

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11688

研究課題名(和文)持続的なストレスによって生じる疼痛と疲労に対するヘルスプロモーションの構築

研究課題名(英文)Development of health promotion for pain and fatigue induced by persistent stress

研究代表者

安井 正佐也 (Yasui, Masaya)

常葉大学・健康プロデュース学部・准教授

研究者番号：10723695

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)：線維筋痛症(FM)は筋骨格系の激しい痛みを主症状とする慢性難治性疾患である。ストレスにより発症・増悪するが発症メカニズムは不明である。FMモデル動物として室温と冷温を反復させる繰り返し寒冷ストレス(RCS)モデルがあり、本研究では過活動となった神経細胞を特異的にGFP標識するトランスジェニックマウスを用いてRCSモデルを作製した。その結果、筋肉を繋ぐ感覚神経と運動神経の反射弓に沿ってGFP標識が観察され、脊髄の反射弓に沿ってミクログリアが活性化していた。反射弓過活動の原因筋は足底内在筋であった。ミクログリアを一時的に除去できる薬剤(PLX3397)を投与したところ、疼痛行動が有意に抑制された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維筋痛症モデルマウスでは、継続した筋緊張が固有感覚ニューロンの過活動を介してミクログリアを活性化して疼痛の慢性化につながっていることが明らかになりました。この研究結果により、線維筋痛症や筋痛性脳脊髄炎などの類似疾患を取りまとめた機能性身体症候群に共通の症状として見られる慢性疼痛は、同じようなメカニズムで生じていることを示唆していると考えられます。したがって、機能性身体症候群の患者さんに共通に見られる慢性疼痛を和らげる治療には、脳や脊髄に存在するミクログリアを標的とすることが有効である他、一部の筋の過緊張を解除し固有感覚ニューロンの過活動抑制を標的とする新たな治療法が考えられます。

研究成果の概要(英文)：Fibromyalgia (FM) is a chronic intractable disease characterized by severe musculoskeletal pain. An animal model of FM is the repeated cold stress (RCS) model, in which animals are subjected to repetitive room and cold temperatures. In this study, the RCS model was created using transgenic mice in which mitochondria are specifically GFP-labeled by neuronal hyperactivity. As a result, GFP labeling was observed along the reflex arches of sensory and motor nerves connecting muscles, and microglia were activated along the reflex arches of the spinal cord. The muscle responsible for the reflex arch hyperactivity was the plantar intrinsic muscle. Furthermore, administration of a drug (PLX3397) that can temporarily remove microglia significantly suppressed pain behavior.

研究分野：神経科学，解剖学，疼痛学

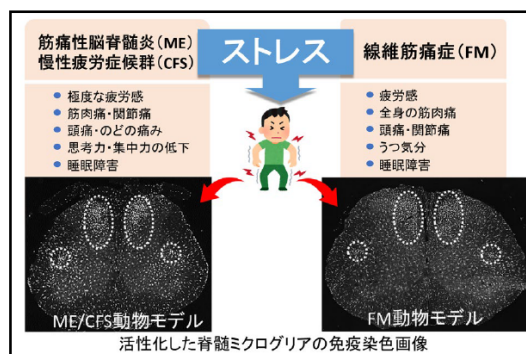
キーワード：ミクログリア 疼痛 疲労 反射弓 固有感覚ニューロン 線維筋痛症 ストレス 筋痛性脳脊髄炎

1. 研究開始当初の背景

現代社会は経済的に豊かになり科学技術も高度に発展した。しかしその反面「ストレス社会」とも呼ばれ、現代人の多くはストレスを抱え、それが誘引となって神経失調や心身症などの病気が増加傾向にある。ストレスが腰痛や肩こりを生じることにはよく知られているが、軽視されがちである。しかし、高度なストレスで発症する難治性疾患に線維筋痛症(FM)や筋痛性脳脊髄炎(ME)／慢性疲労症候群(CFS)が挙げられる。両疾患は、共通した症状により健全な社会生活が送れなくなる。

わが国の有病率は、FMが約200万人¹⁾、ME/CFSが約36万人²⁾とされ、リウマチの約80万人に対して両疾患合わせて約3倍も存在し、社会的・経済的損失は極めて大きい。身体的・精神的ストレスがどのように病態の発症に関与しているか未だ詳細は不明である。そのため、確定診断は器質的疾患を除外したのち身体所見で評価する方法しか現在は存在しない。発症メカニズムが解明されていないため、原因療法や根治療法も存在しない。

