

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：33910

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390154

研究課題名(和文)筋性疼痛における各種神経栄養因子の関与と筋における産生・作用機構

研究課題名(英文) Involvement of neurotrophic factors in muscular pain and mechanisms for their production and action in the muscle

研究代表者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)

中部大学・生命健康科学部・教授

研究者番号：00109349

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：筋に痛みを持つ人は多いが、その神経メカニズムは良くわかっていない。そこで運動後に遅れて現れる遅発性筋痛をモデルとして、神経成長因子やグリア細胞由来神経栄養因子が筋に痛みを起こす上でどんな役割を担っているかについて調べた。これらの因子は運動後に、運動した筋の筋細胞または筋衛星細胞で産生され、筋の痛み受容体の圧迫刺激に対する反応を強めることを明らかにした。両栄養因子は協同して、筋の圧迫に対してより敏感に痛みを感じるようにする(筋機械痛覚過敏)ことも明らかにした。本研究から、筋細胞・筋衛星細胞自身が痛みを強める物質を作っていることが明らかになり、筋の痛み発生における筋の重要性を示した。

研究成果の概要(英文)：This study was planned to clarify involvement of neurotrophic factors in muscular pain models, their action mechanisms on muscular nociceptors, and factors that were involved in production of neurotrophic factors. Delayed onset muscle soreness (DOMS) induced after lengthening contraction (LC) was used for a model of muscle pain. We showed that EP2 receptor was involved in the COX-2-GDNF (glial cell derived neurotrophic factor) pathway leading to DOMS, and that upregulation of NGF and GDNF was induced in the muscle cells/satellite cells after LC. We also showed effects of NGF and GDNF on mechanically activated currents in cultured dorsal root ganglion neurons, sensitizing effect of GDNF on muscular A-delta mechanosensitive nociceptors, and collaboration of NGF and GDNF in inducing muscular mechanical hyperalgesia.

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：筋性疼痛 機械痛覚過敏 神経成長因子 筋細径線維受容体 グリア細胞由来神経栄養因子 遅発性筋痛 ATP EP2受容体

1. 研究開始当初の背景

筋骨格系の痛みは加齢とともに増加し、これにより日本人口の約9% (約910万人)が日常生活に支障をきたしていると推定されている (Mod.Rheumatol.15:41-,2005)。従って、筋・骨格系の痛みのメカニズムを明らかにすることは、その対策を立てる上で重要である。筋性疼痛の多くは非炎症性であるにも関わらず、研究の多くは炎症モデルか、炎症メディエーターの投与による筋性疼痛をモデルとして進められてきた (Clin.J.Pain 17;2-,2001)。そこで、申請者らは非炎症モデルとして、運動後に生じる遅発性筋痛に着目した。

遅発性筋痛は治療なしでも1週間以内に自然に回復するが、①これを引き起こす伸張性収縮を連日負荷すると持続性の筋性疼痛が生じること (J.Pain 12:1059,2011)、また、②多くの患者が苦しんでいる筋・筋膜性疼痛症候群の特徴的徴候 (筋硬結、Trigger point) と同様な所見が見られる (Acupunct.Med. 22:2-,2004) ことから、臨床的に問題となる筋性疼痛のメカニズムを探る上で良いモデルとなると考えられている。最近、水村らは運動中に生じるブラジキニンが遅発性筋痛を生じる過程をトリガーし、筋における NGF の産生を増大させ、これが筋痛み受容体の圧感受性を高め、痛覚過敏を引き起こしていること (Murase et al, 2010) を明らかにした。本研究開始時には、運動中に活性化される COX-2 が筋における GDNF の産生を高め、筋圧痛覚過敏を生じていることを明らかにしつつあった。つまり、遅発性筋痛発生のメカニズムにはブラジキニン-NGF系と COX-2-GDNF系の2つあることを明らかにしつつあった。

2. 研究の目的

筋性疼痛モデルにおいて各種神経栄養因子がどのように関与しているか明らかにし、その筋性疼痛における役割の重要性を明らかにする。次にこれら神経栄養因子の痛み受容器に対する作用機構を明らかにし、さらには筋におけるこれら因子の産生に関わる因子を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス、ラットにおける筋機械逃避反応閾値の測定

