼痛である。特に高齢者においては、慢性神経障害性痛はその罹患率の高さと衰弱性の性質により、個人および公衆衛生上の大きな負担となっている(1)。そのため、専門家らは高齢者の神経障害性疼痛に対する適切な管理の重要性について強く認識している(2)。しかし、現在いくつかの種類の慢性神経障害性痛は、従来の鎮痛剤に対する耐性や薬物有害反応のため、依然として治療が困難とされる。複数の併存疾患や老人症候群(虚弱、認知症、うつ病、転倒、栄養失調、多剤併用など)を考慮すると、高齢者の神経障害性痛の管理は、高齢化社会が直面する最も困難な問題のひとつとなる可能性がある。

高齢者の神経障害性疼痛を理解し治療するためには、その病態メカニズムを解明する必要がある。しかし、現在のところ、神経障害性疼痛の病態における年齢特有の変化についてはほとんど知られていない。入手可能なエビデンスは、正常な老化が生理的侵害受容系に影響を与えることを示している(3)。たとえば、いくつかの研究では、実験による疼痛閾値が加齢に応じて若干増加することが報告されている。対照的に、高強度の有害刺激に対する耐性は加齢とともに減少することが示されている。

さらに、神経障害性疼痛の重要な病因である中枢感作は脊髄と脳幹で広く研究されているが、最近のヒトの画像研究では高次脳中枢の重要な役割が報告されている(4)。これらの脳領域は老化の過程で構造的および機能的に影響を受ける可能性があり、その結果、認知機能の低下やより重度の神経変性障害などの加齢に関連した病理に対する感受性が増加する。つまり、中枢性疼痛処理機構が、脆弱な高齢患者における神経障害性疼痛(慢性痛)の発症リスクに寄与している可能性があるという仮説が立てられる。

神経栄養因子、特に脳由来神経栄養因子(BDNF)は神経系で豊富に発現しており、BDNFはその高親和性受容体 TrkB を介して神経細胞の生存、再生、およびシナプス機能に関与しているとされる(5)。前臨床の証拠では、BDNF が神経損傷後の脊髄感作の発症に関連している可能性が示されている(6)。しかし、高次脳中枢における疼痛処理における BDNF の関与の可能性は依然として不明である。一般に、BDNF レベルの低下は、脳の老化の進行と、それに伴う加齢関連神経症候群に関連しているとされる。したがって、加齢に伴う疼痛過敏症が脳内の BDNF シグナル伝達の変化に関連している可能性があるという仮説を立てた。

これらの仮説を検証するために、我々は成獣ラットと老齢ラットの間で痛みを伴う神経損傷後の疼痛感受性と脳の BDNF レベル、およびそれに関連する脳内神経炎症を比較した。さらに、我々は、高齢の神経障害動物における脳標的鎮痛薬としての外因性 BDNF の治療可能性を検証した。

3. 研究の方法

(1) 高齢ラット神経害性痛モデル: Spinal nerve ligation (SNL) model の応用: 若年 2-4 ヶ月齢および高齢 24-25 ヶ月齢 SD 系雄性ラットを用いた。慢性痛は神経障害性モデルとして確立している SNL モデルを傍脊椎解剖の加齢変化に適合させた手術手技(L5 横突起を切除せず L5 神経を結紮・切断)を用いて行った。最終的な筋肉、骨への侵襲は若年・高齢両群で同一とした。対照群は皮膚切開(sham 手術)のみ行った。SNL 手術は忍容性が高く、すべての動物が研究期間生存し、平均手術時間は成獣ラット(16.8分)と高齢ラット(18.2分)で同等であった。痛みの評価は、手術前および手術 7, 14, 21 日後に行った。今回、痛覚過敏を von Frey 試験および針試験でそれぞれ測定した。