我々の研究グループはこれまでに動物実験による2つのストレス動物モデルを用いて、①REM睡眠消失、②下垂体細胞の崩壊と α MSHの増加、③胸腺の萎縮による免疫異常、④脳内セロトニン・ドーパミン代謝低下による認知障害・鬱様行動などを明らかにしてきた^{3),4),5),6),7)}。また、この動物モデルで発見された血漿中の α MSHの増加現象は、ME/CFS患者においても有意に増加しており、ストレス動物モデルがME/CFSを反映する動物モデルとしての妥当性が示唆されている⁸⁾。



【参考文献】

- 1)線維筋痛症診療ガイドライン2013
- 2)倉恒弘彦, 日本臨床, 2007
- 3)Ogawa et al, J Neurochem, 2005
- 4)Ogawa et al, J Neurochem, 2009
- 5)Ogawa et al, J Neuroendocrinol, 2012
- 6)Konishi et al, Neurosci, 2010
- 7)Konishi et al, Biochem Biophys Res Comm, 2011
- 8)Shishioh et al, BMC Neurol, 2010

2. 研究の目的

申請者はストレス動物モデルにおいて長期的な筋痛が生じる原因に脊髄後角に存在するミクログリアの活性化が関与すること、その活性化を薬剤で抑えると筋痛が抑制されることを報告した(Yasui et al, *Glia*, 2014)。さらに、脊髄ミクログリアの活性化はストレスによって生じる筋の異常な緊張が原因で、筋の張力や関節の位置覚を伝える固有感覚神経の障害が引き金となることを報告した(Yasui et al, *J. Neuroinflammation*, 2019)。

固有感覚神経は意識しない感覚のため、障害されても自覚がない。そのため症状が悪化する要因となる。しかし、ME/CFSやFMのように筋痛と共に疲労感が生じる理由は不明である。本研究の学術的「問い」は、固有感覚神経と運動神経が形成する「反射弓」が障害されるかを証明することである。疲労の神経回路は不明であるが、この反射弓の異常が極度な疲労感を生じる起点となる重要なポイントである可能性を推測している。

したがって、本研究の目的は「ストレスによる疼痛と疲労の発生メカニズム」を解明することであり、医療やヘルスプロモーションの領域にとって、ストレスによって生じる身体の疼痛や疲労感を防止することは、ストレスの多い現代社会にとって重要な課題である。

3. 研究の方法

3.1. 実験動物

実験動物にはC57BL/6マウスと、過活動した神経細胞のミトコンドリアをGFP(green fluorescent protein)で特異的に標識するAtf3:BACトランスジェニック(Tg)マウスを用いた。このTgマウスはATF3のプロモーター下でミトコンドリアを標識するGFPを発現する。GFPで標識されたミトコンドリアは樹状突起の先端から軸索の先端までニューロン全体に輸送されるため、活性化した神経回路の軌跡を明瞭に顕微鏡で観察することが可能である。

3.2. RCSモデル

線維筋痛症(FM)動物モデルとして、動物が凍傷や浮腫を生じさせない温度として7°Cと室温として22°Cの飼育環境を30分間隔で交互に変化させ、それを7日間継続して繰り返して寒冷ストレス(Repeated Cold Stress:RCS)を負荷する方法でモデルを作製した。

3.3. 疼痛行動実験

RCS前後で電子式フォンフライ装置を用いて後肢足底に圧刺激を加えて、覚醒下にて最小機械逃避閾値を測定することで痛覚過敏を定量化して評価した。

3.4. 蛍光免疫染色

RCS モデルマウスを灌流固定し、脊髄及び後根神経節(DRG)を取り出しクリオスタットにて凍結切片を作製し免疫染色を行った。使用した抗体はミクログリアのマーカーである Iba1 抗体、神経細胞の過活動マーカーとして ATF3 抗体、過活動神経回路のマーカーとして GFP 抗体を用いた。また、侵害受容ニューロンのマーカーには TrkA 抗体、CGRP 抗体、IB4 を使用し、触圧覚ニューロンのマーカーには TrkB 抗体、固有感覚ニューロンのマーカーには TrkC 抗体、VGLuT1 抗体、運動ニューロンのマーカーに ChAT 抗体を用いた。

