

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 20 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860381

研究課題名(和文)複合ストレス負荷によってみられる脊髄ミクログリア活性化機構の解明

研究課題名(英文)The mechanism for activation of a spinal microglia induced by multiple stress loading

研究代表者

安井 正佐也(YASUI, MASAYA)

名古屋大学・全学技術センター(医学)・技術専門職員

研究者番号：10723695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、異なるストレスを負荷した二つのモデル動物(慢性疲労症候群CFSモデル、線維筋痛症FMモデル)の病的疼痛について研究を行った。その結果、いずれのモデルにおいても機械的アロディニアや筋性痛覚過敏が誘発することを実証した。さらに末梢組織に炎症等は認めないが、いずれのモデルにも、腰髄後角でミクログリアの活性化を認めた。このミクログリア活性化を薬剤(ミノサイクリン)で抑制すると、有意に機械的アロディニアおよび筋性痛覚過敏を抑制した。このことから、ストレス負荷によって生じる異常な疼痛の発症に、ミクログリアが大きく関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The present study addressed whether the nonphysiological pain was occurred in different two stress models. In the result, we demonstrated that CFS and FM models elicited mechanical allodynia and muscular hyperalgesia. Furthermore no signs of inflammation and injury incidents were observed in both the plantar skin and leg muscles. However, microglial accumulation and activation were observed in L4-L6 dorsal horn of CFS and FM model rats. To evaluate an implication of microglia in pain, minocycline was intrathecally administrated in CFS model rats. Minocycline significantly attenuated continuous multiple stresses induced mechanical hyperalgesia and allodynia. These results indicated that activated microglia were involved in the development of abnormal pain in CFS animals, suggesting that the pain observed in CFS and FM patients may be partly caused by a mechanism in which microglial activation is involved.

研究分野：疼痛学

キーワード：ストレス 疼痛 ミクログリア 線維筋痛症 慢性疲労症候群

1. 研究開始当初の背景

慢性疲労症候群(CFS)や線維筋痛症(FM)は、慢性的な過度の疲労感や疼痛など様々な症状を呈する類似疾患であり、しばしば相互に併発することが知られている。その為、近年では両疾患やその他の類似疾患を含めて機能性身体症候群(Functional somatic syndrome: FSS, Wissely 1999)として分類されることもあり、その原因は身体的・精神的ストレスとされるが、発症メカニズムは未だ不明である。CFS モデル動物は、ヒトにおける複合的なストレスを再現する目的に考案され、(1)過活動、(2)REM 睡眠消失、(3)下垂体細胞の崩壊、(4)胸腺の萎縮、(5)脳内セロトニン・ドーパミン代謝低下というホメオスタシスの崩壊が生じており (Tanaka et al, 2003, Ogawa et al, 2005, 2009, 2012, Konishi et al, 2010, 2011), CFS 患者に見られる多く症状を呈す。また、本モデルで発見された血漿中の MSH の増加が、CFS 患者においても有意に増加している結果からモデルの妥当性が示唆されている(Shishioh et al, 2010)。

一方、FM モデル動物は繰返し寒冷ストレス(Repeated cold stress: RCS)により長期的な筋痛およびアロディニアが誘発される(Nasu et al, 2010)が、病態メカニズムについては報告されていない。また、CFS モデル動物においては、病的疼痛の解析がされておらず、この2つの疾患を比較して解析した報告は無い。

2. 研究の目的

慢性疲労症候群(CFS)や線維筋痛症(FM)は決定的な治療法が無く病態解明が社会から強く望まれている。いずれの疾患も複合ストレスによる環境要因が深く関係し病的疼痛が生じる。近年開発された再現性の高い FM モデル動物において、病的疼痛の発症が確認されている。そこで、本研究では、CFS や FM で見られる病的疼痛の発症原因を解明する事を目的に、末梢および中枢神経系の機能形態学的解析を行う。

3. 研究の方法

(1)CFS モデルにおける疼痛解析

CFS モデル作成後、足底に von-Frey test および前脛骨筋に Randall-Selitto test を行いアロディニアおよび筋痛を評価した。

(2)脊髄後角活性化グリア細胞の解析

CFS モデル、FM モデルにおける脊髄ミクログリアおよびアストロサイトの活性化の有無およびその動態を解析した。

(3)ミクログリア活性化領域の定量解析

脊髄後角でのミクログリア活性化領域を確認した後、得られた画像より活性化領域を I/II 層と III/IV 層とに分け、さらに内側・中間・外側とに分けた。その6区画に対するそれぞれのミクログリアの面積および数を解

