

令和元年6月14日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08677

研究課題名(和文) 運動療法による疼痛緩和のメカニズム：エピジェネティクス修飾の網羅的解析

研究課題名(英文) Exercise-induced hypoalgesia: an analysis of epigenetic modification

研究代表者

仙波 恵美子 (Senba, Emiko)

和歌山県立医科大学・医学部・名誉教授

研究者番号：00135691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：運動療法の有効性は臨床的に明らかであり広く実施されているが、そのメカニズムは未解明である。我々は神経障害性疼痛モデルマウスを用いて、運動により末梢神経や脊髄後角におけるサイトカイン産生がエピジェネティックな制御を受けて抗炎症性に変化すること、脊髄後角のGABA産生が維持されることなどを明らかにした。さらに慢性痛患者の病態の根幹には、脳報酬系の不活化があることから、運動が脳報酬系を活性化することにより鎮痛に働くことを見出した。運動により背外側被蓋核(LDT)や視床下部のOrexinニューロンなどが活性化され、腹側被蓋野(VTA)に投射してドーパミン産生を増加させることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性痛は急性痛とは異なり、中枢神経系のネットワークの変化が基盤にあることから、薬物治療には抵抗性である。運動療法の有効性についてはevidenceが高く、慢性痛のガイドラインでも強く推奨され、薬物に頼らない患者主動型医療が注目されている。この方向性をさらに推進するためには、運動療法による鎮痛の科学的根拠を明らかにすることが重要である。我々は様々な角度からそのメカニズムの解明を行い、慢性痛の治療に革新をもたらした。

研究成果の概要(英文)：Exercise therapy is now being applied to chronic pain patients and strongly recommended as the first-choice non-pharmacological therapy for chronic pain, although the precise mechanisms how exercise elicit hypoalgesic effect are still obscure. We have previously shown that epigenetic regulation of cytokine synthesis in the spinal dorsal horn and maintained GABA synthesis play critical roles in exercise-induced hypoalgesia (EIH) by using treadmill-running in neuropathic pain model mice. We further demonstrated that voluntary exercise, a strong reward for animals, also induced EIH, which may be due in part to the activation of dopamine neurons in the ventral tegmental area (VTA). We showed that exercise activates neurons in the laterodorsal tegmental nucleus (LDT) and Orexin neurons in the lateral hypothalamus. These neurons were shown to project to the VTA and activate dopamine neurons. These findings corresponds to the decreased activity of brain reward system in chronic pain patients.

研究分野：神経解剖学、疼痛学

キーワード：運動療法 鎮痛 脊髄後角 ミクログリア GABA エピジェネティクス 脳報酬系 ドーパミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みの慢性化に脳の扁桃核や側坐核(NAc)を含む情動回路mesolimbic systemの機能不全が関与することはよく知られている。慢性痛の治療として、初期から運動療法、認知行動療法などを行い、患者のライフスタイルを変える取り組みが有効とされている。しかし、なぜそれが有効なのかという科学的根拠が明らかにされていない。

最近、痛みが慢性化するメカニズムにDNAのメチル化やヒストンのアセチル化などによる遺伝子発現の後生的修飾(エピジェネティクス)が重要な役割を演じていることが注目されている。我々はマウスで神経障害性疼痛(NPP)モデルを作製し、脊髄後角のミクログリアにおいてヒストン脱アセチル化酵素(HDAC1)が増加し、逆にヒストンアセチル化酵素(HAT)の1種であるCBPは減少することを見出し、さらに興味深いことに、手術後2日目から5日間軽度~中等度のトレッドミル走を負荷すると疼痛行動が軽減する(exercise-induced hypoalgesia: EIH)と同時に、ミクログリアnoHDAC1が減少し逆にCBPは増加し、さらにミクログリアでヒストンH3K9のアセチル化が促進していることを明らかにした。

分担研究者の成田らは、脳報酬系における変化について検討しており、NAcにおいて疼痛の慢性化とともに、miR-200b/429が減少し、その標的であるドーパミン(DA)の遊離が減少するとともに、DNAメチル化酵素の一つ、DNMT3aのmRNAが増加することで様々な遺伝子のエピジェネティクス修飾が引き起こされて、NAcの活動性が持続的に低下することを明らかにしている(Imai et al., JN 31:15294, 2011)。NAcは慢性痛時その機能が低下するが、その活性化により鎮痛が起きるのではないかと考え、成田らは、NAcに投射する腹側被蓋野(VTA)のDAニューロンをDREADD法により抑制するとEIHが起らないことを明らかにし、我々はNPPにより抑制されているVTAのDAニューロンが自発運動により活性化されることを見出した。EIHの効果には、脊髄後角および側坐核を含む脳報酬系におけるエピジェネティクス修飾が関与することは明らかであり、その詳細を検討することは、EIHを生み出すメカニズムの解明に貢献する重要な取り組みとなる。

