

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592158

研究課題名(和文) ラット腕神経叢損傷モデルにおける疼痛発生機序の解明と新規薬物治療の可能性

研究課題名(英文) Mechanism of pain generation in the rat model of brachial plexus avulsion and the effect of anti-nerve growth factor receptor (p75 neurotrophin receptor) administration

研究代表者

國吉 一樹 (Kuniyoshi, Kazuki)

千葉大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：40375788

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：ラット腕神経叢損傷の節前モデル(BPA)において、疼痛行動および脊髄におけるグリア活性を比較・検討すると同時に神経栄養因子低親和性受容体であるp75NTRの抗体の局所または全身投与による疼痛抑制効果を検討した。結果、BPA群では損傷側において有意な疼痛過敏を認めると同時に反対側においても有意な疼痛過敏を認め、脊髄の非損傷側レベルにおいてmicrogliaおよびastrocyteの活性化が有意に認められた。またp75NTR抗体の局所投与または腹腔内投与によりどちらにおいても有意に疼痛過敏が減少した。脊髄microgliaおよびastrocyteの活性化は非投与群に比べ有意に抑制された。

研究成果の概要(英文)：In the rat model of brachial plexus avulsion (BPA), pain-related behavior and the extent of glial activation was evaluated. The effect of local and general administration of anti-nerve growth factor receptor (p75 neurotrophin receptor [p75NTR]) antibodies was also evaluated in the BPA model. As a result, rats in the BPA group displayed significant mechanical hyperalgesia in the dermatome innervated by uninjured nerves both ipsilaterally and contra laterally. GFAP-immunoreactive astrocytes and Iba1-immunoreactive microglia were significantly activated on the ipsilateral side in the BPA group. And in the both rats group in which anti-p75NTR was locally or generally, mechanical hyperalgesia was significantly improved. Levels of GFAP-immunoreactive astrocytes and Iba1-immunoreactive microglia in the anti-p75NTR group were significantly reduced.

研究分野：手の外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：腕神経叢損傷 疼痛 機序 p75NTR阻害

## 1. 研究開始当初の背景

腕神経叢損傷は重大な機能障害をきたすと同時に慢性化する難治性の神経因性疼痛を引き起こす。その疼痛の発生機序は未だ解明されておらず、有効な治療がないのが現状である。神経因性疼痛一般に対する薬物療法については一般の消炎鎮痛剤は効果に乏しく、抗癲癇薬、オピオイドなどが適用されるが、腕神経叢損傷後については効果がいずれも不確実である。近年になって神経因性疼痛一般に対して様々な薬物、特に p75NRT 阻害薬、HGF などの薬剤は基礎データからその効果の期待が高い薬剤であり、臨床導入されるようになってきている。

## 2. 研究の目的

本研究の目的はラット腕神経叢損傷の節前モデルにおいて、脊髄におけるグリア活性、脊髄および後根神経節における疼痛ペプチドの発現、疼痛行動を比較・検討することによりその疼痛発生機序を解明すると同時にラット腕神経叢損傷の節前損傷モデルに対する p75NRT 阻害の疼痛抑制効果を比較・検討することである。

## 3. 研究の方法

腕神経叢損傷の節前損傷モデル (Rodrigues-Filho model) を作成し、脊髄におけるグリア活性、脊髄および後根神経節における疼痛ペプチドの発現、疼痛行動を比較・検討する。次にラット腕神経叢損傷の節前損傷モデルに対する p75NRT 阻害を行い、同様に脊髄におけるグリア活性、脊髄および後根神経節における疼痛ペプチドの発現、疼痛行動を評価してそれぞれの疼痛抑制効果を比較・検討する。

## 4. 研究成果

(1) ラット腕神経叢節前損傷モデル (BPA 群) における疼痛発生機序について

腕神経叢を展開、下神経幹を牽引してC8-T1

神経根を引き抜いたBPA群、皮切のみを行ったsham群、手術を行わないコントロール群を作成、手術後3日おきに21日までC6-7皮節に対する機械刺激を行い、疼痛行動を比較・検討した。またC3-T4脊髄後角に対して astrocyte の marker である GFAP および microglia の marker である Iba-1 による免疫染色を行った。結果、BPA群ではsham群、コントロール群に比し全期間で損傷側および非損傷側において有意な疼痛過敏を認められた。一方、BPA群において損傷側のC3-T3脊髄ではmicrogliaおよびastrocyteの活性化が有意にみられた。以上から、非損傷レベルにおけるglia活性が疼痛伝達に関与している可能性が示唆された。

