

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590725

研究課題名(和文) 癬痕性疼痛の発生・遷延化の制御因子の同定

研究課題名(英文) Identification of the control factor of occurrence and prolonged pain of scarring. Identification of regulator generation and prolonged pain of scar

研究代表者

末富 勝敏 (SUETOMI, Katsutoshi)

愛知医科大学・医学部・客員研究員

研究者番号：70235836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：足底部癬痕によって慢性痛覚過敏を生じるモデル動物をラット及びマウスにおいて作成した。ラットによる解析では手術をした後肢で特異的に非侵害性機械刺激に対する痛み閾値が著しく低下し術後12週間後まで持続した。その癬痕組織では、コラーゲン線維が真皮層から筋層まで発達し、線維芽細胞が集積していることが観察された。L5脊髄神経においては神経線維のミエリン鞘の断片化が検出された。L5脊髄後角におけるc-FOS陽性神経線維については手術側と非手術側の差を認めなかった。マウスモデルでも同様の痛覚過敏が観察され、DRGではTNFおよびInterleukin関連の遺伝子が増加していることが分析された。

研究成果の概要(英文)：The animal model with painful scar was developed in rats and mouse by extensively stripping subcutaneous tissue from the plantar in the hind paw. The mechanical pain threshold decreased specifically in the ipsilateral plantar in animals with scar. This state was maintained for 12 weeks. A collagen layer developed from fibers derma to the muscular layer in the scar tissue in which many fibroblasts were observed. No statistical differences were found for the areas of the c-Fos-immunoreactive (c-Fos-IR) neurons in the ipsilateral and contralateral sides of the L5 level of the dorsal horn in both the Scar group and Pinhole (sham operation) group. However, myelin sheath fragmentation of the nerve fibers was observed in the ipsilateral dorsal root at the L5 position. Similar behavioral findings were observed in mouse models and TNF and Interleukin associate mRNA was increased in ipsilateral DRG.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学、疼痛学

キーワード：癬痕 慢性疼痛 マクロファージ コラーゲン線維 CGRP ED-1 -SMA

1. 研究開始当初の背景

事故による筋の挫滅や外科的手術後の筋損傷などにより引き起こされる筋組織の癒痕化は、臨床上大きな問題となっている。特に癒痕化は運動障害のみならず痛みを惹起することも多く、慢性痛の要因として注目されている。そのため癒痕化疼痛を発症している患者は、多くが痛みを慢性化(固定化)させ、治癒または寛解することが少ない。また、事故に限らず手術を受けた後に長期間持続する創部周囲の痛みは、難治性の経過を辿り、患者の日常生活の質を著しく低下させるため、治療は困難を極めていた。このような癒痕化のメカニズムを明らかにし、治療法を確立させるため、動物を用いて研究を行うこととした。

2. 研究目的

(1)事故や手術後の筋損傷などにより引き起こされる筋組織の癒痕化のメカニズムを明らかにするため、同様の動物モデルをラット作製し、癒痕から慢性の痛覚過敏モデルを確立する。

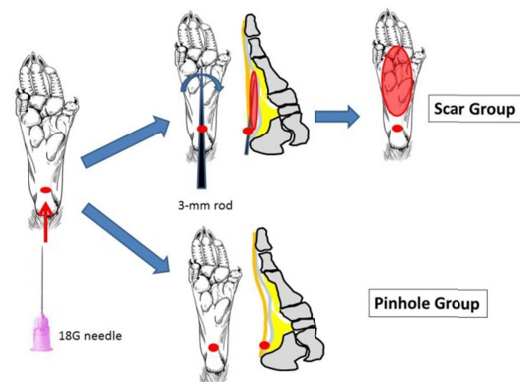
(2)手術後の癒痕性疼痛が持続するメカニズムを明らかにするために、ラットの後肢足底に癒着性癒痕を作製し、癒痕に起因した疼痛が3ヵ月以上遷延する動物モデルを独自に構築する。

