

平成 30 年 5 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15801

研究課題名(和文)ミトコンドリア機能障害の観点からみた慢性筋痛の病態解析

研究課題名(英文)Chronic muscle pain pathophysiology from the viewpoint of mitochondria dysfunction

研究代表者

前川 賢治 (MAEKAWA, KENJI)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20304313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：抗高脂血症剤服用によるミトコンドリアの機能障害が筋痛発症に関与している可能性が多数報告され、服用者の中でも、血中のビタミンDが欠乏した個体で筋痛の発症が有意に高いことが知られることから、ビタミンD機能と筋痛の関係の解明を試みた。

その結果、マウスを対象とした筋組織内でのビタミンD受容体の遺伝子発現量は、筋痛を発症しやすい僧帽筋や咬筋において四肢筋よりも有意に高く、ビタミンD機能が筋痛と関連している可能性が示された。また、ラットの咬筋に侵害刺激を付加した際の中枢神経系の疼痛感受性マーカー(c-fos)の発現陽性細胞数は、ビタミンD欠乏状態で増加傾向にあり、疼痛感受性が亢進する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：We made an attempt to elucidate the relationship between vitamin D function and muscle pain. This hypothesis was established based on the several previous reports, which describe the positive relationship between taking antilipemic and muscle pain onset, especially seen in hyperlipidemia patients with vitamin D deficiency.

As the results, gene expression levels of vitamin D receptor was significantly higher in trapezius and masseter muscles, which are easily affected by muscle pain than limb muscles, which are not very sensitive to muscle pain. These results suggest the possible relationship between vitamin D function and muscle pain. In addition, expression levels of positive cell number of pain sensitivity marker (c-fos) in central nervous system under noxious stimulus application in masseter muscle tended to be higher in vitamin D deficiency rats than those in rats without vitamin D deficiency.

研究分野：医歯薬学

キーワード：慢性筋痛 疾患感受性 ビタミンD

1. 研究開始当初の背景

頭頸部の筋痛や緊張型頭痛をはじめとする慢性筋痛疾患は、生涯有症率が70%以上と非常に高く、中高年齢層の生活の質に大きな影響を与える。しかし、本疾患の病態メカニズムが未解明なために根本的な治療法は確立されておらず、残念ながら非特異的な治療法に膨大な医療費が浪費され続けている。この慢性筋痛の病態について、これまで我々は、筋組織内の血管拡張能の低下やエネルギー代謝の異常が関与している可能性を見出してきたが、これらの現象を惹起する機序について詳細な知見は未だ得られていない。そのような中、最近、高脂血症治療薬であるスタチン服用による副作用として、骨格筋の痛みが濃度依存的に生じ、その発症頻度は重篤な副作用としてよく知られる横紋筋融解症(0.1%)を遥かに凌ぐ高さ(5.1~18.2%: PRIMO Study, Cardiovasc Drugs Ther, 2005)であることが知られるようになった。一方で、スタチン系の薬剤に関しては、①服用によりミトコンドリア内でのATP産生に不可欠であるコエンザイムQ10(CoQ10)の産生が妨げられ、組織代謝に変化が生じること、②CoQ10不足によるミトコンドリア機能障害が、活性酸素種の形成促進による体内での酸化ストレスの増加を招くこと、これにより③強力な血管拡張因子である内皮型一酸化窒素合成酵素の活性化を阻害することで、末梢組織での血流障害を生じることが明らかにされている。「スタチン系薬剤の服用で筋痛を発症する個体が存在すること」と「スタチン服用により生じるミトコンドリアの機能障害は、組織代謝と血流動態に障害をもたらす」という二つの所見は、ミトコンドリア機能障害が、慢性筋痛患者の筋組織内で生じている血流・代謝異常を説明するうえで有力な機序となる可能性を示唆している。従って、この筋痛モデルを基盤とした研究を展開することで、慢性筋痛の病態メカニズムの解明を進展させられるのではないかと考えられる。

2. 研究の目的

背景に示すように、「スタチン系薬剤の服用で筋痛を発症する個体が存在すること」と

「スタチン服用により生じるミトコンドリアの機能障害は、組織代謝と血流動態に障害をもたらす」という二つの所見は、ミトコンドリア機能障害が、慢性筋痛患者の筋組織内で生じている血流・代謝異常を説明するうえで有力な機序となる可能性を示唆している。従って、この筋痛モデルを基盤とした研究を展開することで、慢性筋痛の病態メカニズムの解明を進展させられるのではないかと考えられる。しかしながら、最近になってスタチン服用者の中でも、血中のビタミンDが欠乏した筋痛の発症が有意に高いことが明らかとされた疫学研究が幾つか報告された。また、ビタミンD欠乏状態では、骨格筋の疼痛感受性が高まることが動物実験で明らかとされたことから、慢性筋痛の病態解明にあたっては、ミトコンドリア機能を評価するよりもビタミンD欠乏との関連を評価する方がより直接的ではないかと考え、研究を開始することとした。

3. 研究の方法

1) 筋組織内のビタミンD受容体の発現状態の評価

8週齢のC57BL/6マウス(3匹)をジエチルエーテルの吸入により安楽死させ、咬筋、僧帽筋、ヒラメ筋組織を回収し、以下の検討を行った。

回収したそれぞれの筋を用いて凍結切片を作製し、ビタミンD受容体の抗体を用い免疫組織染色を実施した。

回収したそれぞれの筋からDNAを抽出し、定量性RT-PCR法にてビタミンD受容体の発現量を筋組織間で比較した。

2) 筋組織内のビタミンD受容体発現状態の変化の検討

8週齢のC57BL/6マウスに対してビタミンDを含有した食餌と含有しない食餌を継続して摂取させ、咬筋ならびに僧帽筋組織内のビタミンD受容体の発現量を比較した。実際には、ビタミンD含有食(Vitamin D+, Ca 0.3%, P0.3%)を2週間継続して摂取したマウス(4匹)とビタミンD欠乏食(Vitamin D-, Ca 0.3%, P0.3%)を摂取したマウス(4匹)を安楽死させ、咬筋組織と僧帽筋組織を回収