3.5. 逆行性神経トレーサー実験

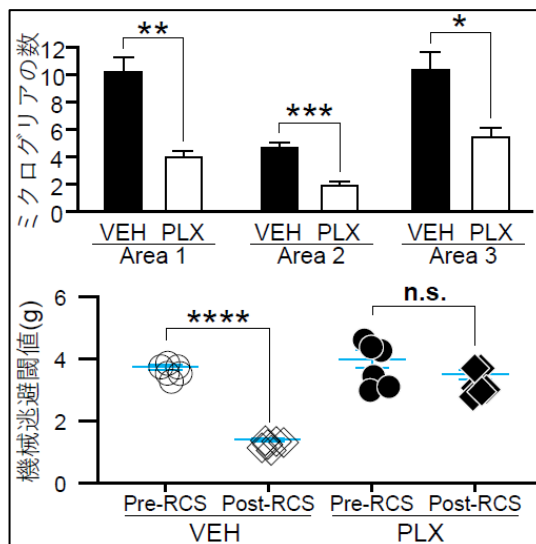
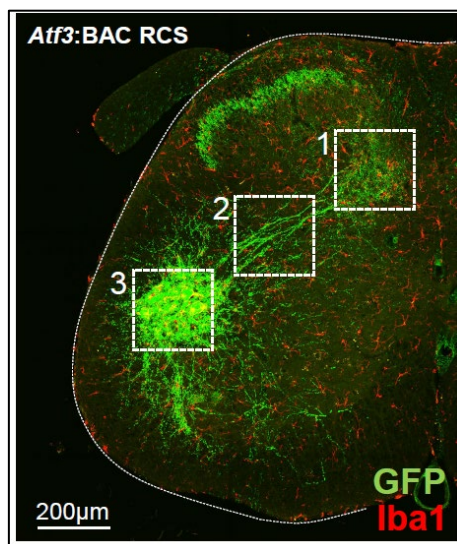
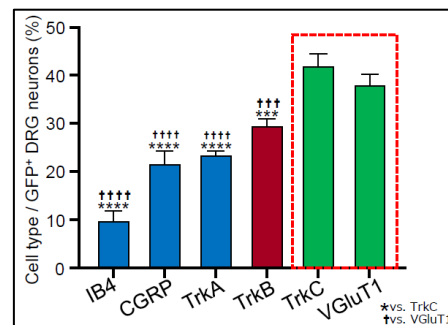
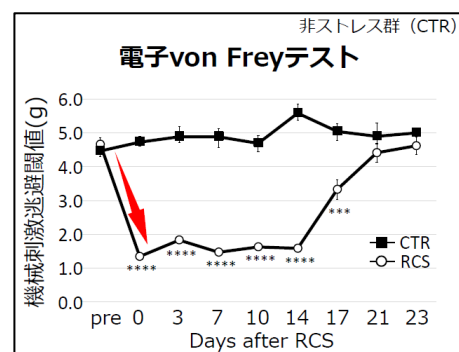
Alexa647 標識されたコレラ毒素 B サブユニット(cholera toxin b subunit: CTXb) 溶液を RCS 後の Tg マウス後肢の様々な筋肉に注射した。灌流固定後作製した脊髄切片を用いて、逆行性に蛍光標識される運動ニューロンを同定した。

3.6. 薬理実験

RCS 後の痛覚過敏が活性化ミクログリアの増加によるものかを調べるため、コロニ-1-一刺激因子 1 受容体の選択的阻害薬である PLX3397(Pexidartinib)を経口投与した。PLX3397 は RCS 開始 3 日前から投与し、RCS 期間中も継続投与した。PLX3397 を投与した群と Vehicle 投与群の RCS 前後で、電子式フォンフライ装置を用いた機械逃避閾値を比較した。