(3)これまで動物モデルとしてラットを使用してきたが、今後マウスを用いた研究を進めるため、これまで行ってきたラットをマウスに置き換え、同様に比較検討し、マウスにおける癒痕から慢性への痛覚過敏モデルを確立する。また、骨格筋肉組織の発生・分化・機能維持や炎症性変化に関連が報告されている細胞外マトリックス分子(ヒアルロン酸、ヒアルロン酸共有結合タンパク質など)が癒

痕による慢性痛に影響しているかどうかについても検討する。

3. 研究方法

ラット後肢踵部から足趾まで腱組織様の深部組織を広範に剥離することで、皮下組織に癒着性癒痕を作製する(Scar Group)。尚、比較のために後肢踵部から足趾まで針を刺入のみ行ったPinhole Groupを作成する。



(1)術後12週間まで、Scar GroupとPinhole Groupに対してvon Frey系を用いて痛覚閾値測定を行い痛み関連行動の推移を観察する。

(2)Scar Groupの終焉組織における炎症反応の鎮静化と癒痕形成の程度を評価するため、手術後28日目までの組織の損傷並びに癒痕の有無や程度は、HE染色ならびにMT染色法並びに免疫組織染色法で判定した。

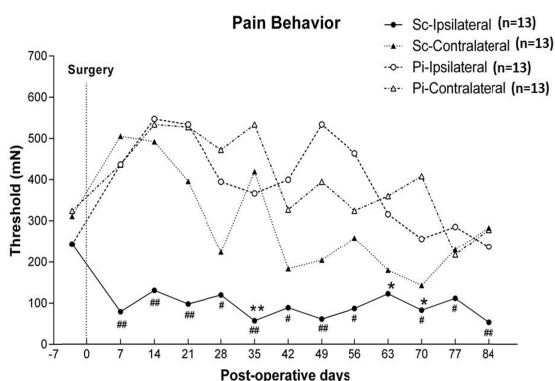
(3)Scar GroupとPinhole Groupにおいて、脊髄(L5)のc-FOS免疫蛍光染色を行い評価した。また、電子顕微鏡を用いて脊髄後角における微小神経組織の変化を調査した。

(4)これまで行ってきたラットモデルをマウスに移行し、モデル動物が両側性に痛覚過敏を長期に引き起こすことを確認すると同時に、痛覚閾値の低い術後1週間と2週間に、足底の筋肉組織及び脊椎神経節(DRG、L2~

L5)を採取して、組織の totalRNA を抽出し、マイクロアレイ法による解析を行った。

4. 研究成果

(1) 手術をした後肢で特異的に非侵害性機械刺激に対する痛み閾値が著しく低下し、手術後 3 日目から 12 週間後まで痛み閾値の低下が持続した。

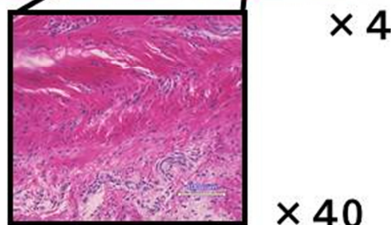
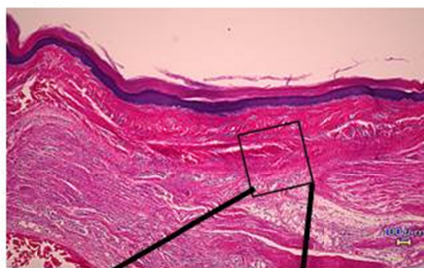


Sc : Scar Group

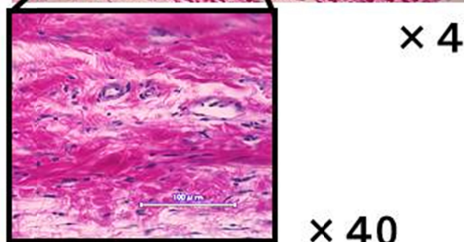
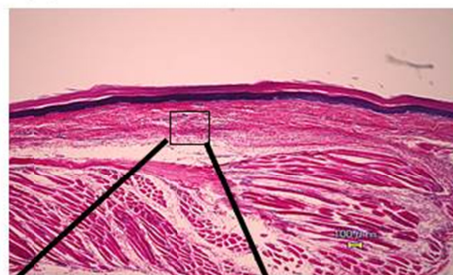
Pi: Pinhole Group (論文)

