

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：23903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659702

研究課題名(和文) 痛み関連バイオマーカーの探索研究

研究課題名(英文) A study searching for pain-associated biomarkers

研究代表者

杉浦 健之(Takeshi, Sugiura)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：20295611

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：末梢性神経障害性(疼)痛の診断及び治療効果判定に用いることができる検査として、神経障害性(疼)痛における特異的なバイオマーカーを新たに探索することを本研究の目的とする。痛み動物モデルを用いた行動実験で痛覚過敏様行動を確認した。バイオマーカーを測定する検体に、神経、髄液、血液を採取したところ、髄液は計測サンプルとしては適切な状態ではなかった。試料の調整が技術的に困難であったため、質量分析をすべきタンパクの同定はできていない。

研究成果の概要(英文)：The Aim of this study is to identify the specific biomarker for neuropathic pain, as for diagnosis of neuropathic pain and evaluation of therapeutic efficacy. We confirmed the hyperalgesia-like behavior in the pain animal model. The use of cerebrospinal fluid as a sample to measure the biomarker is more challenging than spinal, peripheral nerve and blood. We could have not identified the appropriate protein to analyze for biomarker of neuropathic pain due to technical difficulties for adjustment of materials.

研究分野：外科系臨床医学 麻酔・蘇生学 疼痛管理額

キーワード：バイオマーカー 痛み病態モデル

1. 研究開始当初の背景

(1) <国内外の研究動向> 痛みの研究が集学的に進められたことにより、これまでに多くの劇的な研究成果が挙げられ、“組織損傷や炎症、末梢神経損傷に伴い、侵害受容神経が可塑的に変化し、痛覚過敏を形成する一機序となる”ことが分子レベルで解明されたことは、たいへん大きな成果のひとつである。しかしながら臨床では、その病態の複雑さゆえ、未だ慢性痛、神経障害性(疼)痛の病態把握はしばしば困難であり、国際的に見ても適切な評価方法がなく、診断・治療に苦慮している。神経障害性(疼)痛の診断では、患者の訴える症状に加え、補助的に神経伝導速度の測定など電気生理学検査や、サーモグラフィーなどの生理機能検査が行われているが、検体検査などで病態が診断できるバイオマーカーは、まだ研究が全く進められていないのが現状である。

(2) 神経障害性(疼)痛においては、認知因子、感覚神経の可塑的变化はもちろんニューロマトリクスを形成する脳を含めた中枢神経系の機能的結合障害、自律神経系や内分泌系も関与し、病態を複雑にしていると考えられる。実臨床では病態を把握するための検査として、感覚神経の機能的な検査では、痛み閾値の測定や、神経伝導速度の測定が行われている。また心電図 R - R 間隔の測定により自律神経、特に交感神経系異常の程度をとらえることができる。さらにストレス関連のバイオマーカーとして、コルチゾールや、アミラーゼを測定することで内分泌系異常をとらえることが可能である。神経系の疾患では、うつ病のバイオマーカーとして BDNF が最近注目されているが、神経障害性(疼)痛に特異的なバイオマーカーは、我々の知る限り世界的に見ても未だ有用なものはない。

2. 研究の目的

(1) 前立腺癌の血清 PSA 値など、様々なバイオマーカーが実際の診断や治療の選択に使われている。バイオマーカーとは、血清や尿などの体液および組織に含まれる生体由来の物質で、生体内の生物学的変化を定量的に把握するための指標となるものであり、疾病の診断や効率的な治療法の確立が可能となる。近年、質量分析器に代表される解析技術の進歩により、血液などの体液中に分泌される疾患関連タンパク質を網羅的に探索することが可能になってきた。動物モデルを用いて、神経障害性(疼)痛における特異的なバイオマーカーを新たに探索することを本研究の目的とする。末梢性神経障害性(疼)痛の診断及び治療効果判定に用いることができる検査として、基礎から臨床への橋渡しとなる研究としたい。