4. 研究成果

RCS 負荷したマウスは 17 日間持続する疼痛行動を誘発することが明らかになった。RCS 後の脊髄を組織学的に検討したところ、活性化ミクログリアが後角内側深層、中間帯、前角においてストレス期間依存的に増加していた。一方、DRG ではストレス期間依存的に神経過活動マーカーである ATF3 の発現が増加しており、さらに脊髄前角では一部の運動ニューロンに ATF3 が発現しており、さらに ATF3 陽性運動ニューロンの周囲にはミクログリアが集積していた。RCS によって過活動する神経回路を可視化するため Atf3:BAC Tg マウスを用いて RCS モデルを作製した。その結果、Atf3:BAC Tg マウスの DRG で発現する GFP 陽性ニューロンの多くは固有感覚ニューロンであり、他の感覚ニューロンのマーカーと比較して有意に多かった。さらに Atf3:BAC Tg マウスの脊髄前角および後角内側深層部に強く GFP が発現し、その 2 領域をつなぐ線維も GFP で標識されていた。逆行性トレーサー実験を行った結果、GFP 陽性運動ニューロンは後肢の足底筋に投射していることが明らかとなった。加えて足底筋の筋紡錘と神経筋接合部にも GFP が発現していた。従って、RCS 負荷したマウスでは、骨格筋の反射弓に沿って GFP が発現していると考えられた。さらに脊髄の足底筋の反射弓の経路に沿って、GFP の発現面積と活性化ミクログリアの数が有意に増加していた。そこで、PLX3397 を経口投与しミクログリアを除去したところ、RCS によるミクログリアの増加が抑制され、併せて疼痛行動も有意に抑制された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 安井正佐也, 若月康次, 木山博資	4. 巻 16
2. 論文標題 固有感覚の過活動に起因する慢性疼痛の発症メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本疲労学会誌	6. 最初と最後の頁 1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Wakatsuki Koji, Kiryu-Seo Sumiko, Yasui Masaya, Yokota Hiroki, Kida Haruku, Konishi Hiroyuki, Kiyama Hiroshi	4. 巻 21
2. 論文標題 Repeated cold stress, an animal model for fibromyalgia, elicits proprioceptor-induced chronic pain with microglial activation in mice	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Neuroinflammation	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12974-024-03018-6	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6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 若月康次, 安井正佐也, 桐生寿美子, 木山博資
2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレスによる線維筋痛症モデルの疼痛発症メカニズムの解析
3. 学会等名 第18回日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 若月康次, 安井正佐也, 桐生寿美子, 木山博資
2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性線維筋痛症モデルにおける痛みのメカニズムの解析
3. 学会等名 第17回日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 若月康次, 安井正佐也, 桐生寿美子, 木山博資
2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性線維筋痛症モデルにおけるミクログリア除去による疼痛抑制
3. 学会等名 第19回日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤元紀, 藤江里衣子, 胡曉晨, 安井正佐也, 若月康次, 伴信太郎
2. 発表標題 古屋大学総合診療科におけるME/CFS診療に対する集学的治療の取り組み
3. 学会等名 第19回日本疲労学会総会・学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 若月康次, 安井正佐也, 桐生寿美子, 木山博資
2. 発表標題 繰り返し寒冷ストレス誘発性線維筋痛症モデルにおける発症機序の解析とミクログリア除去による疼痛抑制
3. 学会等名 第129回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Koji Wakatsuki, Masaya Yasui, Sumiko Kiryu-Seo, Hiroyuki Konishi, Hiroshi Kiyama
2. 発表標題 Hyperactivation of proprioceptors induces chronic pain mediated by microglia in a mouse model of fibromyalgia
3. 学会等名 NEURO2024
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本疲労学会誌へ「ストレスによって生じる痛みの発症メカニズムに関する総説論文」を発表しました https://www.tokoha-u.ac.jp/teacher-news/220608-1/
線維筋痛症における慢性疼痛発症メカニズムの解明 ～固有感覚異常による疼痛誘導とミクログリアによる疼痛記憶～ / 健康柔道整復学科 安井正佐也准教授 https://www.tokoha-u.ac.jp/teacher-news/240202-001/
維筋痛症における慢性疼痛発症メカニズムの解明 ～固有感覚異常による疼痛誘導とミクログリアによる疼痛記憶～ https://www.nagoya-u.ac.jp/researchinfo/result/2024/01/post-618.html

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
研究 分 担 者	桐生 寿美子 (Kiryu-Seo Sumiko) (70311529)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

	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
研究 協 力 者	若月 康次 (Wakatuki Koji)	名古屋大学・大学院医学系研究科機能組織学分野・研究員 (13901)	
研究 協 力 者	木山 博資 (Kiyama Hiroshi)	名古屋大学・大学院医学系研究科機能組織学分野・教授 (13901)	
研究 協 力 者	佐藤 元紀 (Sato Motoki)	名古屋大学・医学部総合診療科・医局長 (13901)	

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