(2) ラットモデルにおいて、マクロファージは 1~7 日目において損傷部 (真皮或いは真皮深部) に多数集積し、その後、数は減少するものの 14 日目にも残存していた。

筋線維芽細胞は、その集積が処置後 7 日目に真皮深部において認められた。CGRP の発現は、1~7 日目に癒痕側で特に表皮全層に強く発現し、真皮乳頭から表皮に伸びる CGRP 陽性繊維も認められた。10 日目以降、その発現は両側共に徐々に減弱し、その違いも小さくなったが、21 日目には両側とも 14 日目より逆に上昇した。さらに 7 日目には、真皮深部において上記 3 種の指標が共局在化し、大型の楕円形の核を持つ細胞集団がコラーゲン線維間に認められた。10 日目には、密に走行したコラーゲン線維間に線維芽細胞が認められた。



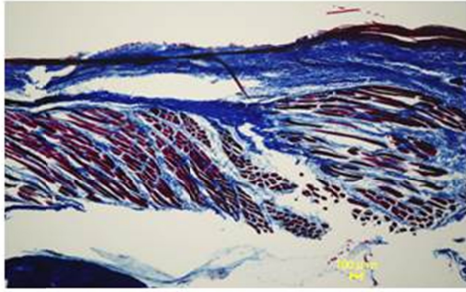
Scar Group の手術部足底組織の HE 染色像 (論文 より)



Pinhole Group の足底手術部組織の HE 染色像 (論文 より)



Scar Group の手術部足底組織の MT 染色像 (論文 より)

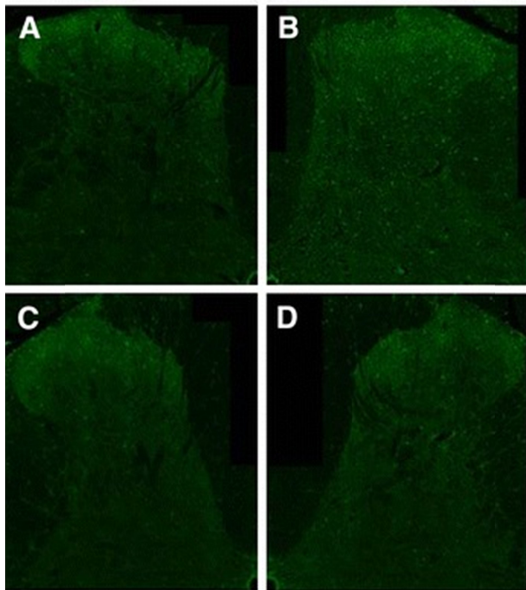


× 4

Pinhole Group の手術部足底組織の MT 染色像
(論文 より)

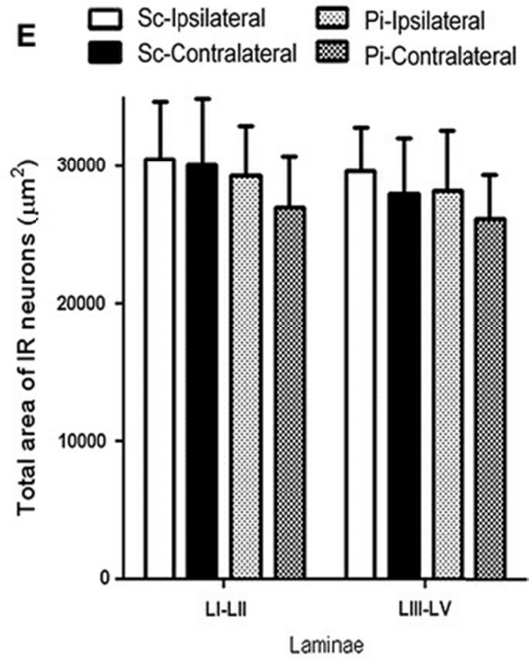
(3)

