

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24500604

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛による大腰筋の左右差の形成に対する姿勢保持神経機構の関与

研究課題名(英文) Involvement of the neural mechanism for posture maintenance in the formation of laterality of the psoas major muscle by neuropathic pain

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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、神経障害性疼痛(NPP)が下肢骨格筋に及ぼす影響およびNPPに対する走運動の効果について検討した。坐骨神経部分損傷を施したNPPモデルマウスの健側ヒラメ筋の筋線維横断面積(CSA)は増大し、術側ヒラメ筋CSAは縮小した。走運動はNPPモデルマウスの疼痛を緩和し、脊髄後角ではアセチル化ヒストンH3K9陽性ミクログリア数が増加した。このようにNPPはヒラメ筋に左右差を生み出すが、走運動は疼痛を緩和することにより不均等化したヒラメ筋の矯正に有効であると思われる。さらに脊髄後角ミクログリアでのヒストンH3K9のアセチル化のようなエピジェネティクス修飾がEIHに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study investigated the influence of neuropathic pain (NPP) on the lower extremity skeletal muscle and treadmill running on NPP. Mice that were subjected to partial sciatic nerve ligation (PSL) showed neuropathic pain behavior and significant enlargement and reduction of myofiber cross sectional area (CSA) in the contralateral and ipsilateral soleus muscles, respectively. Treadmill running for 5 days after the PSL significantly improved pain behaviors of NPP model mice, and also increased the number of microglia with nuclear expression of acetylated histone H3K9 in the ipsilateral superficial dorsal horn. In this way, although NPP produces laterality in the soleus muscle, treadmill running may be effective in correcting the unbalanced soleus muscle. In addition, the present study suggested that epigenetic modification such as hyperacetylation of histone H3K9 in microglia in the ipsilateral dorsal horn may play a role in producing exercise-induced hypoalgesia.

研究分野：神経科学

キーワード：神経障害性疼痛 トレッドミル走 ヒラメ筋 筋線維横断面積 HDAC1 アセチル化ヒストンH3K9 ミクログリア エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

姿勢の安定化に關与する大腰筋が神経障害性疼痛 (NPP) に対してどのように適応するかは不明である。さらに下肢に出現する疼痛は、姿勢を安定させるために健常側の筋群の機能を変化させるが、これを生み出す神経機構の詳細についても分かっていない。

## 2. 研究の目的

NPP が筋機能に及ぼす影響を検討した研究は皆無である。本研究は、大腰筋の NPP に対する形態的および機能的変化を特徴づけ、この適応を引き出す神経機構を明らかにしようとするものである。本研究により得られた知見は、慢性痛患者の筋機能の改善を目的としたトレーニング・プログラムを考案するための基礎データを提供でき、リハビリテーション医学研究として意義深いものとなる。

## 3. 研究の方法

本研究では「実験 1: NPP に対するヒラメ筋の適応」と「実験 2: 走運動による NPP の緩和とその神経メカニズム」を検討した。

### (1) 神経障害性疼痛モデルマウスの作製

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。マウスは深麻酔下において皮膚と筋層を切開し、右坐骨神経上部を絹糸できつく結紮した。その後筋層および皮膚を縫合した。本研究は和歌山県立医科大学動物実験委員会の承認を得て行われた。

### (2) ヒラメ筋と脊髄の免疫染色と免疫陽性細胞の定量化

本研究では当初、大腰筋の NPP に対する適応を検討する計画を立てたが、灌流固定を施さないうで大腰筋だけ正確に摘出することは、この筋が深層にあること、起始が広範囲に及ぶこと、強