析し定量化した。

(4)ミクログリアの活性化抑制実験

CFS モデルにおいて、ミノサイクリンの髄腔内投与(浸透圧ポンプによる持続投与)を行い、後角ミクログリアの活性化を抑制させ、疼痛評価を行った。

(5)末梢組織(筋・皮膚)での障害の検討

CFS モデルでの筋組織、皮膚組織を HE 染色では損傷や炎症を確認した。生化学的に筋疲労や損傷を確認するため、クレアチンキナーゼ(CK)、CRP、乳酸(LA)の血中濃度を計測した。

4. 研究成果

(1)CFS モデルラットおよび FM モデルマウスの病的疼痛の解析結果

CFS モデルにおいて、von-Frey test の結果、5 日間のストレス負荷後から 2 日間是非常に強いアロディニアを認めた(図 1A)。次に、Randall-Selitto test の結果、複合ストレス負

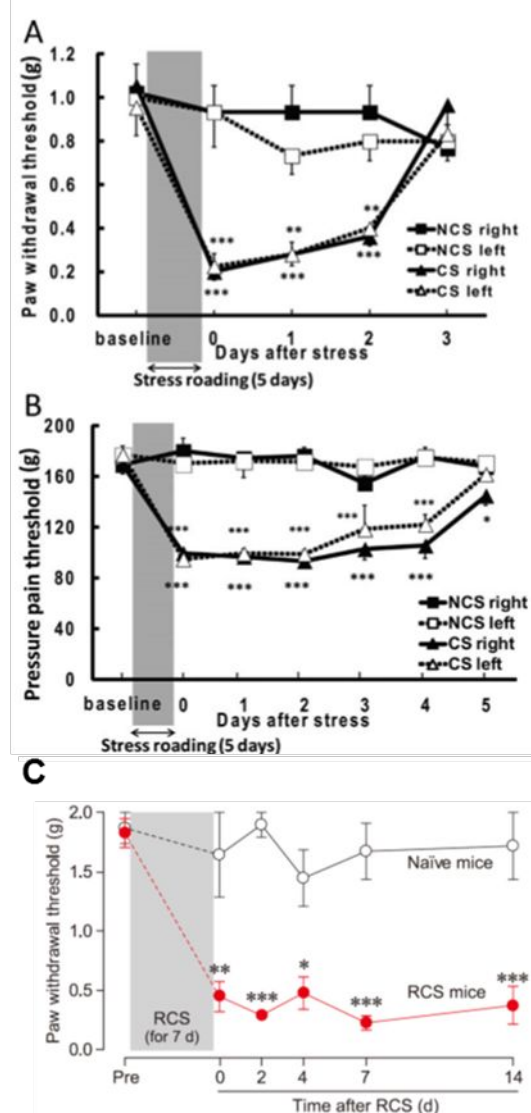


図 1. CFS モデルおよび FM モデルにみられる病的疼痛の経時的変化

荷後より4日間の強い筋性痛覚過敏を認めた(図1B)。以上の結果から、CFSモデルはヒトと同じような病的疼痛を引き起こしていることが示された。また、FMモデルマウスにおいても長期的に病的疼痛が引き起こされている事が確認できた(図1C)。

### (2)CFSモデルおよびFMモデルの脊髄グリア動態

CFSモデル5日目の腰髄後角では、L4からL6(特にL5)においてミクログリアの活性化および集積が観察された(図2A・E:CFSモデル, 2D:コントロール)。一方で、脊髄後角のアストロサイトは活性化していなかった(図2B:コントロール, 2C:CFSモデル)。また、FMモデルにおいても、腰髄後角(L5)でミクログリアが活性化していた(図2F:FMモデル)。

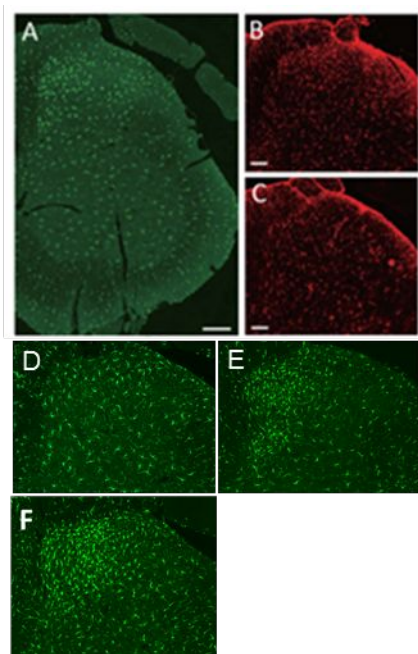


図2.CFSモデルおよびFMモデルにおけるL5腰髄後角のミクログリア(緑)とアストロサイト(赤)

