

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：33801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24700565

研究課題名(和文) 運動器慢性痛の発症に関与する疼痛関連物質の生後発達因子からの探索

研究課題名(英文) Influence of the difference in muscle regeneration between young and adult rat on development of musculoskeletal chronic pain.

研究代表者

櫻井 博紀 (SAKURAI, Hiroki)

常葉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号：60454419

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：臨床的に線維筋痛症、CRPS Iなどの慢性痛において小児の発症が少ないという報告があり、生後の発達過程における要因が慢性痛発症に関与している可能性がある。そこで我々の開発した運動器障害モデルで若齢期処置を行ったところ、成熟処置と異なり慢性痛が発症しなかった。障害筋の筋組織では処置急性期および慢性期において3週齢処置、9週齢処置で大きな差が見られなかったが、急性期、慢性期においてTNF、myogeninの発現に違いがみられたことから、運動器慢性痛発症に筋における炎症系・分化の関与の可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：Clinically, it is known that the incidence of chronic pain is much lower in children than in adults. The low-incidence may disclose some important factors to develop chronic pain in the adulthood. In this study, we treated to the young rat in the musculoskeletal chronic pain model procedure we have developed. The treatment to adult rats produced long-persisting pain behaviors, on the contrary, the treatment to young rats did not develop chronic pain behaviors. In damaged skeletal muscle, time course of recovery observed almost same between young and adult rat. Though, the expression level of TNF and myogenin were different both acute and chronic period of treatment. These results suggest that muscle developmental factor and immune system in skeletal muscle coordinate the pathogenesis of musculoskeletal chronic pain.

研究分野：疼痛学、リハビリテーション医学

キーワード：慢性痛 運動器 生後発達

## 1. 研究開始当初の背景

運動器障害をはじめとした神経損傷以外  
の原因で発症する慢性痛は病態が複雑なため、  
治療法・リハビリテーションが構築されておらず、  
ADL、QOL の低下を引き起こし、社会的に大きな問題  
となっている。運動器慢性痛の代表疾患である、  
線維筋痛症、CRPS I (Complex Regional Pain Syndrome type  
I ; 複雑局所性疼痛症候群 ) などで、臨床的に小児の  
発症が少ないという報告があり、このような若齢期  
での発症率の低さは生後の発達過程における何らか  
の要因が慢性痛発症に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

運動器慢性痛のメカニズム解明を進めるために、  
独自に開発した運動器慢性痛モデルを用いて、慢性  
痛の発症・維持要因を探る。特に、若齢期において  
慢性痛が発症しにくいことに注目し、若齢処置にお  
ける慢性痛発症の有無を調べるとともに、生後の  
発達過程における何らかの要因が発症に関与して  
いる可能性が考えられることから、慢性痛発症の  
要因を行動学的、組織学的・分子生物学的に検討  
する。

## 3. 研究の方法

### (1) 運動器慢性痛モデルの作成

SD 系雄ラットを用い、片側腓腹筋に lipopolysaccharide (LPS; 2 µg/kg (dissolved in saline), 0.3 ml/kg, SIGMA, E.Coli, 0111: B4) を投与し、その 24 時間後に 6% 高張食塩水 (HS; 0.3 ml/kg) を 90 分間隔で 5 回投与して作成した (LH 処置)。  
成熟処置として 9 週齢、若齢処置として 3 週齢での処置を行った

### (2) 行動学的実験

障害側および対側における、足底部の皮膚痛覚閾値 (VFF: von Frey filaments)、下腿筋圧痛閾値 (push-pull gauge)、下腿周径を処置後 10 週以上にわたって経時的に測定する。また、成熟・若齢処置それぞれの age-matched control 群を作り、処置群と並行して測定した。さらに、3 週齢正常群および 9 週齢正常群を作成し、それぞれの週齢時点での反応性を比較した。

