

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791358

研究課題名(和文) 難治性疼痛へのガンマナイフ照射による鎮痛効果発現メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of anti-nociceptive mechanism induced by gamma knife irradiation for intracranial pain

研究代表者

矢ヶ崎 有希 (Yagasaki, Yuki)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：90392422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：臨床において、癌性疼痛や視床痛などの難治性疼痛に対し、下垂体へのガンマナイフ照射が鎮痛効果をもたらすことが報告されているが、その作用機序は不明である。

本申請研究はラット下垂体への正確なガンマナイフ照射方法を確立し、ガンマナイフが与える影響を行動学的・組織学的に検討することで、そのメカニズムの解明を目指す。まず、正常ラット下垂体へガンマナイフを照射法を確立し、疼痛行動を解析したが、有意な差は認められなかった。また、組織学的解析では、下垂体のマクロファージ/ミクログリアの有意な増加が認められた。現在、慢性炎症性疼痛でも同様の解析を行い、ガンマナイフによる鎮痛効果発現メカニズム解明を目指している。

研究成果の概要(英文)：Gamma knife pituitary radiosurgery (GKPR) is used to manage cancer pain and has provided marked effects. However, the analgesic mechanism of GKPR remains unclear. We established a GKPR method for rats. Since pituitary atrophy was observed after high-dose GKPR, we confirmed that the GK irradiation had been correctly performed on the rat pituitary. Next, we determined the effects of 120Gy GK irradiation, a dose similar in energy to actual treatment, on the pituitary. However, no behavioral changes related to nociceptive responses were observed after GK irradiation of pituitary in the normal rat. Immunoblotting and histochemical analysis showed that Iba-1 positive cells (macrophage/microglia) were significantly increased at the GK treated pituitary. Further studies, such as GK irradiation of the pituitary in a chronic inflammatory pain model, may clarify the mechanisms underlying the anti-nociceptive effects induced by GK.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：機能脳神経外科学 ガンマナイフ 難治性疼痛 下垂体 マクロファージ 慢性炎症性疼痛 慢性神経因性疼痛

1. 研究開始当初の背景

三叉神経痛や癌性疼痛などの難治性疼痛は、薬物ではコントロールできない臨床例も多く、ガンナイフの鎮痛効果は臨床において大きな意味を持つと考える。本学脳神経外科において、三叉神経痛に対しては80%以上の患者に痛み軽減効果が現れることが、癌性疼痛に関しては下垂体照射により90%以上の患者で48時間以内に鎮痛効果が現れることが確認されている(Hayashi, M. *Prog Neurol Surg* 22: 182-190 2009, Hayashi, M. et al. *Stereotact Funct Neurosurg* 81: 75-83 2003)。癌性疼痛に関しては、ガンナイフ治療が開発されるより以前から、下垂体摘出、下垂体へのアルコール注入、電気刺激による治療が行われ、下垂体への種々の処置による鎮痛効果が報告されている(Brodkey, J. et al *N Engl J Med* 299: 1016 1978, Check, W. *JAMA* 242: 2164-2169 1979)。下垂体摘出動物を用いた基礎的な実験においても同様の鎮痛効果が報告されており(Bomholt, S. et al *Brain Res* 1044, 216-226, 2005)、下垂体への処置により鎮痛効果が得られることはヒト、動物両方で確認されている。しかし、鎮痛効果の発現メカニズムに対しては、視床下部からの下行性抑制系の関与、下垂体から分泌されるエンドルフィンの関与、全く新しい下垂体鎮痛機構など多くの可能性が示唆されているが、未だ結論には至っていない(Ramirez, L. et al. *Neurosurgery* 14: 499-504 1984)。

近年、末梢炎症や侵害受容により産生されるTNF- α 、IL-1、IL-6などの炎症性サイトカインは末梢だけでなく脳においても産生され、痛覚感受性を修飾していることが示唆されている(Hori, T. et al *Ann N Y Acad Sci* 840, 269-281 1998)。IL-1においては、低用量のIL-1脳室内投与によって痛覚過敏を惹起し、逆に高用量は鎮痛作用を示すという、二相性の疼痛制御が報告されている(Yabuuchi, K. et al *Eur J Pharmacol* 300: 59-65, 1996)。