い筋膜で包まれていないこと、起始と停止部にかけて重要な動静脈が通っていることが原因で困難であった。そこで実験 1 では、被検筋をヒラメ筋に変更して次のように実施した。PSL および Sham 術後 7、14、21 日目にイソフルラン麻酔下においてヒラメ筋を摘出してドライアイス-ヘキサンで瞬間凍結した。10 $\mu$ m 厚の凍結切片を作製した後、免疫染色により筋線維タイプ構成比、筋線維横断面積 (CSA) およびマクロファージ・サブタイプを分析した。1 次抗体には、Myosin heavy chain slow、Dystrophin、CD68、CD206 を用い、免疫反応の可視化には、適切な Alexa Fluor 標識 2 次抗体を使用した。健側と術側のヒラメ筋における筋線維タイプ構成比、筋線維横断面積 (CSA)、マクロファージ・サブタイプの定量化はイメージ分析により実施した。

実験 2 における脊髄の免疫染色に用いた 1 次抗体は、抗ラット CD11b 抗体、抗ラット GFAP 抗体、抗ウサギ HDAC1 抗体、抗ウサギ acetylated histone H3K9 抗体であり、免疫反応の可視化には適切な Alexa Fluor 標識 2 次抗体を使用した。脊髄後角表層部 (I/II 層) における免疫陽性細胞数は、Clark らの方法を改良して計測した。

### (3) 実験群とトレッドミル走

実験 2 では次の実験群を設けた: 1) Naive 群、2) Sham-Sedentary 群、3) Sham-Runner 群、4) PSL-Sedentary 群、5) PSL-Runner 群。Naive マウスを除いた 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 7 m/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 群の

マウスは、7 m/minの走速度で60分間の走運動を5日間行った。

#### (4)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、足底熱刺激装置を用い、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。von Frey テストと plantar テストは3回実施し、その平均値を逃避閾値とした。

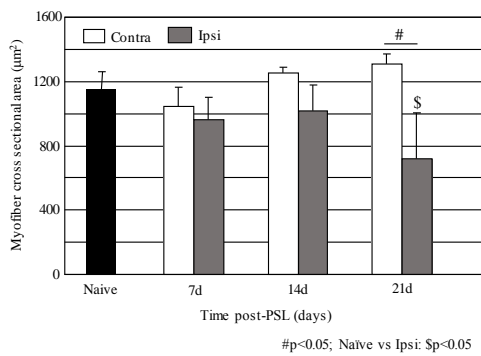


図1 NPPモデルマウスにおけるヒラメ筋CSAの変化

## 4. 結果

### 実験1

#### (1)NPPに対するヒラメ筋の適応

Naive群のヒラメ筋type I線維CSAは $1106.9\mu\text{m}^2$ を示したが、PSL21日後には健側ヒラメ筋type I線維CSAの有意な増大と術側ヒラメ筋type I線維CSAの有意な萎縮が起こった(図1)。しかし、PSL21日後の健側と術側ヒラメ筋の筋線維タイプ構成比は顕著な相違を示さなかった。Naive群には少数のCD68<sup>+</sup>M1(約2個/10<sup>2</sup>myofibers)とCD206<sup>+</sup>M2(約4個/10<sup>2</sup>myofibers)マクロファージが検出され、PSL21日後の健側ヒラメ筋におけるM1マクロファージ数はNaive群の約2倍に増加したのに対して、M2マクロファージ数は約4倍の増加を示した。これらの結果から、疼痛逃避動作お

よび術側肢の運動神経障害による健側肢への過負荷は、健側ヒラメ筋CSAを増大させ、さらにM2マクロファージはこの活動性筋肥大に関与することが示唆された。

予備の実験において、NPPモデルマウスに見られたヒラメ筋の左右差が走運動により矯正されるかどうかを検討したところ、走運動はNPPそのものを軽減することが分かった。そこで実験2では、走運動が疼痛を緩和(Exercise-induced hypoalgesia [EIH])する神経メカニズムを検討した。

### 実験2

#### (1) 走運動に対する疼痛行動の変化(図2)

PSL手術は、von Freyテストの逃避反応閾値とPlantarテストの逃避反応潜時を著しく低下させ、PSL-Sedentary群におけるこれらの値は実験期間を通して低値を維持した。一方、PSL-Runner群における逃避反応閾値と逃避反応潜時はPSL-Sedentary群と比較して、PSL後5日目と6日目にそれぞれ有意に上昇した。