した。回収した筋組織から DNA を抽出し、定量性 RT-PCR 法にてビタミン D 受容体の発現量を求め、2 群間でその発現量を比較した。

発現量の比較は、筋種ごとに分けて行った。

3) ビタミン D 欠乏状態ラットにおける咬筋組織内の疼痛感受性変化の検討

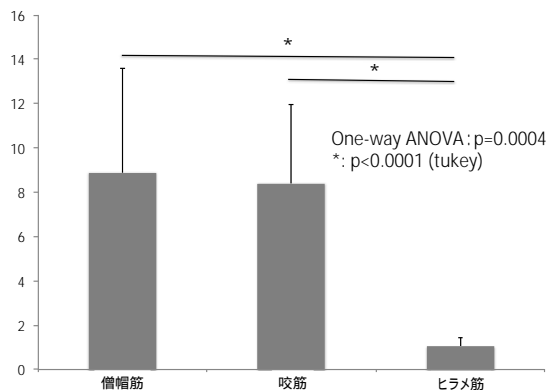
ビタミン D を含有した食餌と含有しない食餌を継続して摂取したラットを対象にして、咬筋組織内に侵害刺激を付加した際の中枢神経系における疼痛感受性マーカーの発現量を群間で比較した。実際には、ビタミン D 含有食 (Vitamin D+, Ca 0.3%, PO.3%) を 4 週間継続して摂取した SD ラット (8 匹) とビタミン D 欠乏食 (Vitamin D-, Ca 0.3%, PO.3%) を摂取した SD ラット (8 匹) の右側咬筋組織内にアジュバント (0.1ml) を注射し、2 時間後に灌流固定を行い、中枢神経組織を摘出した。摘出した中枢神経組織から凍結切片を作製し、咬筋支配領域における疼痛感受性マーカーである c-fos の発現陽性細胞数を免疫組織学的に評価し、群間比較した。

4. 研究成果

1) 筋組織内のビタミン D 受容体の発現状態の評価

今回対象としたマウスの咬筋、僧帽筋、ヒラメ筋全ての筋組織内においてビタミン D 受容体が発現していることを組織学的に確認した。また、本受容体の遺伝子発現量を比較した定量性 RT-PCR の結果では、筋痛の発現しやすい咬筋、僧帽筋では、ヒラメ筋に比較してビタミン D 受容体の発現量が有意に多く、ビタミン D の機能が筋痛発現と関連している可能性が示された。

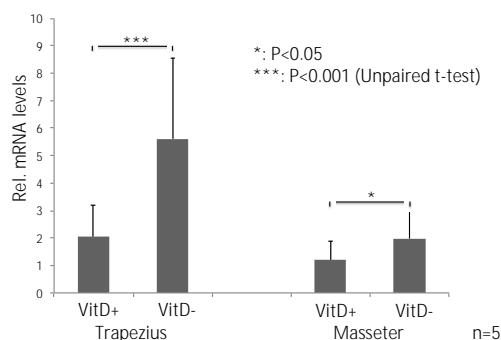
マウス各筋組織内でのビタミン D 受容体遺伝子発現量



2) 筋組織内のビタミン D 受容体発現状態の変化の検討

筋組織内から抽出した DNA を対象とした定量性 RT-PCR の結果、ビタミン D 欠乏食を継続摂取したマウスの筋組織内においてはビタミン D 受容体遺伝子の発現量が有意に増加していた。すなわち、ビタミン D の欠乏状態においては、対象とした筋組織内のビタミン D 受容体の発現がアップレギュレートされることが明らかとなった。

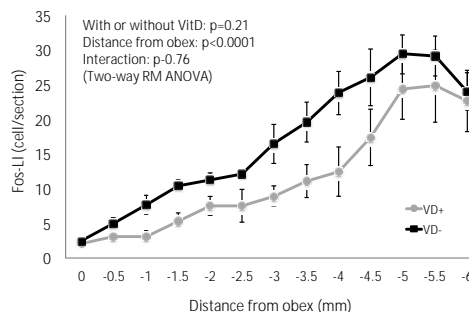
ビタミン D 受容体含有、欠乏食食餌経過 2 週後の筋組織内ビタミン D 受容体遺伝子発現変化



3) ビタミン D 欠乏状態ラットにおける咬筋組織内の疼痛感受性変化の検討

ビタミン D 欠乏食を継続して摂取したラット群においては、中枢組織組織における c-fos 発現陽性細胞数が多い傾向にあった (有意差は認めなかった)。このことから、ビタミン D 欠乏状態が継続したラット個体においては咬筋組織内の疼痛感受性が高まる可能性が示されたと考え、今後の更なる検討が必要と思われた。

ラット咬筋組織内にアジュバント注入 2 時間後の中枢内での c-fos 発現陽性細胞数 (n=8)



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0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

前川賢治 (MAEKAWA KENJI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20304313

(2)研究分担者

大野充昭 (ONO MITSUAKI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60613156

水口 一 (MINAKUCHI HAJIME)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：30325097

窪木 拓男 (KUBOKI TAKUO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：00225195