申請者はガンナイフの三叉神経痛の治療機序の解明を目指し、研究を遂行してきた。その過程で、損傷神経にガンナイフを照射することにより、早期にマクロファージが集積することを明らかにした。以上より下垂体へのガンナイフ照射により、下垂体の機能変化、特にマクロファージ・ミクログリアの集積、それに伴うサイトカイン産生などが鎮痛効果に関与している可能性があるのではないかと考えた。そこで、本申請研究では、ラット下垂体へのガンナイフ照射法を確立し、下垂体へのガンナイフ照射後の行動解析および、下垂体の組織学的解析を行い、ガンナイフによる鎮痛効果のメカニズム解明を目指すことにした。

また、ガンナイフ照射時(難治性疼痛時)の下垂体の状態の基礎的な研究は今までに

ほとんど行われていないのが現状であったため、基礎研究として慢性疼痛時の下垂体における反応を、慢性炎症性疼痛モデルと慢性神経因性疼痛モデルを用いて検討することとした。本申請研究では特に非分泌細胞(マクロファージ/ミクログリアおよびFolliculostellate cell)の動態と炎症性サイトカインに着目することとした。

2. 研究の目的

本研究はラットを用いた基礎研究により、難治性疼痛患者へのガンナイフ下垂体照射による鎮痛効果発現メカニズムの解明を目指す。

目的達成のため以下の実験を計画した。

- 1) 下垂体へのガンナイフ照射法を確立し、その影響を行動学的、組織学的に検討する。
- 2) 基礎研究として、慢性疼痛時の下垂体の組織学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 下垂体へのガンナイフ照射の影響

ガンナイフ照射部位のplanning
ラット(9週齢雄 Wistar)はペントバルビタール(50 mg/kg)で麻酔し、Régis-Valliccioni frameに固定した。Heavy-T1, T2MRI画像を取得し、Leksell Gamma Plan treatment planning systemにより、照射部位の中心が下垂体となるようにplanningを行った。中心最大線量は120Gy(臨床で下垂体照射に使用されるunit energyと同等)または180Gy(高線量)を用いた。

正常ラット下垂体へのガンナイフ照射後の行動解析

正常ラットの下垂体にガンナイフ120Gyを照射し、経時的に(~12週まで)疼痛行動が現れるか検討した。具体的には温熱性痛覚過敏をPlantar Test(Ugo Basile, Milan, Italy)により、機械刺激性アロディニアをAutomated Von Frey type system(Ugo Basile, Milan, Italy)により検討した。また、12週後にホルマリンテストを行い、急性炎症性疼痛の疼痛行動を解析した。

ガンナイフ照射後の下垂体における組織学的検討

120Gyのガンナイフを下垂体へ照射し、3ヶ月後に還流固定を行い、下垂体の凍結切片を作製した。抗Iba-1抗体を用いて、マクロファージ/ミクログリアの動態を、抗S100抗体を用いてFolliculostellate cellの動態を解析した。

(2) 慢性疼痛時の下垂体の基礎的な組織学的解析

慢性疼痛モデルラットの下垂体の組織学的解析

基礎的研究として、慢性疼痛(炎症性、神経因性)における下垂体の変化を検討した。慢性炎症性疼痛モデルは、ラット後肢足底にフロイント不完全アジュバント(100 μ l)を皮

下注することにより作製した。また、慢性神経因性疼痛モデルは坐骨神経部分結紮モデル (Seltzer et al. Neurosci Lett. 115:62-7, 1990) を用いた。両慢性疼痛モデルとも、モデル作製 1 週間後の下垂体の組織学的変化を解析した。

慢性疼痛モデルラットの下垂体における炎症性サイトカインの発現

慢性炎症性疼痛モデルおよび慢性神経因性疼痛モデルの下垂体における IL-1 および IL-6 の発現量を ELISA 法により解析した。また、抗 IL-1 抗体、抗 Iba-1 抗体、抗 S100 抗体を用いて免疫二重染色を行い、IL-1 を発現する細胞が下垂体に存在するか検討した。