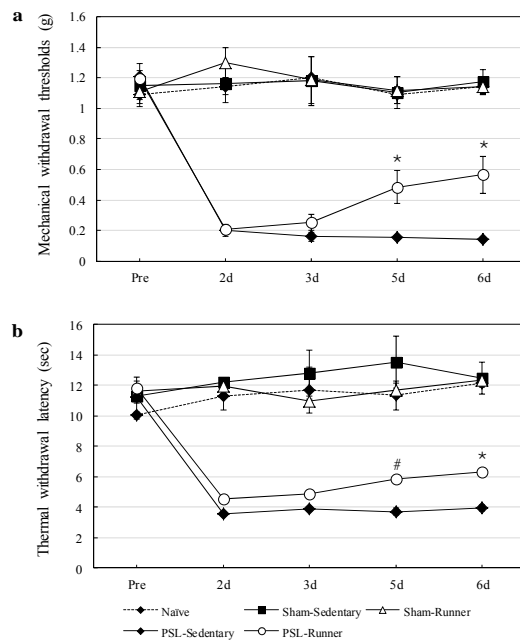


図2 走運動に対する機械的アロディニア(a)と熱痛覚過敏(b)の変化

(2) 走運動に対する HDAC1 およびアセチル化ヒストン H3K9 陽性マイクログリアの変化(図 3)

Naive マウスの脊髄後角表層には HDAC1 陽性、あるいは陰性の CD11b 陽性マイクログリアが観察された。PSL 手術後には HDAC1 陽性 CD11b 陽性マイクログリア数は有意に増加したが、トレッドミル走はこれらを減少させた。さらに CD11b 陽性マイクログリアにおけるアセチル化 H3K9 発現は、PSL-Sedentary マウスでは低値を示したが、トレッドミル走はアセチル化ヒストン H3K9 陽性マイクログリア数を有意に増加させた(図 3)。マイクログリアは抗炎症性サイトカイン、interleukin-10(IL-10)を産生/放出することができ、さらに IL-10 遺伝子のプロモーター領域におけるヒストン H3K9 のアセチル化は、この転写を高めることが知られている。これらのことより、トレッドミル走によるマイクログリアでのヒストン H3K9 の hyperacetylation は、IL-10 産生を促して炎症性サイトカインの産生を抑制することで EIH に関与すると考えられる。

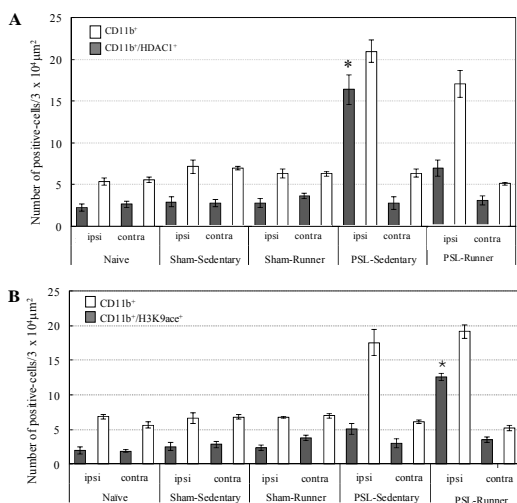


図3 走運動に対する HDAC1 陽性マイクログリア数 (A)と H3K9ace 陽性マイクログリア数(B)の変化

3. 結論

トレッドミル走はNPPを緩和することができ、疼痛緩和はヒラメ筋の左右差を矯正すると思われる。

さらにEIHを生み出す神経メカニズムとして、本研究は脊髄後角マイクログリアでのヒストン H3K9 のアセチル化の関与を示した。慢性痛患者の運動機能の低下は疼痛を悪化させるだけでなく、鬱などの精神疾患も招く恐れがある。本研究結果は、疼痛が原因で起こる筋機能障害を改善する新たな介入方法の開発に貢献でき、ひいては慢性痛患者の QOL の向上に寄与することが期待される。

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 8 件 )

田口 聖, 上 勝也, 田島文博, 仙波恵美子「走運動による損傷坐骨神経でのM2マクロファージの増加は神経障害性疼痛の緩和に関与する」. Pain Research(日本疼痛学会誌)30巻3号, 査読有, 2015年(印刷中)

上 勝也, 田口 聖, 田島文博, 仙波恵美子「脊髄後角 GABA 作動性ニューロンは運動による疼痛の緩和に関与する」. 日本運動器疼痛学会誌 第7巻 1号, 査読有, 2015年, p15-26.