### (3)CFSモデルにおける腰髄後角ミクログリアの定量化

CFSモデル脊髄後角(L5)におけるミクログリアの活性化を評価する目的で定量解析を行った。その結果、I/II層・III/IV層のいずれの領域において、ミクログリアの数も面積も増加していた。(2)の結果と合わせて、腰髄後角でミクログリアが活性化していたことから、病的疼痛にミクログリアの活性化が関与していると考えられた。

### (4)ミクログリア活性化抑制実験

CFSモデル作製前からミクログリアの活性化を抑制すると報告のあるミノサイクリン(テトラサイクリン系抗生物質)の髄腔内持続投与によって、生理食塩水を投与した Vehi

cle群に比べて有意にミクログリア活性化を抑制した。さらに、薬理的なミクログリア活性化の抑制は、von Frey testにおいてアロディニアを有意に抑制し(図3A)、Randall-Selitto testで筋性痛覚過敏も有意に抑制した(図3B)。

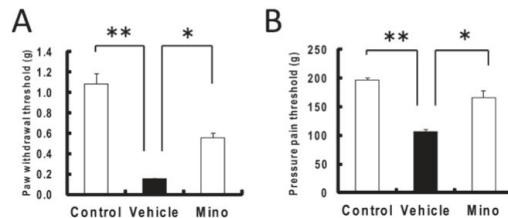


図3. ミノサイクリン投与は病的疼痛を抑制する

### (5)末梢組織の組織学・生化学的解析

病的疼痛を検査した足底皮膚および前脛骨筋のHE染色結果では、組織学的に炎症像は見られず正常だった(図4.A:皮膚, B:前脛骨筋)。また、血液検査の結果において、CK, CRP, LAはいずれもコントロール群と比べて有意な差を認めなかった(図4.C:CK, D:CRP, E:LA)。このことから、CFSモデルではCFS患者と同様に炎症所見は見られず、末梢組織の炎症関与は否定される事が考えられた。

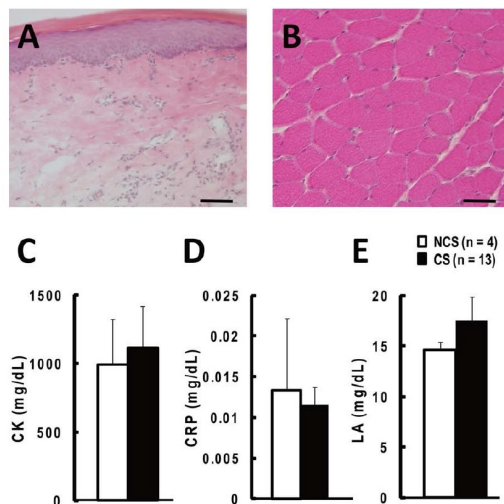


図4. 皮膚・筋のHE染色像と血液検査結果

### (6)まとめ

本研究によってストレスの異なる2つの動物モデルには共通して病的疼痛が生じている事が明らかとなった。大変興味深い事に2つの動物モデルには腰髄後角のミクログリアの活性化が起きており、CFSモデルにおいて薬理的にそのミクログリア活性化を抑制した結果、アロディニアおよび筋性痛覚過敏が有意に抑制することが出来た。また、慢性疲労症候群や線維筋痛症患者と共通して末梢組織に炎症所見は見られなかった事からモデルの妥当性がさらに示唆された。しかし、末梢組織に障害が見られなかった事から、このミクログリアの活性化機序については



不明なままである。どのような機序でミクログリア活性化を起こしているのかを突き止める事が今後の課題となる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

安井 正佐也, 木山 博資. 慢性ストレスが引き起こすミクログリアによる病的疼痛. 日本疲労学会誌, 2015; 10(2): 12-16.

<http://hirougakkai.com/>. 査読有

T Taguchi, K Katanosaka, M Yasui, K Hayashi, M Yamashita, K Wakatsuki, H Kiyama, A Yamanaka, K Mizumura. Peripheral and spinal mechanisms of nociception in a rat reserpine-induced pain model.