(2) バイオマーカー探索研究において、プロテオミクスの技術が活用されてきている。最新の液体クロマトグラフィーと超高感度の質量分析器を用いた解析方法により、神経障害性(疼)痛疾患の増悪を感知するバイオマーカーを同定し、臨床応用への基礎を創るところまでを本研究の最終目標とする。

3. 研究の方法

(1) <病態モデル・試料の作製> 一般的な試料としては、血液、尿などが用いられ、人の場合、個人の併存症に加え、加齢や性別、病態等の様々な要因のため、試料の内容に複雑な形容が行われる。しかしながら、実験動物を用いた研究では、既往症がなく、動物の種類、年齢、性別が固定できるため、比較的安定したデータが得られると考えられる。神経障害性痛モデルを作成し、痛覚過敏が表す時期に試料を採取する。コントロールとしてシャム手術のラットから同様の試料を採取する。試料には、髄液を第一に考え、その他に血漿や、尿を検査する。採取、必要な処理をした試料を直ちに遠心分離し、細胞成分を取り除き、ドライアイスで急速冷凍し、-80 度で保管する。

(2) <試料の調整>

二次元電気泳動：装置としては、教室内にある平式冷却電気泳動装置、スラブ電気泳動装置を使用する。

1. 固定化 pH 勾配等電点電気泳動による分離：チューブ状のゲルを用いて等電点電気泳動を行う。

2. DS-PAGE 分子サイズによる分離：泳動後のゲルを用いて SDS 電気泳動を行う。

3. ゲル電気泳動にてタンパク質を分離した後、ゲルを染色液に浸して (CBB 染色、銀染色など) タンパク質を染色する。染色によりゲル内のタンパク質の位置が分るようになる。疾患モデルと、シャム手術の試料による結果の比較から、量の異なる全てのタンパク質を標的タンパク質としてゲルとともに切り出す。

ゲル内消化とペプチド抽出

1. 還元 還元処理液 30 分

2. アルキル化 アルキル化処理液 30 分

3. 脱色 脱色液 A/B 10-15 分 × 数回

4. 乾燥 5 分

5. 消化 トリプシン消化液 8-24 時間

(3) 質量分析 LC/MS/MS (液体クロマトグラフィー質量分析方法)

使用する分析装置 LC/MS/MS は、サーモクエスト社の質量分析計 (LCQ) と LCPackings 社製の高速液体クロマトグラフ (Ultimate)、BAI 社製自動分取装置 PROBOT にて構成されている。

イオン化法の選択：エレクトロスプレー法、イオン化モードの選択

MS 測定条件の最適化：ドリフト電圧、ア

ナライザー電圧、温度、ガス流量等の最適化
LC 測定条件の最適化・カラムの選択、pH、
移動相の最適化

標的タンパク質の同定

MS/MS では、ペプチドイオンをアルゴンガスの衝突エネルギーでフラグメンテーションしたときのスペクトルをデータベースと照合することでタンパク質を同定する。最終なタンパク質同定のために、MS/MS シグナルの b イオンや y イオンの一致度を確認する。サーチの閾値以下であっても、同定すべきタンパク質が存在することもあるので、デノボシーケンシング(データベースに依存しないでシグナルの質量差からアミノ酸配列を推定する方法)も考慮する。

4. 研究成果

(1)神経障害性(疼)痛モデル動物を作成し、機械的痛覚過敏、アロディニアの状態の発生と維持について確認した。術後、隔日でピンプリックテストによる逃避時間や、vonFreyHair を用いた機械刺激閾値を測定し、機械的痛覚過敏、アロディニアの状態を調べる。痛み病態モデル(坐骨神経結紮による CCI モデル)を作成し、行動実験により、安静時における自発痛様行動が増加すること、温熱刺激を与えた時の逃避時間の短縮、フォンフライヘアを用いて機械刺激に対する閾値が低下した。検体サンプルの選択として、ラット・マウスに麻酔後、脊髄、後根神経節(腰椎)の神経系を採取できた。髄液採取は腰椎と頸椎から採取を試みたが、クモ膜下腔に留置したカテーテルに十分量の検体が採取できなかつたり、血液が混入してしまう問題点が認められた。また、痛みのメカニズムが異なるため、病態モデルを選択して実験を進める必要性が考えられた。神経や髄液、血液以外の候補として唾液も有望な検体となる可能性があったが検体量が問題と考えられた。

