

令和元年6月7日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K01427

研究課題名(和文) 走運動による神経障害性疼痛の緩和に対するGABA作動性ニューロンの関与

研究課題名(英文) Roles of GABAergic neurons in the spinal dorsal horn in exercise-induced hypoalgesia.

研究代表者

上 勝也 (KAMI, Katsuya)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号：20204612

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、運動による疼痛抑制(exercise-induced hypoalgesia: EIH)機構の解明を目的として実施した。神経障害性疼痛(NPP)モデルマウスを用い、1)トレッドミル走による脊髄後角でのGABAとGADの変化および2)自発運動(VWR)による腹側被蓋野外側部(IVTA)でのドパミン(DA)ニューロン活性化の変化を検討した。その結果、NPPマウスの疼痛行動は走運動により改善され、トレッドミル走はNPPにより抑制されていた脊髄後角でのGABAとGADの産生を高め、さらにVWRはVTAでのDAニューロン活性化とDA産生を促すCREB発現を高めることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性痛は患者のQOLを悪化させるだけでなく、就労の制限や治療費の増大など人生に悪影響を及ぼす。過去30年間にわたる研究成果は、運動による疼痛抑制効果(exercise-induced hypoalgesia: EIH)を証明し、最近では慢性痛に対する介入として運動療法は薬物治療に先立ち勧められるようになった。運動療法の利点は高額な費用を必要とせず、副作用もなく、その実行性が容易なことである。従って痛みの運動療法の基盤をなすEIH効果のメカニズムの解明とそれらに基づき適切な運動療法を確立するための取り組みは、これまでの慢性痛治療を変革する突破口となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：To clarify mechanisms underlying exercise-induced hypoalgesia (EIH), we investigated changes of GABA and GAD in the spinal dorsal horns by treadmill running and changes of activated dopamine neurons in the lateral regions of anterior ventral tegmental area (IVTA) with voluntary wheel running (VWR) using neuropathic pain (NPP) model mice. The present study showed that the levels of GABA and GAD which were inhibited by NPP were increased by treadmill running, and that VWR enhanced both activation of DA neurons and expression of CREB in DA neurons in the IVTA. These results suggest that EIH effects may be produced, at least in part, by activations of GABAergic pain inhibitory system and brain reward system.

研究分野：疼痛学

キーワード：運動による疼痛抑制 神経障害性疼痛 脳報酬系 GABA作動性ニューロン 腹側被蓋野 脊髄後角 免疫組織化学染色

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

運動が疼痛抑制に一定の効果を生み出すこと(Exercise-induced hypoalgesia: EIH)は、多くの報告により明らかにされているものの、EIH 効果を生み出すメカニズムの詳細は十分に解明されているとは言い難い。神経障害性疼痛(NPP)モデル動物の脊髄後角には、 γ -アミノ酪酸(GABA)およびその合成酵素(Glutamic Acid Decarboxylase :GAD)が減少すること、また NPP モデルラットの脊髄へ GABA を合成・放出する細胞を移植すると NPP が軽減される。これらの結果は脊髄後角において GABA の減少に起因する疼痛抑制システムの異常が、NPP の発症と維持に重要な役割を担うとともに、脊髄後角での GABA 産生の維持が EIH の発現に重要な役割を演じる可能性を示唆している。しかし EIH 効果と脊髄後角における GABA や GAD との関連性はこれまでに検討されていない。従って、EIH 効果が生み出されるメカニズムを脊髄後角における GABA と GAD の変化に焦点を当て詳細に検討することは、EIH を生み出すメカニズムの解明に貢献する重要な取り組みとなる。

2. 研究の目的

運動は疼痛を抑制できる介入の一つとして確立されているが、そのメカニズムの詳細は十分に明らかにされていない。本研究の目的は、(1)運動による疼痛抑制には側延髄腹内側部(RVM)と脊髄後角のニューロンにおける GAD と GABA の産生の維持が重要な役割を担うこと、さらに(2)自発運動(VWR)の運動量は、疼痛抑制を生み出すキー・ファクターとして位置づけられることを明らかにすることである。本研究の成果は、神経障害性疼痛や炎症性疼痛を含む慢性痛に対する運動療法の適切性および有効性を証明する科学的根拠および運動療法プログラムを考案するための基盤を提供する。