プローブの先端直径を 2.6 mm と大きくし

た Randall-Selitto 装置を用いた (Nasu et al., Eur. J. Pain, 2010)。加圧速度はマウスでは 78 mN/sec、ラットではその倍の 156 mN/sec とした。

(2) 伸張性収縮負荷方法

ラットでは長指伸筋に対し、マウスでは腓腹筋外側頭に対し伸張性収縮を負荷した。方法は Taguchi et al, 2005 の方法によった。

(3) 取り出しラット長指伸筋一総腓骨神経標本からの単一神経記録

Taguchi ら (J.Physiol.2005) の方法によって実施した。

(4) 幼弱マウス培養後根神経節細胞からの機械感受性電流のパッチクランプ記録

生後3週間前後の幼弱マウスから後根神経節細胞を取り出し培養し、翌日実験に用いた。培養液へ NGF(100 ng/ml) もしくは GDNF(10 ng/ml) を30分間添加し、ホールセルパッチクランプ法を用いて①機械刺激に反応する細胞の割合、②反応電流の種類、③機械感受性電流の増強の有無、に変化があるか調べた。機械刺激は、先端を加熱して丸くしたガラス微小電極を、ピエゾ式マイクロマニピュレータにより動かして細胞に当てて行った。また、機械刺激に反応しない細胞に NGF(100 ng/ml) を添加し、機械刺激に反応するように変化するか調べた。

(5) 筋の NGF、GDNF、COX-2 mRNA の in situ hybridization

伸張性収縮 (LC) 負荷方法は Taguchi ら (J.Physiol.2005) の方法によった。LC 直後および12時間後にペントバルビタール麻酔下にて長指伸筋を採取し、瞬間凍結した。厚さ 16 μm の縦断切片を作成し、 ^{35}S 標識 cRNA プローブを用いて *in situ hybridization* を行った。オートラジオグラフィーの露光は COX-2 で11日間、GDNF で25日間、NGF で45日間行った。

(6) pERK 等の免疫組織化学

雄性 SD ラットの右後肢にイソフルラン麻酔下で PBS、NGF(0.1 μM)、GDNF(0.008 μM)、もしくは NGF と GDNF の混合液 20 μl を筋肉内投与し、翌日筋を 1500 mN の強さで圧迫刺激したのち速やかに還流固定した。L4~6 の後根神経節を取り出し、pERK、NF200、TRPV1 の免疫染色を行った。

(7) リアルタイム RT-PCR, ELISA

筋からの全 RNA は RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用いて抽出した。全 RNA 1µg から M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, USA)を用いて逆転写を行い、定量リアルタイム RT-PCR は Power SYBR® Green PCR Kit (Life Technologies, Carlsbad, USA) を用い Rotor-Gene™ Q (Qiagen)上で行った。NGF の ELISA は NGF Emax ImmunoAssay System (Promega) を用いて実施した。

実験はすべて中部大学大学動物実験委員会の承認を受けて実施した。また、ノックアウトマウス実験については中部大学の組み換え DNA 実験安全委員会の承認を受けて行った。

EP1,3,4 拮抗薬は小野薬品工業から提供していただいた。EP2 ノックアウトマウスは京都大学 成宮周教授より提供していただいた。

4. 研究成果

(1) COX-2-GDNF 経路における EP2 受容体の関与

COX-2 により産生増大されたプロスタグランジン(PG)E2がどの受容体を介してGDNF産生増大を導くのか、EP 受容体拮抗薬と、EP2 受容体ノックアウトマウスを用いて調べた。EP1 受容体拮抗薬 ONO-8713 (LC 負荷 1 時間前と 5 時間後の 2 回、30 mg/kg を経口投与)、EP3 受容体拮抗薬 ONO-AE5-599 (30 mg/kg を LC 負荷 1 時間前と 9 時間後の 2 回 皮下投与)、EP4 受容体拮抗薬 ONO-AE3-208(10 mg/kg を LC 負荷 1 時間前に 1 回経口投与)のいずれも、遅発性筋痛の発現を抑制することができなかった。用いた用量は文献等から十分量であると考えられるので、本結果から EP1,3,4 は遅発性筋痛の発現には関与していないと考えられる。