(2) ラット腕神経叢節前損傷モデルに対するp75NTR抗体の局所投与の効果について

右腕神経叢下神経幹を展開、そのまま閉創したsham群 (以下S群)、下神経幹を引き抜いて節前損傷を発生させた後に生食10 $\mu$ lを局所投与したコントロール群 (以下C群)、下神経幹を引き抜いて節前損傷を発生させた後にp75NTR抗体10 $\mu$ lを局所投与した群 (以下p75群) を作成した。疼痛行動は機械刺激 (von Frey) 及びCatWalk (歩行解析) を使用し、術直後から3日おきに21日まで評価した。組織学的評価は術後7、21日目に脊髄・DRGを採取、脊髄をGFAP及びIba-1により免疫組織化学染色を行った。結果、von FreyではShamを除く両群において術後3日で疼痛過敏が見られたがp75群はC群に比し術後6日以降21日まで疼痛過敏が有意に減少していた ( $p < 0.01$ )。CatWalkの接地圧はp75群で術後6日以降に有意に改善した ( $p < 0.01$ )。免疫染色では、GFAP陽性細胞数はp75群とC群に有意差を認めなかったが、Iba1陽性細胞数はp75群ではC群に比し有意に減少した ( $p < 0.01$ )。以上から、腕神経叢節前損傷モデルに対してp75NTR抗体が疼痛を抑制する可能性があることが示唆された。

特に脊髄でのmicroglia活性が抑制されておりp75NTR抗体の疼痛抑制機序に関与することが示唆された。

(3) ラット腕神経叢節前損傷モデルに対するp75NTR抗体の腹腔内投与の効果について

臨床例におけるより簡便な投与方法としての全身投与を検討する目的で腹腔内投与の効果を検討した。下神経幹を引き抜き1週間後に生食を投与したBPA群, 下神経幹を引き抜き1週間後に抗p75NTR抗体を用量別に1.0µl, 50µl 腹腔内投与したp75 1.0群, p75 50群を作成。疼痛行動評価はvon Frey testにより経時的に施行。免疫組織染色は投与後3日目、15日目に脊髄C7および右C7DRGを採取し評価。脊髄ではGFAPおよびIba1で染色, DRGではGFAPで染色した。結果, 行動評価では抗p75NTR抗体投与群で有意に疼痛過敏が減少した。免疫染色ではIba1陽性microgliaおよびGFAP陽性astrocyteは15日目にBPA群に比べ両濃度群で有意に減少した。DRGにおけるGFAP陽性神経細胞は3, 15日目で両濃度群ともに有意に減少した。以上から, p75NTR抗体投与の効果は全身投与においても有効であることが示唆された。

本研究の意義は日常診療において極めて難治である腕神経叢損傷患者の神経障害性疼痛に対する薬物治療において一定の方向性を示した点にある。

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 3件)

1. Matsuura Y, Ohtori S, Iwakura N, Suzuki T, Kuniyoshi K, Takahashi K. Expression of activating transcription factor 3 (ATF3) in uninjured dorsal root ganglion neurons in a lower trunk avulsion pain model in rats. Eur Spine J (2013) 22:1794–1799.

2. Iwasaki R, Matsuura Y, Ohtori S, Suzuki T, Kuniyoshi K, Takahashi K. Activation of Astrocytes and Microglia in the C3–T4 Dorsal Horn by Lower Trunk Avulsion in a Rat Model of Neuropathic Pain. J Hand Surg 2013;38A:841–846.

3. Matsuura Y, Iwakura N, Ohtori S, Suzuki T, Kuniyoshi K, Murakami K, Hiwatari R, Hashimoto K, Okamoto S, Shibayama M, Kobayashi T, Ogawa Y, Sukegawa K, Takahashi K. The Effect of Anti-NGF Receptor (p75 Neurotrophin Receptor) Antibodies on Nociceptive Behavior and Activation of Spinal Microglia in the Rat Brachial Plexus Avulsion Model. Spine 2013 ;38:E332–E338.