仙波恵美子, 上 勝也「神経障害性疼痛モデルマウスの一次知覚伝達系におけるマクロファージ/マイクログリアの由来と極性化」. 脳 21 第17巻, 2014年, p9-16.

上 勝也, 仙波恵美子「神経障害性疼痛に対する運動療法の効果とそのメカニズム」ペインクリニック第 35 巻, 2014年, p1007-1017.

上 勝也, 仙波恵美子「脊髄での痛みの発生メカニズム - マイクログリアによる痛みのコントロール」, 「日本医師会雑誌」第 143 巻・特別号(1)「痛みのマネジメント update 基礎知識から緩和ケアまで」監修・編集 花岡一雄、田中 栄, 2014年, S38-S39.

Lee K, Kouzaki K, Ochi E, Kobayashi K, Tsutaki A, Hiranuma K, Kami K, Nakazato K: Eccentric contractions of gastrocnemius muscle-induced nerve damage in rats. Muscle Nerve 50, 査読有, 2014年, p87-94.

Nomura S, Kami K, Kawano F, Oke Y, Nakai N, Ohira T, Fujita R, Terada M, Imaizumi K, Ohira Y: Effects of hindlimb unloading on neurogenesis in the hippocampus of newly weaned rats. Neuroscience Letters 509, 査読有, 2012年, p76-81.

岩田 晃, 野中 紘士, 上 勝也「肉離れ損傷筋における基底膜の特徴-ラットを用いた基礎的研究」, Journal of Rehabilitation and Health Science 10, 2012年, p7-11.

〔学会発表〕(計 22 件)

上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子「神経障害性疼痛に対する走運動の効果 脊髄後角ミクログリアにおけるヒストンアセチル化の関与」第 36 回 日本疼痛学会シンポジウム, 6 月 20 日 ~ 21 日, 大阪, 2014 年

仙波恵美子, 上 勝也「慢性痛に対する運動療法奏功のメカニズムと創薬」第 36 回 線維筋痛症学会シンポジウム, 9 月 13 日 ~ 14 日, 長野, 2014 年,

Senba E, Taguchi E, Kami K: RUNNING EXERCISE ATTENUATES NEUROPATHIC PAIN THROUGH EPIGENETIC REGULATION IN SPINAL MICROGLIA. 2014 International Association of Studying of Pain (IASP) congress, 2014, Buenos Aires, Alzentine, November 6 ~ 11, 2014.

上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子「走運動によ

る神経障害性疼痛の緩和には脊髄後角ミクログリアにおけるヒストン脱アセチル化酵素 1 発現の抑制が関与する」, 第 49 回 日本理学療法学会大会, 神奈川, 5 月 30 日 ~ 6 月 1 日, 2014 年.

田口 聖, 上 勝也, 仙波恵美子「走運動は損傷坐骨神経におけるマクロファージの極性を変化させ神経障害性疼痛の緩和を誘導する」, 第 49 回 日本理学療法学会大会, 神奈川, 5 月 30 日 ~ 6 月 1 日, 2014 年.

田口 聖, 上 勝也, 仙波恵美子「走運動による損傷坐骨神経での M2 マクロファージの増加は神経障害性疼痛の緩和に関与する」. 第 36 回 日本疼痛学会, 大阪, 6 月 20 日 ~ 21 日, 2014 年

Kami K, Taguchi S, Senba E: RUNNING EXERCISE ATTENUATES NEUROPATHIC PAIN THROUGH EPIGENETIC REGULATION IN SPINAL MICROGLIA. 第 37 日本神経学会, 横浜, 9 月 11 日 ~ 13 日, 2014 年.