(2)サンプル採取後の試料の調整と分析条件の最適化は最も困難な段階であり、研究の進行を妨げた。サンプルに不純物が多い、試薬の添加量を再確認しても膜タンパク質が回収できないなどの問題が顕在化した。

(3)ここ数年で、慢性痛の病態は末梢神経障害よりも、中枢神経系の機能的な障害の関与が大きいとの報告が増えつつある。脳情報通信融合研究センター(大阪)は、脳情報科学の研究を進める我が国の代表的研究センターとして、多感覚情報の脳・認知メカニズムを解明する研究を盛んに行っている。2014 年 12 月、脳情報通信融合研究センターにおいて“New Direction in Pain Neuroscience”をテーマとした国際カンファレンスが開催され、慢性痛における脳機能ネットワークの変化、プラセボの脳内メカニズムと鎮痛効果への認知の影響、痛みの認知機序の新たなモデ

ルの提案、痛みの末梢機序として TRP 活性化に関連した Ca²⁺ dependent Cl channel、など多くの有益な報告がされていた。他にも痛みの本質的な部分の研究として、痛み行動に関わる意志決定や、痛みの緩和と報酬系の研究など非常に多彩な報告があった。本研究テーマである痛みのバイオマーカーに関する先端的研究報告も拝聴した。痛みや慢性痛のバイオマーカーとして脳機能画像を用いた研究報告があり、特に痛み関連脳領域の機能的結合障害が原因と考えられるとの報告から、この脳機能画像評価こそ、慢性痛のバイオマーカーとして相応しいのかもしれないと思われた。

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)

(1)浅井明倫、杉浦健之、徐 民恵、平手 博之、藤田義人、祖父江和哉
カルバマゼピン内服治療中に重度低ナトリウム血症をきたした顔面帯状疱疹痛の 1 症例、日本ペインクリニック学会誌、査読有、21 巻、2014、537-538
<http://doi.org/10.11321/jjpspc.14-0012>

(2)Ito S, Sugiura T, Azami T, Sasano H, Sobue K.
Spinal cord stimulation for a woman with complex regional pain syndrome who wished to get pregnant.
J Anesth. 査読有、27 巻、2013、124-7
doi: 10.1007/s00540-012-1462-y

(3)徐 民恵、杉浦健之、浅井明倫、薊隆文、祖父江和哉
体幹の痛みで発症したサルコイドーシスの 1 症例。
ペインクリニック、査読有、34 巻、2013、1302-1304

[学会発表](計 3 件)

(1)杉浦健之
痛みの神経科学が進むべき新方向について～慢性痛治療へのヒントとなるか
東海・北陸ペインクリニック学会第 26 回東海地方会、2015 年 5 月 9 日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

(2)浅井明倫、杉浦健之、草間宣好、森島徹朗、徐 民恵、太田晴子、加藤利奈、吉澤佐也、冨田麻衣子、薊 隆文、祖父江和哉
疼痛性障害に対し集学的治療が有効であった 1 例
東海・北陸ペインクリニック学会第 26 回東海地方会、2015 年 5 月 9 日、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

(3)浅井明倫、薊 隆文、杉浦健之、吉澤佐也、播磨 恵、太田晴子、竹内直子、徐 民恵

癒着性くも膜炎のため脊髄刺激療法用カテーテル型電極が挿入困難でプレート型電極が有効であった 1 症例

日本ペインクリニック学会第 48 回大会、2014 年 7 月 26 日、京王プラザホテル（東京都新宿区）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

杉浦 健之 (SUGIURA TAKESHI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：20295611

(2)研究分担者

祖父江 和哉 (SOBUE KAZUYA)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：90264738

浅井 清文 (ASAI KIYOFUMI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：70212462