3. 研究の方法

本研究は「実験1:トレッドミル走による脊髄後角での GABA と GAD の変化」と「実験2:VWRによる脳報酬系の変化」について検討した。

(1)神経障害性疼痛モデルマウスの作製

実験動物には10週齢雄 C57BL/6J マウスを用い、NPP モデルマウスは、Seltzer らの方法に従い坐骨神経部分損傷(PSL)により作製した。本研究は和歌山県立医科大学動物実験委員会の承認(No.642、No.910)を得て行われた。

(2)実験1と実験2における実験群と運動方法

実験1の実験群には、1)Naive 群、2)Sham-Sedentary 群、3)Sham-Runner 群、4)PSL-Sedentary 群、5)PSL-Runner 群を設けた。Naive を除いた4群のマウスは、PSL手術の2週間前からトレッドミルによる順化走を行わせた。順化走の第1週目は7m/minの走速度で10分間の走運動を5日間実施し、第2週目は第1日目の20分間から1日毎に10分間ずつ運動時間を増加させ、最大60分間の走運動を行わせた。PSLおよびSham手術後2日目からRunner群は、7m/minの走速度で60分間の走運動を5日間行った。

実験2の実験群には、1)Naive-Sedentary、2)Naive-Runner、3)Sham-Sedentary、4)Sham-Runner、5)PSL-Sedentary、6)PSL-Runner を設けた。Runner マウスは無線式ランニング・ホイールを設置したケージで、Sedentary マウスは不動化したランニング・ホイールを設置したケージで PSL および Sham 手術の前後15日間飼育した。Runner マウスの走行距離(m/day)は無線を通じてコンピューターに収集したランニング・ホイールの回転数から算出した。

(3)疼痛行動の評価

機械的アロディニアはマウス右足底に von Frey filament 刺激を与えて逃避反応が出現する最小圧力を「up-down 法」にて測定した。熱痛覚過敏は、マウス右足底に熱刺激を与えて逃避反応が出現するまでの時間を測定した。

(4)免疫染色と免疫陽性細胞の定量化

実験 1 で使用した 1 次抗体は、GABA 抗体、GAD65/67 抗体、NeuN 抗体である。実験 2 に用いた 1 次抗体は、NeuN 抗体、リン酸化 cyclic AMP response element-binding protein (pCREB) 抗体、Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体である。

実験 1 と実験 2 とともに下記の手順に従って免疫組織染色を行った。マウスは 4% paraformaldehyde-0.1M PBS を用いて灌流固定した後、脊髄(L4~L5)あるいは腹側被蓋野外側部(IVTA)を含む脳領域を摘出して凍結した。脊髄および脳切片は非特異的反応のブロッキング処理の後、1 次抗体に 4 で 48 時間反応させた。洗浄した後、2 次抗体反応溶液にて 4 で一晩反応させた。蛍光シグナルは、蛍光顕微鏡あるいは共焦点レーザー顕微鏡を用いて検出した。

(5)免疫陽性細胞の定量方法

脊髄後角表層部での GABA 陽性 NeuN 陽性ニューロン数および IVAT における pCREB 陽性細胞数と pCREB 陽性/TH 陽性細胞数の測定は、Clark らの方法を改良して行なった。脊髄後角表層における GABA と GAD65/67 および IVTA における TH の免疫蛍光強度の定量は、Image J 1.48v を用いて実施した。

(6)統計

各データは平均値 ± 標準誤差で示した。逃避反応閾値および潜時の実験群間における比較は、繰り返しのある二元配置分散分析による検定後、Bonferroni 法により行い、免疫陽性細胞数および免疫蛍光強度の実験群間における比較は、一元配置分散分析による検定後、Bonferroni 法により実施した。統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

4. 研究成果

(1)実験 1

走運動による疼痛行動の変化

PSL 手術は、von Frey テストと Plantar テストの逃避反応閾値および潜時を有意に低下させ、PSL-Sedentary における逃避反応閾値および潜時は実験期間を通して低値を維持した。一方、PSL-Runner における von Frey テストの逃避反応閾値は PSL-Sedentary と比較して、PSL 後 5 日目と 6 日目では有意に上昇した。一方、Plantar テストの逃避反応潜時には有意差は認められなかったものの、PSL-Sedentary と比較して延長する傾向を示した。