### (3) 組織学的・分子生物学的実験

障害筋である下腿三頭筋の凍結切片を作成し H-E 染色後に光学顕微鏡で検鏡する。処置後の急性期および慢性期を時間軸として、それぞれの時期における筋組織での好中球、単球、リンパ球、中心核線維など損傷像、再生像を観察した。また、摘出筋より mRNA を採取し、Real-Time PCR 法により炎症性サイトカインである TNFα および、筋の分化・成熟に関与する myogenin の定量を行った。PCR には ViiATM7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を使用し、TaqMan Probe 方式で内部標準遺伝子として GAPDH を使用し、比較 Ct 法により、目的遺伝子の発現量を相対定量を行った。

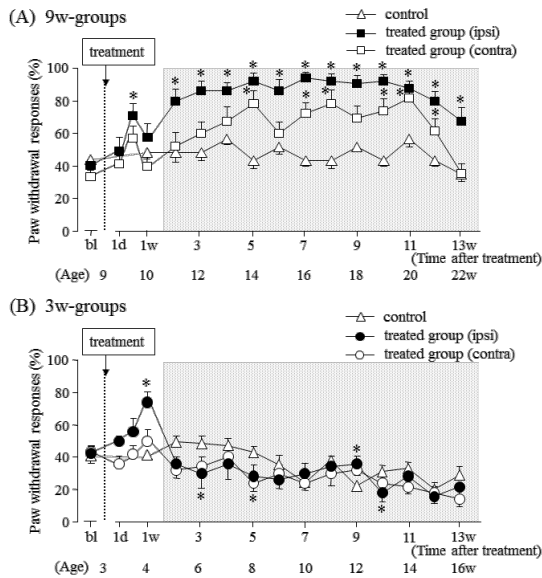
## 4. 研究成果

### (1) 運動器慢性痛モデルでの若齢処置

9 週齢処置群では、傷害部位の圧痛閾値低下および下腿周径増加は処置後 1 週目までには回復を示した。足底 VFF 刺激に対しては処置後 3 日目で一時的な反応の亢進がみられ、その亢進は処置後 1 週目で一旦減弱を示したが、処置後 2 週目から 10 週以上にわたり両側性に亢進が長期持続した (Fig.1 (A))。  
3 週齢処置群では、傷害部位の圧痛閾値低下および下腿周径増加は 9 週齢処置群と同様に

処置後1週目までに回復を示した。足底 VFF 刺激に対しては一時的な反応の亢進が処置後1週目でみられたが、処置後2週目以降では9週齢処置群とは異なり、反応は急速に減弱した。非処置側も反応の亢進はみられなかった ( Fig.1 ( B ))

Fig.1

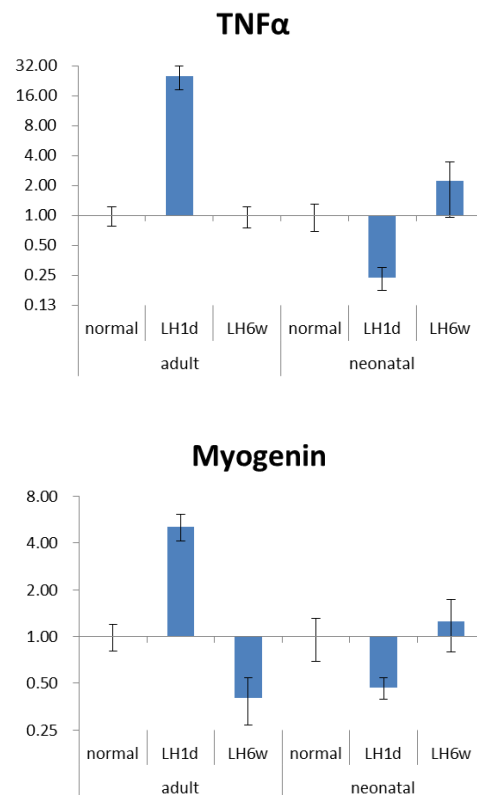


(2) 障害筋における組織・分子生物学的検討

3週齢と9週齢ラットにLH処置( LPS投与24時間後にHS( 高張食塩水 )5回投与 )を行い、急性期であるLH処置後1日目 ( LH1d )、慢性期であるLH処置後6週目 ( LH6w ) に未固定の下腿三頭筋を取り出して凍結切片を作成し、H-E染色後に光学顕微鏡で検鏡した。正常な筋は規則正しく並んだ筋線維と、筋線維間にある少量の細胞間質とで構成されているが、急性期として、LH処置1日目では、HSによる浸透圧ショックによる広範囲な筋細胞の壊死が観察され、壊死した筋細胞への大量のマクロファージの浸潤や小リンパ球の浸潤が観察された。慢性期として、LH処置後6週目では、ほぼ正常な筋組織像に近いが、まだ、中心部に核を持つ再生筋細胞が大小不同で多く残っ