4. 研究成果

(1) 下垂体へのガンマナイフ照射の影響

ラット下垂体へのガンマナイフ照射法の確立

MRI 取得画像を元に Leksell Gamma Plan treatment planning system を用いて下垂体への照射方法を確立した (図 1)。

高線量 (180Gy) の照射により、3 カ月で下垂体重量が約半分にまで減少することが判明した (図 2)。

このことから、下垂体にガンマナイフが正確に照射されていると判断し、その後の実験を行った。また、アザン染色により下垂体重量減少の要因が酸好性細胞 (成長ホルモン産生細胞及びプロラクチン産生細胞) の減少によることも判明した (図 3)。下垂体前葉の細胞種によりガンマ線の放射線感受性が異なるという新たな知見が得られた。

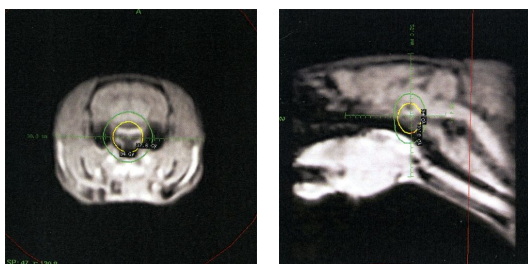


図 1 planning の 1 例
冠状断：左、矢状断；右
80% isodose area. 黄色；50% isodose area.

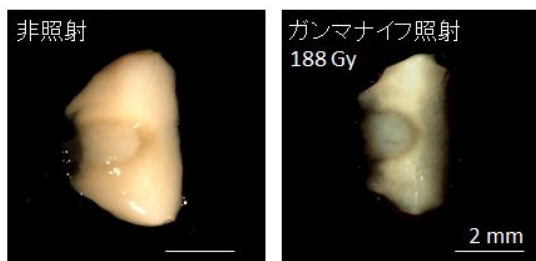


図 2 高線量照射 3 ヶ月後の下垂体

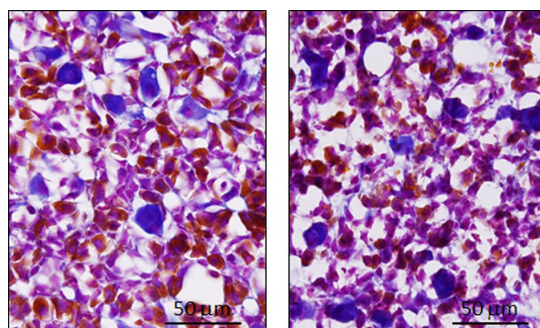


図 3 ガンマナイフ照射後の下垂体のアザン染色像 (非照射群：左、ガンマナイフ照射群：右)

正常ラット下垂体へのガンマナイフ照射後の行動解析

正常ラットの下垂体にガンマナイフ 120Gy を照射し、12 週間まで経時的 (毎週 1 回ずつ) に温熱性痛覚過敏を Paw Flick Test により、機械刺激性アロディニアを Von Frey Test により検討した。しかし、どの時点においても、非照射群と比較して有意な差は認められなかった。また、照射 12 週間後に行ったホルマリンテストでも、第 1 相、第 2 相とも照射群と非照射群との間に有意な差は認められなかった。このことから、正常ラットに 120Gy のガンマナイフを照射しただけでは、疼痛行動に大きな変化は認められないことが明らかとなった。

ガンマナイフ照射後の下垂体における組織学的検討

ガンマナイフ 120Gy 照射 12 週間後の下垂体を還流固定し、抗 Iba-1 抗体および抗 S100 抗体を用いて免疫染色を行った。ガンマナイフを照射した下垂体では、Iba-1 陽性細胞 (マクローファージ/ミクログリア) の有意な増加が認められた。一方、S100 陽性細胞の増加は認められなかった。

2) 慢性疼痛時の下垂体の基礎的な解析

慢性疼痛モデルラットの下垂体の組織学的解析

申請者は、慢性炎症性疼痛時の下垂体においてマクローファージ/ミクログリアが増加し、形態変化が生じることを明らかにした。このとき、Folliculostellate cell は細胞数の増加・形態変化は認められなかった。また、慢性神経因性疼痛モデルの下垂体ではマクローファージ/ミクログリアおよび Folliculostellate cell はコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。