2. 研究の目的

運動療法は薬物に拠らない疼痛緩和の方法として確立されつつあるが、そのメカニズムは不明である。我々はNPPマウスを用いて脊髄後角や脳報酬系で、エピジェネティクス修飾が疼痛の慢性化に働き、さらに走運動により痛覚過敏が軽減するとともに、上記のエピジェネティクス修飾が抑制されることを見出した。本研究では、疼痛下ならびに運動療法によるこれらの領域での遺伝子発現変化と、その発現調節に関わるエピジェネティクス修飾機構を解明するとともに、走運動が脳報酬系を活性化して鎮痛を起こす神経メカニズムの解明にも取り組む。本研究の推進により、疼痛の難治化に至る前に、早期より運動療法を行うことの科学的根拠を明らかにできれば、患者のQOLの低下を防ぎ、医療費の削減とともに患者の社会復帰による経済的効果も期待される。

3. 研究の方法

本研究は「実験1:トレッドミル走による脊髄後角でのエピジェネティクス修飾の変化」と「実験2:自発運動(voluntary wheel running: VWR)による脳報酬系の変化」について検討した。

(1)神経障害性疼痛モデルマウスの作製:実験動物には10週齢雄C57BL/6Jマウスを用い、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。本研究は和歌山県立医科大学動物実験委員会の承認(No.642, No.910)を得て行われた。

(2)実験1と実験2における実験群と運動方法:実験1の実験群には、1)Naive群、2)Sham-Sedentary群、3)Sham-Runner群、4)PSL-Sedentary群、5)PSL-Runner群を設けた。Naive

以外の4群のマウスは、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。1週目は7m/minの走速度で10分間の走運動を5日間実施し、2週目は1日目20分間から1日毎に10分ずつ時間を増やし、最大60分間の走運動を行わせた。PSL/Sham手術後2日目からRunner群は、7m/minの走速度で60分間の走運動を5日間行った。

実験2の実験群には、1)Naive-Sedentary、2)Naive-Runner、3)Sham-Sedentary、4)Sham-Runner、5)PSL-Sedentary、6)PSL-Runnerを設けた。Runnerマウスは無線式回転盤を設置したケージで、Sedentaryマウスは不動化した回転盤を設置したケージでPSL/Sham手術の前後15日間飼育した。Runnerマウスの走行距離(m/day)は無線でPCに収集した回転盤の回転数から算出した。

(3)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、足底熱刺激測定装置(Ugo-Basile 社製#37370)により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。

(4)免疫染色と免疫陽性細胞の定量化：実験1で使用した1次抗体は、HDAC1、CBP、H3K9、NeuN、CD11b、GFAPに対する抗体である。実験2に用いた1次抗体は、NeuN抗体、リン酸化 cyclic AMP response element-binding protein (pCREB)抗体、Tyrosine Hydroxylase (TH) 抗体である。

実験1と実験2ともに下記の手順に従って免疫組織染色を行った。マウスは4% paraformaldehyde-0.1M PBS を用いて灌流固定した後、脊髄(L4~L5)あるいは腹側被蓋野外側部(latVTA)を含む脳領域を摘出して凍結。脊髄および脳切片はブロッキング処理の後、1次抗体に4℃で48時間反応させた。洗浄した後、2次抗体溶液にて4℃で一晩反応させた。

(5)免疫陽性細胞の定量方法：脊髄後角表層部のHDAC1陽性CD11b陽性およびH3K9陽性CD11b陽性ミクログリア数ならびにlatVTAにおけるpCREB陽性細胞数とpCREB陽性/TH陽性細胞数の測定は、Clarkらの方法を改良して行ない、免疫蛍光強度の定量にはImage J 1.48vを用いた。

(6)逆行性蛍光トレーサー法：実験2において、VTAに投射するニューロンの同定には、VTAにRetroBeads Redを微量注入し、LDTと視床下部で逆行性に標識されるニューロンを同定した。

(7)統計：各データは平均値±標準誤差で示した。逃避反応閾値および潜時の実験群間における比較は、繰り返しのある二元配置分散分析による検定後、Bonferroni法により行い、免疫陽性細胞数および免疫蛍光強度の実験群間における比較は、一元配置分散分析による検定後、Bonferroni法により実施した。統計学的有意水準は $p<0.05$ とした。