(1)-1 Paw withdrawal threshold (PWT): 後肢における機械的アロディニアは、von Frey フィラメントを昇順に適用することによって評価した。フィラメントは、メッシュ開口部の下から垂直に適用し、創傷に隣接する内側の足底表面を刺激した。フィラメントを同じ程度に曲げることで、各適用の力が最適かつ一貫したものとなった。一定の刺激を与える方法が使用され、反応に関係なくすべての動物が全範囲のフィラメントでテストされた。足を引っ込めたり舐めたりした場合は、引っ込み反応として陽性とスコア付けされた。応答がなかった場合、25g の値がしきい値として割り当てられた。

(1)-2 Probability of hyperalgesia-like behavior (PHB): Quincke 22 ゲージ脊髄針を SNL 手術後の痛

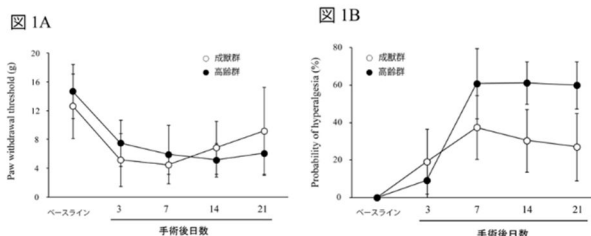
覚過敏を検出するために使用した。各後足の足底表面を針の先端で触れ、皮膚を突き刺さないように凹ませるのに十分な圧力を加えた。5回針の針刺激を各足にランダムな順序で行い、5分後に繰り返し、セッションごとに合計10回の適用を行った。これらの機械的刺激は、通常の短い反射的引っ込み、または持続的な(1秒以上)足の持ち上げ、震え、毛づくろいなどを含む痛覚過敏様(反応 hyperalgesia-like behavior)のいずれかを引き起こした。

(2) 痛覚過敏を確認するための行動検査: すべての行動実験は、研究者が治療条件を知らされていない状態で実施された。実験1では、手術前日(ベースライン)および手術後3日目、7日目、14日目、21日目に検査を実施した。薬理学的実験に関しては、結果のセクションに示すように、投与の前後に追加の試験が行われた。動物はまず4時間以上試験環境に慣れさせられ、その後、1/4インチのワイヤーグリッド上に置かれた透明なプラスチックの囲いに入れた。以前の研究に基づき、機械的離脱閾値と痛覚過敏様行動は、それぞれ von Frey フィラメントと針刺激を用いて評価した。

(3) 組織採取と酵素免疫吸着法(ELISA): 前帯状皮質(ACC)、前頭前皮質(PFC)、視床、小脳、海馬、扁桃体などの複数の皮質および皮質下の脳領域が疼痛処理に関与している。さらに、BDNF タンパク質はこれらの領域の一部で高度に発現していることが報告されている。SNL手術後21日目の行動試験の完了後に、実験組織および血清を収集した。深いイソフルラン麻酔下で動物を断頭して屠殺し、脳全体を迅速に採取した。各サンプルを、プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む氷冷溶解バッファー中でポリトロンホモジナイザーを使用してホモジナイズしました。ホモジネートを遠心分離し、上清を等分し、ELISAに必要となるまで-80°Cで凍結した。上清中のBDNFのタンパク質濃度を、ELISAキットを使用して分析した。

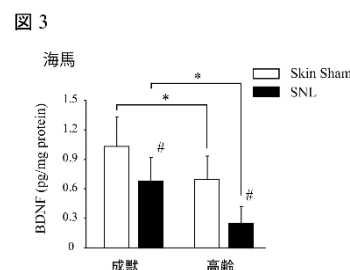
4. 研究成果

(1) 神経障害後の痛覚過敏反応: 成体および高齢ラットの痛みの強度を評価するために、von Frey 刺激によるPWT(図1A)と侵害受容針刺激後のPHB(図1B)という2つの異なる試験を使用した。Skin sham手術またはSNL手術の前には、PWTでは有意な年齢差は観察されず、成獣動物も高齢動物も痛覚過敏反応を示さなかった。Skin shamグループでは、ベースラインと比較して、PWTとPHBの両方に有意な変化は見られなかった。SNLグループでは、成獣と高齢の両方で、手術後のPWTがベースラインから減少した。一方、成獣ラットと高齢ラットの間には有意差は見られなかった。一方、PHBは成獣と高齢動物の両方で軸索切断後にベースラインから増加した。注目すべきことに、PWTとは対照的に、高齢ラットにおけるSNL手術後のPHBは成獣動物よりも有意に大きかった。