上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子「Exercise-induced hypoalgesia に対する脊髄後角 GABA 作動性ニューロンの関与」. 第 7 回日本運動器疼痛学会, 山口, 10 月 25 日 ~ 26 日, 2014 年.

田口 聖, 上 勝也, 仙波恵美子「走運動による神経障害性疼痛の緩和に対する損傷坐骨神経での M2a マクロファージの関与」. 第 7 回日本運動器疼痛学会, 山口, 10 月 25 日 ~ 26 日, 2014 年.

上 勝也, 仙波恵美子「神経障害性疼痛モデルマウスの脊髄後角には, ヒストン脱アセチル化酵素 1 を発現するミクログリアとアストロサイトが増加する」第 119 回日本解剖学会全国学術大会, 栃木(自治医科大学), 2014 年 3 月.

Kami K, Taguchi S, Senba E. 「Running

exercise attenuates neuropathic pain through epigenetic regulation in spinal microglia」The 17<sup>th</sup> The study group for nerve and spine, Tokyo, March, 2014.

Senba E, Taguchi S, Kami K. 「Exercise training attenuates neuropathic pain by modulating microglial activation」The 5th Asian Pain Symposium, Okazaki Conference Center, December, 2013.

上 勝也, 細江さよ子, 川西 誠, 仙波恵美子 「神経障害性疼痛に対するヒラメ筋の適応」. 第 48 回日本理学療法学会大会, 名古屋, 2013 年 5 月.

Kami K, Senba E. 「Macrophage/Microglia Polarized into M1 Phenotype Enhances Phosphorylation of cAMP-Response Element Binding Protein in Neuropathic Pain Model Mice」第 36 回日本神経科学学会大会, 京都, 2013 年 6 月 20 日 ~ 23 日.

上 勝也, 仙波恵美子 「運動が神経障害性疼痛モデルマウスに及ぼす影響 - 脊髄後角マイクログリアにおける変化 - 」. 第 35 回日本疼痛学会, 埼玉, 2013 年 7 月 12 日 ~ 13 日.

上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子 「走運動による神経障害性疼痛の緩和には脊髄後角マイクログリアにおける Histone deacetylase 1 発現の抑制が関与する」第 18 回グリア研究会. 宮城, 2013 年 10 月 26 日.

上 勝也, 田口 聖, 仙波恵美子 「運動強度は神経障害性疼痛の緩和に影響を及ぼす」第 6 回日本運動器疼痛学会大会, 神戸, 2013 年 12 月.

上 勝也, 仙波恵美子 「末梢神経損傷後の脊髄における常在性マイクログリアと骨髄由来マクロファージ/マイクログリアのサブタイプの特徴」第

118 回 日本解剖学会全国学術大会, 香川, 2013.年 3 月

仙波恵美子, 上 勝也: A site-specific and phase-specific activation of macrophages/microglia in the primary afferent system of Seltzer model mice. 「侵害受容から痛みへ 生理学と解剖学の接点からの再考」. 第 90 回日本生理学会大会シンポジウム, 東京, 2013 年 3 月.

上 勝也, 広田真一, 細江さよ子, 仙波恵美子 「坐骨神経部分損傷後の脊髄後角におけるグリア細胞の長期応答とマクロファージ・サブタイプの分布様式」, 第 35 回日本神経科学学会, 名古屋, 2012 年 9 月.

①上 勝也, 仙波恵美子 「マウス坐骨神経部分結紮に対する常在型マイクログリアと骨髄由来マクロファージ/マイクログリアの反応」, 第 17 回グリア研究会, 神戸, 2012 年 10 月.

②仙波恵美子, 上 勝也 「神経障害性疼痛モデルマウスの一次知覚伝達系における macrophage/microglia の由来と極性化」, 平成 24 年度生理研研究会「痛み研究の新たな展開」, 自然科学研究機構 岡崎総合バイオサイエンスセンター, 2012 年 12 月.

## 6 . 研究組織

### (1)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

### (2)研究分担者

仙波 恵美子 (SENBA Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員

研究者番号 : 00135691