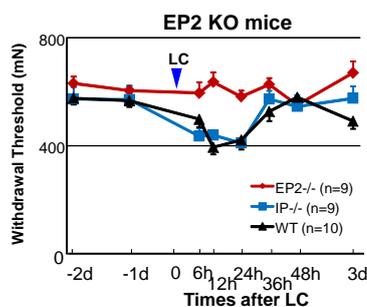


図 1. EP2, IP ノックアウトマウスにおける遅発性筋痛

EP2 受容体の関与については、EP2 受容体ノックアウトマウス (EP2-/-)を用いて調べた。図 1 に見られるように、EP2-/-では遅発性筋痛の発現が見られなかった。以上の結果から、EP2 受容体の関与が明らかにされた。

EP2-/-ではその上流の COX-2 やもうひとつの経路で作られる NGF は野生型同様に LC 後に増えると予想されるので、Q-PCR により発現変化を調べた。野生型マウスでは LC 負荷後 3 時間に COX-2、GDNF、NGF は最も顕著に増大していたので、LC 負荷後 3 時間の時点の変化を調べた。予想に反して COX-2、GDNF、NGF のいずれも増加が観察されなかった。EP2 の活性化は更なる COX-2 の活性化による PGE2 産生の増大を引き起こすというポジティブフィードバックを起こすことが報告されている。EP2-/-ではこのメカニズムによる COX-2 の発現増大が起こらず、その結果 GDNF mRNA の増大が起こらなかったのかもしれない。

(2) NGF による筋機械痛覚過敏のメカニズム

記録したニューロンの直径は平均 28 µm (19.3–34.9 µm, n=160) であった。NGF 添加群 60 個、GDNF 添加群 32 個、コントロール群 (添加なし) 68 個の細胞から記録した。生じた機械感受性電流には図 2A に示すように‘速順応型’ (RA, 時定数 < 3 ms)、‘遅順応型’ (SA, 時定数 > 30 ms) と、時定数がそれらの中間の‘中間型’ (IA) の 3 種類が見られた(図 2A)。7 µm の強さで 2 か所刺激しても応答しなかったものを mech-とした。NGF 投与群では、コントロール群と比較して機械応答ニューロンの割合の増加が認められた。またコントロール群では RA、IA、SA が同程度認められたのに対し、NGF 群では SA の割合が増加し (SA vs. SA 以外, χ^2 検定, $p=0.024$)、GDNF 群では RA の割合が増加していた (RA vs. RA 以外, χ^2 検定, $p=0.016$) (図 2B)。

7 µm 刺激したときの応答電流の大きさを比較したところ、すべての群において RA タイプの電流が IA, SA に比べて大きかったが、コントロール群、NGF 添加群、GDNF 添加群の間で有意な差は認められなかった (図 2C)。このことから、NGF は SA に関連したチャネルに対して、GDNF は RA に関連したチャネルに対して働くことが予想された。

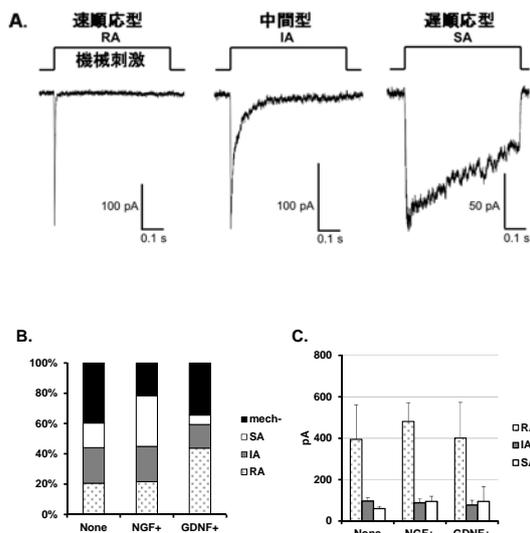


図 2. 培養後根神経節細胞の機械感受性電流の NGF、GDNF の添加による変化

機械刺激に応答しない 16 個の細胞から記録をとった。細胞の直径は 21.8~31.4 μm で、平均は 27.5 μm であった。うち 11 個には NGF 100 $\mu\text{g/ml}$ 、5 個には NGF 100 $\mu\text{g/ml}$ + PMA30 nM を投与した。3 分~30 分まで繰り返し機械刺激を行ったが、機械応答を示すようになった細胞は記録できなかった。