PWTとPHBの結果の違いは、アロディニアと痛覚過敏の異なるメカニズムに関連している可能性が考えられる。以前の研究では、von Frey フィラメントではなく、ピン刺激が神経障害性げっ歯類において条件付き場所回避と心血管活性化を引き起こすことが実証されている(7)。したがって、加齢の進行は痛覚過敏のメカニズムにより大きな影響を与えるが、機械的アロディニアにはそれほど影響を及ぼさない可能性がある。

(2) 手術後の脳BDNFレベル: 行動試験の後、ACC、PFC、視床、小脳、海馬、扁桃体のBDNFタンパク質レベルをELISA法を使用して測定した。高齢ラットのACC、小脳、海馬のBDNFレベルは、Skin Sham群とSNL群の両方で成獣動物のBDNFレベルよりも低かった(それぞれ $p > 0.05$)。ACCおよび小脳に関しては、Skin Sham群とSNL群との間に差はなかったが、成獣および高齢動物の両方において、SNL群の海馬BDNFレベルはSkin Sham群よりも低かった ($p < 0.05$)。Repeated measures ANOVAによる解析により、成獣動物と高齢動物の間、またはSkin Sham群とSNL群の間で、PFC、視床、または扁桃体のBDNFレベルに有意差がないことが明らかになった。一方、脊髄でのBDNFレベルは、成獣ラットと高齢ラットの両方のSkin Sham群よりもSNL群の方が高かった。ただし、年齢差は見られなかった。



神経障害性痛に関連する脊髄中枢感作の発症におけるBDNFの主要な役割に関しては多く報告されている(8)。特に、以前の時間経過分析では、脊髄におけるBDNF発現の最大の増強は初期段階で起こり、神経損傷後1-2日でピークに達し、14日までに消失することが示されている(9)。対照的に、我々は、海馬におけるBDNA mRNA発現が、高齢動物および成体動物においてそれぞれ軸索切断後7日および14日から低下することを示した。これらの結果は、海馬内のBDNFを介したシグナル伝達経路が、神経損傷後の後期における持続性の痛みの維持に寄与している可能性があることを示唆している。さらに、高齢動

物における海馬の BDNF mRNA の減少は成獣ラットよりも顕著であり、これは高齢の神経障害性げっ歯類で観察される痛覚過敏様行動の悪化の時間経過と一致していると思われる。したがって、海馬の BDNF におけるこれらの変化は、慢性痛発症に対する脆弱性と相関している可能性がある。

(3) 手術後の海馬炎症性サイトカインレベル：行動試験の後、海馬での炎症性サイトカイン (TNF- α 、IL-1 β) レベルを ELISA 法を使用して測定した。高齢ラットの海馬のサイトカインレベルは、Skin Sham 群と SNL 群の両方で成獣動物の BDNF レベルよりも高かった。

(4) 外因性 BDNF 投与による鎮痛効果：予備実験では、本研究で使用した経鼻(*i.n.*)BDNF レジメン(100 μ g/kg、7 日間)が、海馬を含む中枢神経系の TrkB 活性を増加させることが示された。さらに、単回の *i.n.* BDNF (100 μ g/kg)投与は、成獣および高齢の SNL 動物の両方において神経障害性痛に対する急性鎮痛効果を示さなかった。成獣ラットでは、対照群と BDNF 群の間に有意差はなかった。しかしながら、高齢動物では、手術後 14 日目の平均 PHB は有意に減少した。