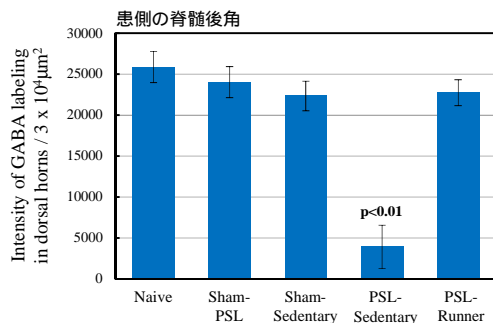


図1 脊髄後角におけるGABA免疫染色強度の変化
脊髄後角におけるGABA免疫染色強度はPSL-Sedentary群では有意な低下を示したが、PSL-Runner群ではそれらの低下が抑制された。

走運動による脊髄後角 GABA の変化

脊髄後角における GABA 発現の変化を検討した (図 1)。PSL-Sedentary の GABA 免疫蛍光強度は、Naive、Sham-Sedentary、Sham-Runner、と比較して有意に減少したが ($p < 0.01$)、走運動はこの減少を抑制した ($p < 0.01$)。後角表層における GABA 陽性ニューロンの変化を検討した。PSL 手術は GABA 陽性ニューロン数を減少させたが、PSL-Runner ではこの減少が抑制された。

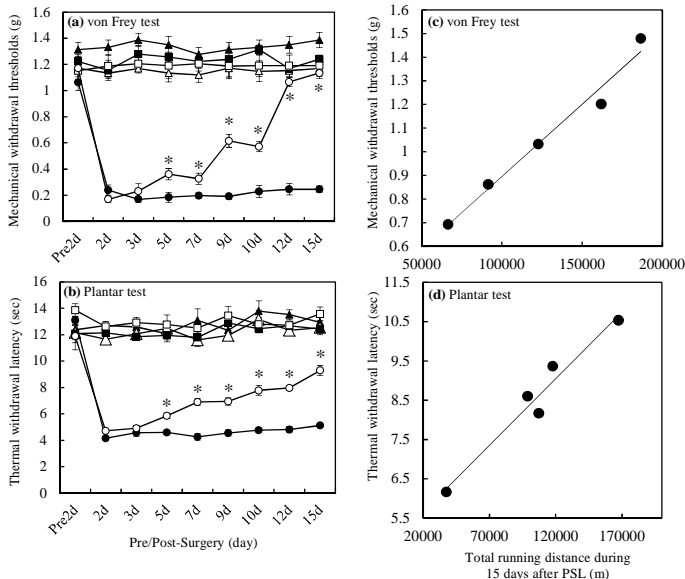


図2 VWRによる疼痛行動の変化とPSL-Runnerマウスの疼痛閾値と総走行距離との関係
 自発運動に伴う疼痛行動の変化は(a) von Freyと(b) Plantarテストにより評価した。○: PSL-Runner, □: PSL-Sedentary, △: Naive-Runnerマウス, ◇: Naive-Sedentary, ●: Sham-Runner, ▲: Sham-Sedentary。有意な正の相関関係はPSL-RunnerマウスにおけるPSL手術後15日間の総走行距離と(c) von Frey閾値 ($R=0.988, p<0.01, n=5$)あるいは(d) Plantar閾値 ($R=0.978, p<0.01, n=5$)との間に見られた。

走運動による脊髄後角 GAD65/67 の変化

各群間における脊髄後角 GAD65/67 の免疫強度を比較すると、PSL-Sedentary は、他と比較して有意に減少したが ($p<0.01$)、走運動はこの減少を抑制した ($p<0.01$)。

(2) 実験 2

VWR による疼痛行動の変化

VWR が疼痛行動に及ぼす影響について検討した (図 2a と 2b)。PSL 手術後 1 日目には、逃避反応閾値と逃避反

応潜時が劇的に低下し、さらに PSL-Sedentary における逃避反応閾値と潜時は実験期間を通して低値を維持した。一方、PSL-Runner における逃避反応閾値と潜時は PSL-Sedentary と比較して、PSL 後 5 日目から 15 日目まで有意に上昇した。PSL 手術後の VWR の走行距離が疼痛行動に及ぼす影響について検討した (図 2c と 2d)。PSL-Runner の PSL 手術後 15 日間の総走行距離と逃避反応閾値 ($R=0.988, p<0.01$) および逃避反応潜時 ($R=0.978, p<0.01$) との間には、それぞれ有意な正の相関関係が認められた。