(3) GDNF による A δ 侵害受容器の感作

60 本の C 線維と 28 本の A δ 線維を持つ機械感受性線維を記録し、それぞれ半数を対照群とし (PBS 群)、残りの半数に GDNF (0.03 μM , 5 μl) を投与した (GDNF 群)。C 線維受容器は、観察した 2 時間の間ほとんど閾値の変化はなく、反応の大きさにも有意な変化はなかった。一方、A δ 線維受容器は、PBS 群と比較して 30-60 分後から有意な差が見られた (図 3)。GDNF による筋機械痛覚過敏は、NGF によるものとは異なり TRPV1 阻害薬である capsazepine では減弱されず、ASIC チャネルの阻害薬である amiloride 筋注により減弱されることから、ASIC チャネルが関与していることが示唆される。ところで、以前の Fujii らの論文 (2008) によれば、ASIC を発現している後根神経節細胞は TRPV1 を発現している細胞よりやや大きい。このことは、GDNF で感作される筋細径線維受容器は A δ 線維であるという本研究結果とよく合致する。

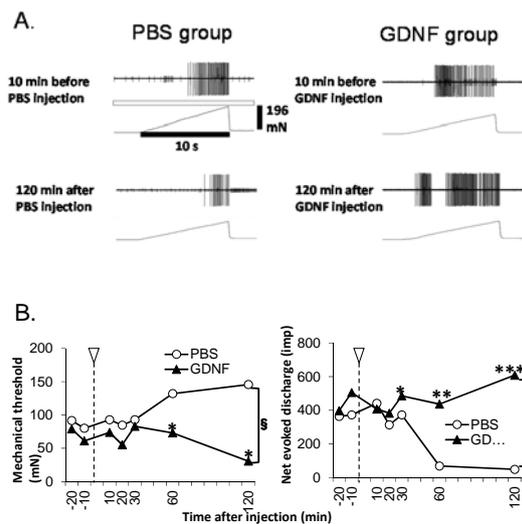


図 3. 筋 A- δ 線維受容器の機械反応に及ぼす GDNF の影響 (雑誌論文 1 より)

(4) 筋における NGF、GDNF 産生細胞と COX-2 発現細胞

筋微小血管の血管平滑筋において NGF mRNA の定常的な発現が観察された。運動側の筋では筋細胞もしくは筋衛星細胞の核付近においてシグナルの増強が認められた (図 4A)。GDNF mRNA のシグナルは非運動側ではほとんど認められず、運動側において筋細胞もしくは筋衛星細胞の核付近にシグナルの増強が認められた (図 4B)。COX-2 mRNA は腱付近および筋組織全体で広範囲に定常的な発現が認められた。一方運動側では筋細胞もしくは筋衛星細胞の核付近、筋膜、筋微小血管の平滑筋においてシグナルの増強が認められた。

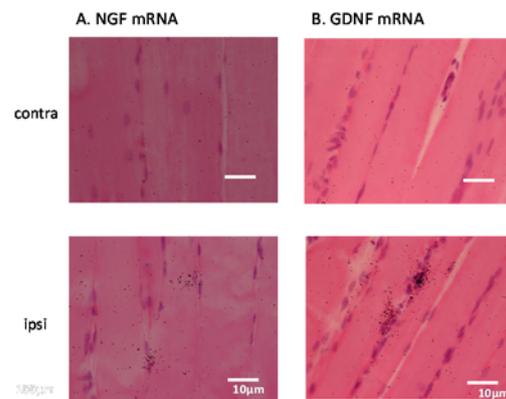


図 4. 筋における NGF mRNA と GDNF mRNA の発現増大 (in situ hybridization) (B 下は雑誌論文 5 より)

(5) NGF と GDNF の協同作用とそのメカニズムの解析

行動実験においては、単独では痛覚過敏を引き起こさない量の NGF と GDNF を混合投与することによって著しい筋痛覚過敏が発現した。これを細胞レベルで確認するため、筋圧迫に応答する pERK 活性化細胞の数および細胞の性状を二重染色によって観察した。L4~6 の後根神経節細胞すべてで、混合投与群において pERK 陽性細胞の数が増加した。また、その細胞の直径は 10~35 μm の小型~中型神経細胞に集中しており、侵害受容に関わる細胞であると考えられた。pERK 陽性細胞のうち 3~4 割が NF200 陽性細胞であったが、各群で差はなかった。TRPV1 陽性細胞の割合は混合投与群で高い傾向にあったが、有意差は認められなかった。この結果は、NGF と GDNF の相互作用が、末梢のレベルで生じていることを示唆する。