慢性疼痛モデルラットの下垂体における炎症性サイトカインの発現

慢性炎症性疼痛モデルおよび慢性神経因性疼痛モデルの下垂体における IL-1、IL-6 の発現量を ELISA 法により解析した。慢性炎症性疼痛の下垂体でのみ、IL-1 タンパク質の発現量がコントロール群と比較して有意に増

加することが明らかとなった。一方、IL-6の増加は認められなかった。

慢性神経因性疼痛モデルの下垂体のIL-1、IL-6のタンパク質発現量はコントロール群と比較して有意な差は認められなかった。

本申請研究において、申請者はラットの下垂体への確実なガンマナイフの照射方法を確立した。さらに、正常ラットの下垂体へのガンマナイフ照射を行い、照射3ヶ月後において、坐骨神経へのガンマナイフ照射と同様に、ミクログリア/マクロファージの集積が認められることを明らかにした。しかし、ガンマナイフ120Gy照射12週間後までの行動解析結果のみではあるが、正常ラット下垂体にガンマナイフを照射しても、痛覚鈍麻または痛覚過敏のような疼痛行動の変化は認められなかった。

一方、今回の研究により、慢性炎症性疼痛時の下垂体において、IL-1がマクロファージより産生されることが明らかとなった。中枢神経系ではIL-1は発現量によって、鎮痛または痛覚過敏へと痛覚感受性を修飾することが示唆されている。今後は下垂体のIL-1の発現量も中枢神経系と同様に疼痛行動に影響を与えるか、詳細に検討する予定である。

また、慢性炎症性疼痛モデルラットの下垂体へガンマナイフを照射し、その後の疼痛反応の変化を検討すると共に、下垂体のマクロファージ/ミクログリアの動態、およびIL-1の発現量に着目し、疼痛行動との相関の有無を明らかにしたい。

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3件)

Yagasaki, Y., Hayashi M, Tamura N, Kawakami Y. Gamma knife irradiation of injured sciatic nerve induces histological and behavioral improvement in the rat neuropathic pain model. PLOS ONE; 8: e61010 (2013) (査読有)

Sogabe S, Yagasaki, Y., Onozawa K, Kawakami Y. Mesocortical dopamine system modulates mechanical nociceptive responses recorded in the rat prefrontal cortex. BMC Neuroscience 14: 65 (2013) (査読有)

Onozawa K, Yagasaki, Y., Izawa Y, Abe H, Kawakami Y. Amygdala-prefrontal pathways and the dopamine system affect nociceptive responses in the prefrontal cortex. BMC Neuroscience 12: 115 (2011) (査読有)

〔学会発表〕(計4件)

矢ヶ崎有希、片山洋子、長田知也、木下陽子、川上順子

Iba-1 positive macrophage is activated in the anterior pituitary in the chronic inflammatory pain model rat.

第91回日本生理学会大会 鹿児島 2014.3
The Journal of Physiological Sciences 64: Suppl. 1, S262 (2014)

矢ヶ崎有希、片山洋子、木下陽子、林基弘、田村徳子、長田知也、川上順子
Establishment of the gamma knife pituitary radiosurgery for a rat : Study for management of intractable pain with gamma knife.
第35回日本神経科学大会 名古屋 2012.9

矢ヶ崎有希、林基弘、片山洋子、長田知也、木下陽子、川上順子
Mechanism of therapeutic effect of neuropathic pain induced by gamma knife surgery.
第34回日本神経科学大会 横浜 2011.9
Neuroscience Res. 71S, e361 (2011)

片山洋子、木下陽子、矢ヶ崎有希、川上順子
Histological analysis of pituitary gland in acute and chronic pain rat models.
第34回日本神経科学大会 横浜 2011.9
Neuroscience Res. 71S, e157 (2011)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕 出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕 ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
矢ヶ崎 有希 (YAGASAKI YUKI)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号：90392422