VWR が TH 産生に及ぼす影響

Naive、Sham、PSL-Runner の TH 免疫染色強度は、ipsi と contra とともにそれぞれの Sedentary 群と比較して有意に増加した。一方、PSL-Sedentary の contra における TH 免疫染色強度は、他と比較して有意に減少した ($p<0.01$)。これらの結果は、PSL 手術は contra の IVTA における TH 産生を低下させるが、その減少は VWR により抑制されることを示している。

VWR が pCREB 陽性/TH 陽性ニューロンに及ぼす影響

Sham-Sedentary および PSL-Sedentary の TH 陽性ニューロンにおける弱い pCREB 免疫反応は、VWR により劇的に増強した。

PSL-Runner における PSL 手術後 15 日目の疼痛行動と pCREB 陽性/TH 陽性ニューロン数との関係を見たところ、PSL-Runner の contra における pCREB 陽性/TH 陽性ニューロン数と、逃避反応閾値 ($R=0.885, p<0.05$) および逃避反応潜時 ($R=0.932, p<0.05$) の間には、それぞれ有意な正の相関関係が認められた。本研究により明らかとなった EIH のメカニズムを図 3 に示す。

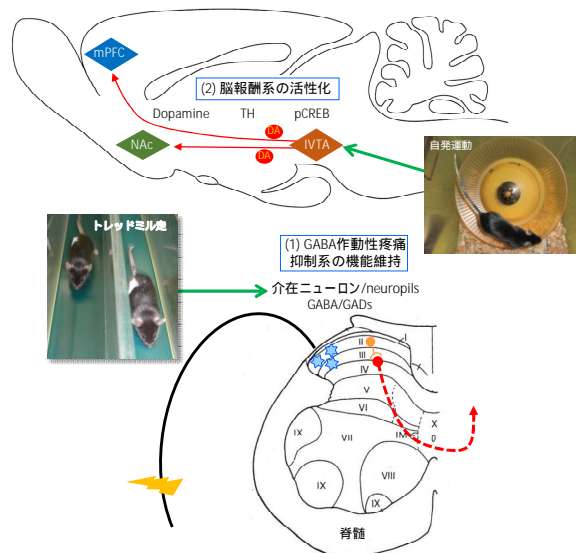


図3 本研究により明らかとなったEIHのメカニズム
 (1)トレッドミル走は脊髄後角表層においてGABAやGADsの減少を防ぐことでGABA作動性疼痛抑制系の機能を維持する。(2) 自発運動はIVTA DAニューロンでのpCREB発現を高めてTHの産生を促し、NAcへのドパミン放出を増やすことで脳報酬系を活性化する。IVTA:腹側被蓋野外側部、NAc:側坐核、mPFC:内側前頭前野、DA:ドパミン。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

1. 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子. 運動による鎮痛(EIH)のメカニズム: 最近の知見. *ペインクリニック* 第 39 巻, p981-989. 2018 年 8 月. (査読なし)
2. Kami K, Tajima F, Senba E. Activation of mesolimbic reward system via laterodorsal tegmental nucleus and hypothalamus in exercise-induced hypoalgesia. *Sci Rep* 8, 11540, DOI:10.1038/s41598-018-29915-4, 2018 年 8 月. (査読有り)
3. 上勝也. 運動するとなぜ痛みが軽くなるのですか?. *Locomotive Pain Frontier* 第 7 巻, p36-39, 2018 年 6 月. (査読なし)
4. 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子. 運動による鎮痛(EIH)のメカニズム: 最近の知見. *ペインクリニック* 第 39 巻 別冊春号, pS42-S50, 2018 年 4 月. (査読なし)
5. 仙波恵美子, 川西誠, 田島文博, 上勝也. 慢性痛に対する運動療法の効果: 脳報酬系の役割. *日本運動器疼痛学会誌* 第 9 巻, p198-209, 2017 年 9 月. (査読有り)
6. 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子. 運動療法の鎮痛メカニズム, *ペインクリニック* 第 38 巻, p571-579, 2017 年 5 月. (査読なし)
7. Senba E, Kami K. A new aspect of chronic pain as a lifestyle-related disease. *Neurobiology of pain* 1, p 6-15, 2017 年 4 月. (査読有り)
8. Kami K, Tajima F, Senba E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. *Anat Sci Int.* 92, p79-90, 2017 年 1 月. (査読有り)
9. 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子. 自発的走運動による腹側被蓋野ドパミン作動性ニューロンでの cyclic AMP-response element-binding protein の活性化は神経障害性疼痛モデルマウスの Exercise-induced hypoalgesia に関与する. *Pain Research* 第 31 巻, p238-251, 2016 年 12 月. (査読有り)
10. Kami K, Taguchi S, Tajima F, Senba E. Histone acetylation in microglia contributes to exercise-induced hypoalgesia in neuropathic pain model mice. *J Pain* 17, p588-599, 2016 年 5 月. (査読有り)
11. Kami K, Taguchi S, Tajima F, Senba E. Improvements in impaired GABA and GAD65/67 production in the spinal dorsal horn contribute to exercise-induced hypoalgesia in a mouse model of neuropathic pain, *Mol. Pain* 112, doi:10.1177, 2016 年 3 月. (査読有り)
12. 上勝也, 田口聖, 田島文博, 仙波恵美子. 神経障害性疼痛モデルマウスの Exercise-induced hypoalgesia に対する強制運動と自発運動の効果とそのメカニズム. *Pain Research* 第 30 巻, p216-229, 2015 年 12 月. (査読有り)