Pain, 2015; 156: 415-27. DOI:10.1097/01.j.pain.0000460334.49525.5e. 査読有

M Yasui, T Yoshimura, S Takeuchi, K Tokizane, M Tsuda, K Inoue, H Kiyama. A chronic fatigue syndrome model demonstrates mechanical allodynia and muscular hyperalgesia via spinal microglial activation. Glia, 2014; 62(9): 1407-17. DOI:10.1002/glia.22687. 査読有

T Akagi, Y Matsumura, M Yasui, E Minami, H Inoue, T Masuda, H Tozaki-Saitoh, T Tamura, K Mizumura, M Tsuda, H Kiyama, K Inoue. Interferon regulatory factor 8 expressed in microglia contributes to tactile allodynia induced by repeated cold stress in rodents. J Pharmacol Sci, 2014; 126: 172-6. DOI:<http://doi.org/10.1254/jphs.14143SC>. 査読有

〔学会発表〕(計 11 件)

校條 由紀, 安井 正佐也, 木山 博資. ラット慢性複合ストレスモデルにおける後根神経節内の交感神経線維の局在変化. 日本自律神経学会. 2015 年 10 月 29-30 日. ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)  
安井 正佐也, 校條 由紀, 木山 博資. ストレス誘発性疼痛の発症メカニズムの解析. 日本自律神経学会. 2015 年 10 月 29-30 日. ウィンクあいち (愛知県・名古屋市)  
安井 正佐也, 校條 由紀, 水村 和枝, 木

山 博資. 繰返し寒冷ストレスモデルと複合ストレスモデルに共通する病的疼痛発症メカニズムの解析. 日本疲労学会. 2015 年 5 月 15-16 日. 山口県総合保険会館 (山口県・山口市)

安井 正佐也. 慢性疲労症候群/線維筋痛症の痛みとミクログリア. 筋性疼痛研究会. 2015 年 1 月 24 日. 名古屋大学 (愛知県・名古屋市)

田口 徹, 片野坂 公明, 安井 正佐也, 林 功栄, 山下 麻衣, 若月 康次, 木山 博資, 山中 章弘, 水村 和枝. 線維筋痛症モデルを用いた病態機構の解明. 生理学研究所研究会. 2014 年 12 月 10-11 日. 生理学研究所 (愛知県・岡崎市)

安井 正佐也, 時實 恭平, 木山 博資. 持続的な筋活動が引き起こす病的疼痛発生機序の解析. 日本柔道整復接骨医学会学術大会. 2014.11 月 29-30 日. 大田区産業プラザ PiO (東京都・大田区)

若月 康次, 片野坂 公明, 安井 正佐也, 林 功栄, 山下 麻衣, 木山 博資, 山中 章弘, 水村 和枝, 田口 徹. 慢性広範痛症の末梢神経・脊髄機構. 中部日本生理学会. 2014 年 11 月 7-8 日. 名古屋市立大学 (愛知県・名古屋市)

安井 正佐也, 時實 恭平, 校條 由紀, 木山 博資. 慢性複合ストレスにより惹起される病的疼痛はミクログリアが関与する. 日本自律神経学会. 2014 年 10 月 30-31 日. ラフレさいたま (埼玉県・さいたま市)

安井 正佐也, 時實 恭平, 校條 由紀, 木山 博資. 慢性複合ストレスによる脊髄ミクログリアの活性化と病的疼痛. 日本解剖学会中部支部学術集会. 2014 年 10 月 1-12 日. 金沢大学 (石川県・金沢市)

安井 正佐也, 時實 恭平, 校條 由紀, 植田 麻莉, 木山 博資. ラット複合ストレスモデルにみられる病的疼痛に関与する後根神経節ニューロンの解析. 日本疲労学会. 2014 年 5 月 30-31 日. コングレコンベンションセンター (大阪府・大阪市)

安井 正佐也, 時實 恭平, 竹内 想, 木山 博資. ラット複合ストレスモデルにみられる病的疼痛は脊髄ミクログリアの活性化を介する. 日本疲労学会. 2013 年 6 月 7-8 日. 秋田県総合保険センター (秋田県・秋田市)

〔その他〕

ホームページ等

科学技術振興機構(JST)

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20140523-2/>

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

安井 正佐也 (YASUI, Masaya)

名古屋大学・全学技術センター (医学)・  
技術専門職員

研究者番号：10723695

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

木山 博資 (KIYAMA, Hiroshi)

水村 和枝 (MIZUMURA, Kazue)

時實 恭平 (TOKIZANE, Kyohei)

校條 由紀 (MENJO, Yuki)

吉村 崇志 (YOSHIMURA, Takashi)