4. 研究成果

(1)実験1

走運動による疼痛行動の変化：PSL手術は、von FreyテストとPlantarテストの逃避反応閾値および潜時を有意に低下させ、PSL-Sedentaryにおける逃避反応閾値および潜時は実験期間を通して低値を維持した。一方、PSL-Runnerにおけるvon Freyテストの逃避反応閾値はPSL-Sedentaryと比較して、PSL後5、6日目で有意に上昇した。一方、Plantarテストの逃避反応潜時には有意差は認められなかったが、PSL-Sedentaryと比較して延長する傾向を示した。

走運動による脊髄後角ミクログリアでのエピジェネティクス修飾の変化：PSL手術は脊髄後角表層においてHDAC1陽性/CD11b陽性ミクログリア数を増加させたが、その数はトレッドミル走により有意に減少すること、さらに脊髄後角表層においてアセチル化ヒストンH3K9を発現するミクログリア数はトレッドミル走により顕著に増加することを示した⁵⁾。ヒストン・アセチル化は標的遺伝子の転写を促進するので、これらの結果はトレッドミル走が脊髄後角ミクログリアでのヒストン・アセチル化を高め、これはおそらく抗炎症性サイトカイン(例えばIL-10)の転写活性化を促すことでEIHに關与する可能性を示唆している。

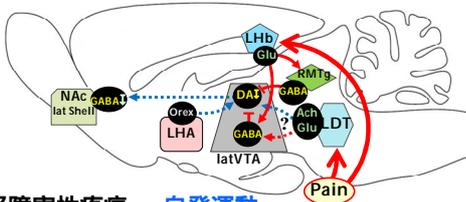
(2)実験 2

VWRによる疼痛行動の変化：VWRが疼痛行動に及ぼす影響について検討した。PSL手術後1日目には、逃避反応閾値と逃避反応潜時が劇的に低下し、さらにPSL-Sedentaryにおける逃避反応閾値と潜時は実験期間を通して低値を維持した。一方、PSL-Runnerにおける逃避反応閾値と潜時はPSL-Sedentaryと比較して、PSL後5日目から15日目まで有意に上昇した。PSL手術後のVWRの走行距離が疼痛行動に及ぼす影響について検討したところ、PSL-RunnerのPSL手術後15日間の総走行距離と逃避反応閾値($R=0.988, p<0.01$)および逃避反応潜時($R=0.978, p<0.01$)との間には、それぞれ有意な正の相関関係が認められた。

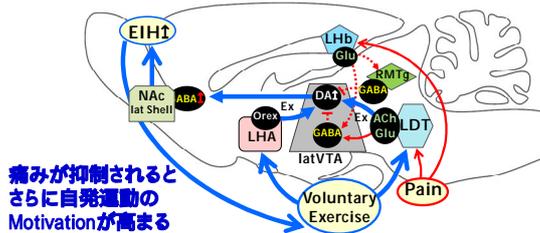
VWRがTH産生に及ぼす影響：Naive、Sham、PSL-RunnerのlatVTAにおけるTH免疫染色強度は、両側ともにそれぞれのSedentary群と比較して有意に増加した。一方、PSL-SedentaryのcontraにおけるTH免疫染色強度は、他と比較して有意に減少した($p<0.01$)。これらの結果は、PSL手術はcontraのlatVTAにおけるTH産生を低下させるが、その減少はVWRにより抑制されることを示している。

VWRがpCREB陽性/TH陽性ニューロンに及ぼす影響：Sham-SedentaryおよびPSL-SedentaryのlatVTAのTH陽性ニューロンにおける弱いpCREB免疫反応は、VWRにより劇的に増強した。

A. 神経障害性疼痛 + 不活動



B. 神経障害性疼痛 + 自発運動



PSL-RunnerにおけるPSL手術後15日目の疼痛行動とpCREB陽性/TH陽性ニューロン数との関係をみたところ、PSL-RunnerのcontraにおけるpCREB陽性/TH陽性ニューロン数と、逃避反応閾値($R=0.885, p<0.05$)および逃避反応潜時($R=0.932, p<0.05$)の間には、それぞれ有意な正の相関関係が認められた。これらの結果は、運動療法あるいは日常生活での活動量の増加が、VTAでのDA産生を増やし、Nacが活性化して鎮痛に働くことを示しており、慢性痛治療における運動療法の有効性を示している。さらにVWRは、VTAに投射