〔学会発表〕(計 14 件)

1. 上勝也, 仙波恵美子「運動による疼痛制御機構 - Exercise-induced hypoalgesia の脳内メカニズム - 」, 第 11 回日本運動器疼痛学会教育研修講演、2018 年 12 月
2. 上勝也, 仙波恵美子「運動による鎮痛 (exercise-induced hypoalgesia) の脳メカニズム: 扁桃体の役割」, 第 11 回日本運動器疼痛学会、2018 年 12 月
3. Kami K, Senba E., Activation of mesolimbic reward pathway via laterodorsal tegmental nucleus and hypothalamus contributes to exercise-induced hypoalgesia in neuropathic pain model mice. 17th IASP World Congress on Pain 2018, 2018年9月
4. 上勝也, 仙波恵美子「Exercise-induced hypoalgesia を生み出す神経メカニズムの解明」,

第 40 回日本疼痛学会, 2018 年 6 月

5. 仙波恵美子, 上勝也「運動誘発性鎮痛(Exercise-Induced Hypoalgesia)の脳メカニズム」, 第 40 回日本疼痛学会シンポジウム, 2018 年 6 月
6. 仙波恵美子, 上勝也「慢性痛に対し運動療法が奏効する脳メカニズムの解析: 脳報酬系の関与について」, 第 123 回 日本解剖学会, 2018 年 3 月.
7. 上勝也, 仙波恵美子「オレキシンニューロンはExercise-induced hypoalgesiaに関与する」, 第 10 回日本運動器疼痛学会, 2017 年 11 月
8. 上勝也, 仙波恵美子「自発運動がexercise-induced hypoalgesiaを生み出す神経経路の解明」, 第39回日本疼痛学会, 2017年6月.
9. 上勝也, 仙波恵美子「脚橋被蓋核/背外側被蓋核コリン作動性ニューロンを腹側被蓋野ドパミン作動性ニューロンの活性化は神経障害性疼痛モデルマウスの exercise-induced hypoalgesia に関与する」, 第 9 回日本運動器疼痛学会, 2016 年 11 月.
10. 仙波恵美子, 上勝也「慢性痛に対する運動療法の効果と脳報酬系」, 第 9 回日本運動器疼痛学会シンポジウム, 2016 年 11 月.
11. Kami K, Taguchi S, Senba E. 「Activation of mesolimbic reward pathway by voluntary exercise contributes to exercise-induced hypoalgesia in neuropathic pain model mice」, 第 16 回世界疼痛学会(IASP2016), 2016 年 9 月.
12. 仙波恵美子, 上勝也, 成田年「陽性情動と痛み - 脳報酬系の役割」, 第 8 回日本運動器疼痛学会シンポジウム, 2015 年 12 月.
13. 上勝也, 田口聖, 仙波恵美子 「神経障害性疼痛モデルマウスの自発的走運動は Exercise-induced hypoalgesia を生み出す」, 第 8 回日本運動器疼痛学会, 2015 年 12 月.
14. 上勝也, 田口聖, 仙波恵美子「神経障害性疼痛モデルマウスに対する自発的走運動の影響」, 第 38 回日本疼痛学会, 2015 年 7 月.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 仙波恵美子

ローマ字氏名: SENBA Emiko

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 名誉教授

研究者番号(8桁): 00135691

研究分担者氏名: 田島文博

ローマ字氏名: TAJIMA Fumihito

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00227076

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。