外因性 BDNF 投与の臨床応用に関する主な懸念は、血液脳関門(BBB)透過性が低いために脳のバイオアベイラビリティが低いことである。ただし、*i.n.*薬物送達は、BBB をバイパスして脳脊髄液に直接輸送されるため、非侵襲的方法として関心を集めている。最近の研究では、*i.n.*の有効性を支持する報告の増加している。

今回、*i.n.* BDNF 投与は、加齢に伴う痛覚過敏行動の悪化を抑制した。すなわち、BDNF 治療後の同程度の PHB が成獣と高齢の SNL ラットの間に観察された。したがって、*i.n.* BDNF は加齢により減弱した海馬以下の BDNF シグナル伝達を補償することによって生じると考えられる。これらの結果は、*i.n.* BDNF 療法は、特に高齢患者において、抗うつ薬やプレガバリンなどの従来の薬物療法に代わる安全で効果的な代替手段となりえることを示している。

<引用文献>

1. McDermott AM, et al., The burden of neuropathic pain: results from a cross-sectional survey. *Eur J Pain*. 2006; 10: 127-35.
2. American Geriatrics Society Panel on Pharmacological Management of Persistent Pain in Older Persons. Pharmacological management of persistent pain in older persons. *J Am Geriatr Soc*. 2009; 57: 1331-46.
3. Gibson SJ, et al., A review of age differences in the neurophysiology of nociception and the perceptual experience of pain. *Clin J Pain*. 2004; 20: 227-39.
4. Meacham K, et al., Neuropathic Pain: Central vs. Peripheral Mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*. 2017; 21: 28.
5. D.K. Binder and H.E. Scharfman. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*, 22 (2004), pp. 123-131.
6. Marcos JL, et al., Role of the spinal TrkB-NMDA receptor link in the BDNF-induced long-lasting mechanical hyperalgesia in the rat: A behavioural study. *Eur J Pain*. 2017; 21: 1688-1696.
7. Hsiang-En Wu, et al., Learned Avoidance from noxious mechanical Simulation but not Threshold Semmes Weinstein filament Stimulation after Nerve Injury in Rats. *J Pain*. 2010; 11: 280-286.
8. Nijs J, et al., Brain-derived neurotrophic factor as a driving force behind neuroplasticity in neuropathic and central sensitization pain: a new therapeutic target? *Expert Opin Ther Targets*. 2015; 19: 565-76.
9. Geng SJ, et al., Contribution of the spinal cord BDNF to the development of neuropathic pain by activation of the NR2B-containing NMDA receptors in rats with spinal nerve ligation. *Exp Neurol*. 2010; 222: 256-66.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shigematsu-Locatelli M, Kawano T, Yasumitsu-Lovell K, Locatelli FM, Eitoku M, Suganuma N	4. 巻 303
2. 論文標題 Maternal pain during pregnancy dose-dependently predicts postpartum depression: The Japan Environment and Children's Study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Affect Disord	6. 最初と最後の頁 346-352
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jad.2022.01.039	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 神経集中治療における神経可塑性-長期予後への影響と対策-. 全身炎症と神経・認知機能障害：脳内神経炎症を標的とした予防・治療戦略
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 (シンポジウム) 基礎から臨床までプレハビリテーションを理解する：術後神経認知異常に対するプレハビリテーションの有効性：基礎的考察
3. 学会等名 日本心臓血管麻酔学会第26回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 (教育講演) 周術期せん妄対策
3. 学会等名 日本蘇生学会第40回大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 (特別講演) 病院内迅速対応システムの課題と求められるイノベーション
3. 学会等名 電気学会・計測/知覚情報合同研究会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 崇
2. 発表標題 (シンポジウム) 神経集中治療における神経可塑性-長期予後への影響と対策-. 全身炎症と神経・認知機能障害: 脳内神経炎症を標的とした予防・治療戦略
3. 学会等名 第49回日本集中治療医学会学術集会
4. 発表年 2021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
---------	---------