〔学会発表〕(計 10件)

1. 小林倫子、松浦佑介、芝山昌貴、鈴木崇根、國吉一樹。ラット腕神経叢引き抜き損傷モデルにおける抗p75NTR抗体腹腔内投与の疼痛行動と脊髄グリア細胞、後根神経節への効果。第57回日本手外科学会学術集会 2014/4/17-18 沖縄

2. 小林倫子、松浦佑介、大鳥精司、山内かづ代、鈴木崇根、助川浩士、小川泰史、芝山昌貴、岡本聖司、國吉一樹、高橋和久。ラット腕神経叢引き抜き損傷モデルにおける抗p75NTR抗体腹腔内投与の後根神経節への効果。第28回日本整形外科学会基礎学術集会 2013/10/17-18 千葉

3. 小林倫子、松浦佑介、大鳥精司、山内かづ代、鈴木崇根、助川浩士、小川泰史、芝山昌貴、岡本聖司、國吉一樹、高橋和久。ラット腕神経叢引き抜き損傷モデルにおける抗p75NTR抗体腹腔内投与の脊髄グリア細

胞への効果. 第28回日本整形外科学会基礎  
学術集会 2013/10/17-18 千葉

4. 小林倫子、松浦佑介、芝山昌貴、鈴木  
崇根、國吉一樹. ラット腕神経叢引き抜  
き損傷モデルにおける抗 p75NTR 抗体腹  
腔内投与の効果. 第 56 回日本手外科学  
会学術集会 2013/4/18-19 神戸

5. 松浦佑介、岩倉菜穂子、村上賢一、鈴木  
崇根、樋渡龍、岡本聖司、芝山昌貴、井上  
玄、國吉一樹、大鳥精司、高橋和久. ラッ  
ト腕神経叢引き抜き損傷モデルに対する抗  
p75神経栄養因子受容体抗体の腹腔内投与  
の効果. 第27回日本整形外科学会基礎学術  
集会 2012/10/26-27 名古屋

6. 松浦佑介、大鳥精司、岩倉菜穂子、村上  
賢一、鈴木崇根、國吉一樹、高橋和久. ラ  
ット腕神経叢引き抜き損傷モデルの疼痛行  
動と脊髄グリア活性に対する抗p75受容体  
(神経栄養因子受容体)抗体投与の効果.  
第34回日本疼痛学会 2012/7/20-21 熊本

7. 松浦佑介、大鳥精司、岩倉菜穂子、村上  
賢一、鈴木崇根、國吉一樹、高橋和久. ラ  
ット腕神経叢引き抜き損傷モデルにおける  
C3-T4髄節における脊髄後角のグリア細胞  
活性. 第34回日本疼痛学会 2012/7/20-21  
熊本

8. 松浦佑介、岩倉菜穂子、村上賢一、鈴木  
崇根、國吉一樹. ラット腕神経叢引き抜き  
損傷モデルと神経切断モデルにおける疼痛  
発生機序. 第 55 回日本手外科学会学術集  
会 2012/4/19-20 横浜

9. 松浦佑介、岩倉菜穂子、村上賢一、鈴木  
崇根、樋渡龍、橋本健、國吉一樹、大鳥精  
司、高橋和久. ラット腕神経叢引き抜き損

傷モデルと神経切断モデルにおける疼痛発  
生機序. 第 26 回日本整形外科学会基礎学  
術集会 2011/10/20-21 前橋

10. 松浦佑介、岩倉菜穂子、村上賢一、  
鈴木崇根、樋渡龍、橋本健、國吉一樹、  
大鳥精司、高橋和久. ラット腕神経叢引  
き抜き損傷モデルの疼痛行動と脊髄グ  
リア活性に対する etanercept(Enbrel®)  
の効果. 第 26 回日本整形外科学会基礎  
学術集会 2011/10/20-21 前橋

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

國吉 一樹 (Kuniyoshi, Kazuki)  
千葉大学・医学部附属病院・講師  
研究者番号：40375788

##### (2) 研究分担者

大鳥精司 (Ohtori, Seiji)  
千葉大学・医学研究院・講師  
研究者番号：40361430

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：