ていた。これらの所見は、3週齢処置群、9週齢処置群のどちらでも見られ、週齢による大きな差は見られなかった。また、Real-Time PCR 法による炎症性サイトカインである TNF $\alpha$ および、筋の分化・成熟に関する myogeninの定量を行った。TNF の発現は、急性期において成熟処置では増加しているのに対し、若齢処置では減少傾向であった。慢性期においては成熟・若齢処置ともに処置前と同等であった。また、筋の分化・成熟に関する myogeninの発現は、急性期においては TNF と同様の傾向を示し、慢性期では処置前より成熟処置では減少、若齢処置ではほぼ同等であった ( Fig.2 )

Fig.2



今回、3週齢処置で9週齢処置と異なり、慢性痛が発症しなかったことは、3週齢で完成していない部分が慢性痛発症に関与しているこ

とが示唆された。筋組織において、処置急性期および慢性期において若齢処置、成熟処置で炎症像・筋回復像には大きな差は見られなかったが、転写因子レベルにおいては、急性期で炎症性サイトカインであるTNF $\alpha$ の mRNA の発現が成熟処置では増加、若齢処置では減少しており、また、骨格筋の分化に関与するといわれている myogenin の mRNA 発現も成熟処置で増加、若齢処置で減少しており、急性期において炎症系および筋分化過程が異なることが示唆された。また、慢性期においては、成熟処置で myogenin の mRNA 発現が減少しており、炎症系や筋分化における差異が運動器慢性痛の発症・維持要因に関連がある可能性が考えられる。

社会的に大きな問題となっている運動器慢性痛において、その動物モデルで臨床と類似して若齢での発症が少ないことが確認できたことは、運動器慢性痛のメカニズム解明への有用性が示唆され、また、運動器として筋での炎症系・分化の違いに着目していくことが、さらなる解明に貢献すると考えられる。今後、中枢での可塑的変容の関与も併せて検索していくことにより、運動器慢性痛のメカニズム解明・治療につながると考えられる。

#### 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 2 件)

(1) Ohmichi M, Ohmichi Y, Ohishi H, Yoshimoto T, Morimoto A, Li Y, Sakurai H et al, Activated spinal astrocytes are involved in the maintenance of chronic widespread mechanical hyperalgesia after cast immobilization. *Molecular Pain* 24;10(1):6, 2014.

DOI:10.1186/1744-8069-10-6

(2) Morimoto A, Winaga Sakurai H et al, Treadmill running and static stretching improve long-lasting hyperalgesia, joint limitation, and muscle atrophy induced by cast immobilization in rats, *Neuroscience Letter*, 査読有, *Neuroscience Letter* 534, 295-300, 2013.

DOI:10.1016/j.neulet.2012.11.009

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 大道裕介, 大道美香, 李玉強, 櫻井博紀 他, ギブス固定後慢性痛モデルの広範囲機械痛覚過敏の発症に関わる阻血再灌流障害とその長期維持に関わる脊髄アストロサイトの活性化. 第 48 回日本理学療法学会. 2013.5.

(2) 森本温子, Winaga Handriadi, 櫻井博紀 他, トレッドミル運動およびスタティックストレッチングはラット後肢ギブス固定後にみられる痛覚過敏、関節可動域制限および筋萎縮を改善した. 第 48 回日本理学療法学会. 2013.5.

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

櫻井 博紀 (SAKURAI Hiroki)

常葉大学・保健医療学部・准教授

研究者番号: 60454419