(6) まとめ

伸張性収縮で生じる遅発性筋痛をモデルとして、NGF と GDNF の作用について調べた。作用機構等にまだ未解明な点は残されているが、筋細胞/筋衛星細胞が産生する NGF、GDNF の筋性疼痛における重要性を明らかにすることができた。

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 12 件)

- ① Murase S, Kato K, Taguchi T, and Mizumura K. Glial cell line-derived neurotrophic factor sensitized the mechanical response of muscular thin-fiber afferents in rats. *Eur.J.Pain*18: 629-638, 2014. 査読有
- ② Taguchi T, Yasui M, Kubo A, Abe M, Kiyama H, Yamanaka A, and Mizumura K. Nociception originating from the crural fascia in rats. *Pain* 154: 1103-1114, 2013. 査読有
- ③ Urai H, Murase S, Mizumura K. Decreased NGF upregulation is a mechanism for reduced mechanical hyperalgesia after the second bout of exercise in rats. *Scan. J. Med. Sci. Sports*. doi: 10.1111/sms.12013, 2013. 査読有
- ④ Ota H, Katanosaka K, Murase S, Kashio M, Tominaga M, and Mizumura K. TRPV1 and TRPV4 play pivotal roles in delayed onset muscle soreness. *PLoS.ONE*.8:e65751, 2013

- ⑤ Murase S, Terazawa E, Hirate K, Yamanaka H, Kanda H, Noguchi K, Ota H, Queme F, Taguchi T, and Mizumura K. Upregulated glial cell line-derived neurotrophic factor through cyclo-oxygenase-2 activation in the muscle is required for mechanical hyperalgesia after exercise in rats. *J.Physiol*. 591: 3035-3048, 2013. 査読有
- ⑥ Hayashi K, Shiozawa S, Ozaki N, Mizumura K, and Graven-Nielsen T. Repeated intramuscular injections of nerve growth factor induced progressive muscle hyperalgesia, facilitated temporal summation and expanded pain areas. *Pain* 154: 2344-2352, 2013. 査読有
- ⑦ Queme F, Taguchi T, Mizumura K, and Graven-Nielsen T. Muscular heat and mechanical pain sensitivity after lengthening contraction in humans and animals. *J.Pain* 14: 1425-1436, 2013. 査読有
- ⑧ Kubo A, Koyama M, Tamura R, Takagishi T, Murase S, and Mizumura K. Absence of mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness) in neonatally capsaicin-treated rats. *Neurosci.Res*.73:56-60, 2012. 査読有
- ⑨ Hayashi Y, Ozaki N, Kawakita K, Itoh K, Mizumura K, Furukawa K, Yasui M, Hori K, Yi S-Q, Yamaguchi T, and Sugiura Y. Involvement of NGF in the rat model of persistent muscle pain associated with taut band. *J.Pain* 12:1059-1068, 2011. 査読有

[学会発表] (計 35 件)

- ① Ota H, Katanosaka K, Murase S, Kashio M, Tominaga M, Mizumura K. Contribution of TRPV1 and TRPV4 in Delayed Onset Muscle Soreness. 5th Asian Pain Symposium、岡崎カンファレンスセンター (岡崎)、2013 年 12 月 18-20 日)
- ② Murase S, Taguchi T, Queme F, Mizumura K. A synergetic effect of nerve growth factor (NGF) and glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) in inducing muscular mechanical hyperalgesia in rats. 5th Asian Pain Symposium、2013 年 12 月 18-20 日、岡崎カンファレンスセンター(岡崎)。
- ③ 太田大樹、片野坂公明、村瀬詩織、加塩麻紀子、富永真琴、水村和枝。遅発性筋痛における TRP チャネル V1、V4 の役割。第 6 回日本運動器疼痛学会、2013 年 12 月 8 日、神戸国際会議場(神戸)
- ④ 村瀬詩織、山中博樹、神田浩里、水村和枝。骨格筋細胞は持続する筋機械痛覚過敏を引き起こす神経成長因子(NGF)およびグリ