脊髄 (L5) における c-FOS 免疫蛍光染色



Scar Group 非治療側 A, 治療側 B

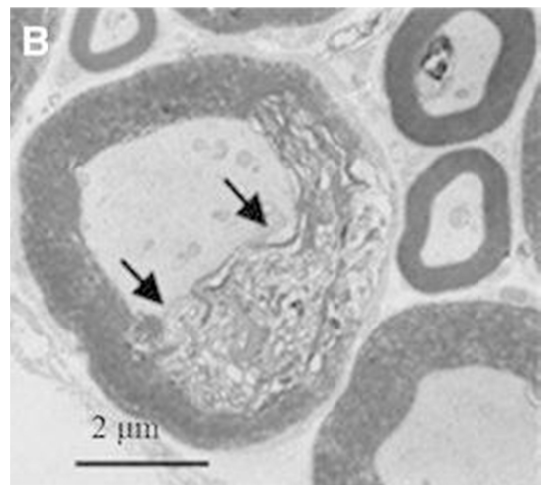
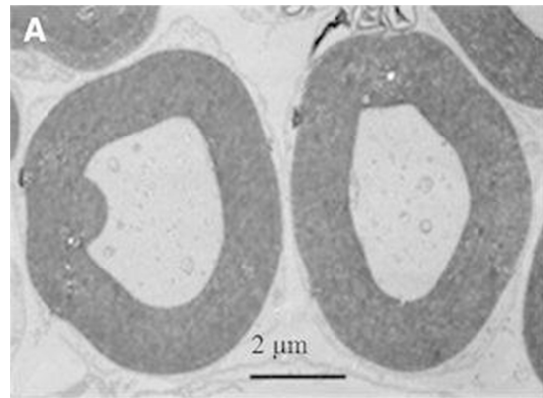
Pinhole Group 非治療側 C, 治療側 D



(論文 より)

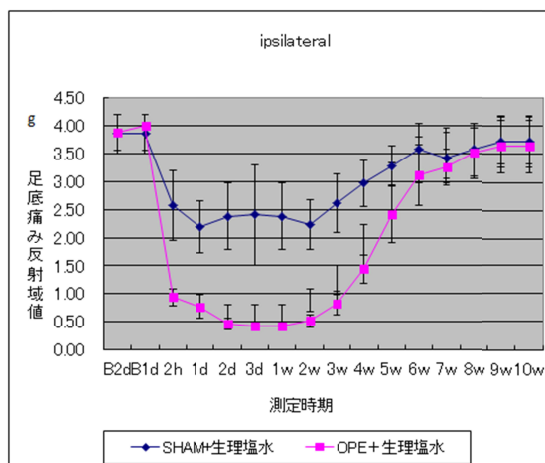
L5 脊髄後角における c-FOS 陽性神経線維については手術側と非手術側の差を認めなかった。

電子顕微鏡における脊髄後角神経線維変化



L5 脊髄後角における神経線維の電子顕微鏡像(上段 : Pinhole Group, 下段 : Scar Group)
(論文 より)

(4)モデルマウスにおいても、ラットと同様に両側性に痛覚過敏を長期に引き起こすことを確認した。



現在は、これらによる結果に踏まえて、タンパク質レベルで比較検討を行うために、DRG および瘢痕部位において変動のある mRNA を解析した結果では、IL1、IL15 やこれらの受容体、TNF 関連遺伝子、各種細胞外マトリックス関係の遺伝子の増加が認められていた。今後は更に機能解析に結びつける分析研究を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[論文] (1 件)

Kajita Y, Suetomi K, Okada T, Ikeuchi M, Arai YC, Sato K, Ushida T. Behavioral and neuropathological changes in animal models of chronic painful scar. J Orthop Sci. 2013 Nov;18(6):1005-11
DOI:10.1007/s00776-013-0453-7

6. 研究組織

(1)研究代表者

未富 勝敏 (S U E T O M I , K a t s u t o s h i)
愛知医科大学・医学部・客員研究員
研究者番号 : 7 0 2 3 5 8 3 6

(2)研究分担者

西原 真理 (N I S H I H A R A , M a k o t o)
愛知医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 6 0 3 8 0 3 2 5

井上 真輔 (I N O U E , S h i n s u k e)
愛知医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 8 0 4 0 3 9 0 5

(3)研究協力者

梶田 幸宏 (K A J I T A , Y u k i h i r o)
愛知医科大学