- ア細胞由来神経栄養因子(GDNF)を産生する。第6回日本運動器疼痛学会、2013年12月8日、神戸国際会議場(神戸)
- ⑤ 村瀬詩織, 水村和枝 筋機械痛覚過敏を引き起こす神経成長因子(NGF)とグリア細胞由来神経栄養因子(GDNF)の相乗効果 第60回中部日本生理学会、2013年10月25日、岐阜大学医学部記念会館ホール(岐阜)。
- ⑥ Quemé F, Mizumura K. Muscular Nociceptor Heat Sensitivity in Rats After Lengthening Contraction and NGF. 第90回日本生理学会大会、2013年3月29日、タワーホール船堀(東京)
- ⑦ 水村和枝 遅発性筋痛におけるシクロオキシゲナーゼ COX-2 とグリア由来神経栄養因子(GDNF)の役割 第17回日本体力医学会東海地方会、2013年3月16日、愛知学院大学楠本キャンパス歯学部基礎棟(名古屋)
- ⑧ Murase S, Mizumura K. Glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF) sensitized muscle A δ -fiber afferents to mechanical stimulation and GDNF induced mechanical hyperalgesia was improved by intramuscular injection of amiloride in rats. 35th annual meeting of the Japan Neuroscience Society、2012年9月19日、名古屋国際会議場(名古屋)
- ⑨ Ota H, Katanosaka K, Kashio M, Tominaga M, Mizumura K. Involvement of TRPV1 and TRPA1 in the generation of mechanical hyperalgesia after exercise (delayed onset muscle soreness, DOMS). 35th annual meeting of the Japan Neuroscience Society、2012年9月18日、名古屋国際会議場(名古屋)。
- ⑩ 太田大樹、水村和枝 遅発性筋痛発生にEP2受容体が寄与する。第34回日本疼痛学会、2012年7月20日、熊本国際交流会館(熊本)
- ⑪ Murase S, Yamanaka H, Kanda H, Mizumura K. COX-2, nerve growth factor (NGF) and glial cell-derived neurotrophic factor (GDNF), which play pivotal roles in delayed onset muscle soreness (DOMS), are produced by exercised skeletal muscle cells. 第89回日本生理学会大会、2012年3月30日、長野県松本文化会館(松本)。
- ⑫ Mizumura K, Murase S, Taguchi T: Effects of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) on the mechanical response of rat muscle thin-fiber receptors in vitro. The 41st annual meeting of the Society for Neuroscience. (2011年11月13日、コンgresセンター(Washington DC,U.S.A.))
- ⑬ 村瀬詩織, 加藤健祐, 田口 徹, 水村和枝: グリア細胞由来神経栄養因子はラットの筋細径線維の機械応答性を増大する。

第58回中部日本生理学会 2011年11月1-2日、福井県民ホール(福井)

- ⑭ 鈴木実佳子, 水村和枝, 村瀬詩織: ラット神経損傷モデルにおける筋機械痛覚過敏と神経成長因子の関与の検討 第33回日本疼痛学会 2011年7月22-23日、愛媛県民文化会館(松山)

[図書] (計 2 件)

1. T.Taguchi, K.Mizumura Chapter 4. Analysis of nociceptors with muscle- and visceral- nerve preparations in vitro. In: Pain models – translational relevance and applications, eds H.O Handwerker, L.Arendt-Nielsen, pp47-60. IASP press, 2013.10 全450ページ
2. Katanosaka K, Murase S, Taguchi T, Mizumura K. Neural mechanisms and developmental process of mechanically induced pain -insights obtained from the study on the mechanical hyperalgesia after exercise (delay-ed onset muscle soreness)- in: Shi Yong-de chief editor. Recent Advances in Mechano-biology (2012). pp.181-188. (Shanghai Scientific and Technological Literature Publishing House)

[その他]

ホームページ等

中部大学大学院理学療法学科水村研究室
<http://www.isc.chubu.ac.jp/myalgia/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)
 中部大学・生命健康科学部・教授
 研究者番号: 00109349

(2) 研究分担者

片野坂 公明 (KATANOSAKA, Kimiaki)
 名古屋大学・環境医学研究所・助教
 研究者番号: 50335006
 (平成24年度より連携研究者)

田口 徹 (TAGUCHI, Toru)
 名古屋大学・環境医学研究所・助教
 研究者番号: 90464156
 (平成24年度より連携研究者)

松田 輝 (MATSUDA, Teru)
 中部大学・生命健康科学部・講師
 研究者番号: 40367868