する背外側被蓋核(laterodorsal tegmental nucleus: LDT)のコリン作動性と非コリン作動性ニューロンや視床下部外側部のOrexinニューロンを活性化した。これらの結果から、NPP時にはVTA外側部のDAニューロンが抑制され、続いてNac shell外側部のGABAニューロンも抑制されることにより痛みの増悪と慢性化が起こるが、NPP下でもVWRを行うことで、LDTのコリン作動性ニューロンや視床下部外側部のOrexinニューロンが活性化され、これらがVTA外側部のDAニューロンを活性化し、続いてNac shell外側部のGABAニューロンが活性化されることにより、EIH効果が出現すると考えられる²⁰⁾。本研究により明らかとなったEIHのメカニズムを上図に示す。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 25 件)

- 1) 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關与する」. Pain Research (日本疼痛学会誌) 30 卷3号 :135-147, 2015年8月10日 (査読有) ISSN 0915-8588
- 2) 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

痛の緩和に關与する」日本運動器疼痛学会誌 7巻1号:15-26, 2015年(査読有)ISSN 2186-2796

3) 上 勝也, 田口 聖, 田島文博, 仙波恵美子「神経障害性疼痛モデルマウスの Exercise-induced hypoalgesia に対する強制運動と自発運動の効果とそのメカニズム」Pain Research(日本疼痛学会誌), 30巻第4号, p216-229, 2015年12月10日(査読有)ISSN 0915-8588

4) Senba E. A key to dissect the triad of insomnia, chronic pain, and depression. *Neurosci Lett.* 2015 Mar 4;589:197-9. doi: 10.1016/j.neulet.2015.01.012. (査読有)

5) Kami K, Taguchi S, Tajima F, Senba E. Histone Acetylation in Microglia Contributes to Exercise-Induced Hypoalgesia in Neuropathic Pain Model Mice. *J Pain.* 2016 May;17(5):588-99. doi: 10.1016/j.jpain.2016.01.471. (査読有)

6) Kami K, Taguchi S, Tajima F, Senba E. Improvements in impaired GABA and GAD65/67 production in the spinal dorsal horn contribute to exercise-induced hypoalgesia in a mouse model of neuropathic pain. *Mol Pain.* 2016 Mar 7;12. pii:1744806916629059. doi: 10.1177/1744806916629059. (査読有)

7) Kami K, Tajima F, Senba E. Exercise-induced hypoalgesia: potential mechanisms in animal models of neuropathic pain. *Anat Sci Int.* 2017 Jan;92(1):79-90. Epub 2016 Aug 2. Review. DOI 10.1007/s12565-016-0360-z (査読有)

8) Wakaizumi K, Kondo T, Hamada Y, Narita M, Kawabe R, Narita H, Watanabe M, Kato S, Senba E, Kobayashi K, Kuzumaki N, Yamanaka A, Morisaki H, Narita M. Involvement of mesolimbic dopaminergic network in neuropathic pain relief by treadmill exercise: A study for specific neural control with Gi-DREADD in mice. *Mol Pain.* 2016 Dec 1;12. pii: 1744806916681567. DOI: 10.1177/1744806916681567 Print 2016. PubMed PMID:27909152;

9) 仙波恵美子:線維筋痛症の痛みはどうして起こるのか.シンポジウム/線維筋痛症の心身相関と全人的理解.心身医学 56(5):419-426, 2016 ISSN

10) 仙波恵美子:生物心理社会モデルに基づく慢性痛の理解---脳報酬系に注目して.シンポジウム『生物心理社会モデルに基いた痛みに対する科学的アプローチ』.日本運動器疼痛学会誌 8:168-177, 2016(査読有)ISSN 2186-2796

11) 仙波恵美子:腰痛が慢性化する脳メカニズム:脳報酬系の役割.特集/慢性腰痛の診断と治療 Update, *Bone Joint Nerve* 6(4):687-693. 2016.10 ISSN 2186-1110

12) 上 勝也, 田口 聖, 田島文博, 仙波恵美子「自発的走運動による腹側被蓋野ドーパミン作動性ニューロンでの cyclic AMP-response element-binding protein の活性化は神経障害性疼痛モデルマウスの Exercise-induced hypoalgesia に關与する」Pain Research(日本疼痛学会誌), 31巻第4号, p238-251, 2016年12月26日(査読有)ISSN 0915-8588

13) 上 勝也, 田島文博, 仙波恵美子「運動療法の鎮痛メカニズム」ペインクリニック 38(5): 571-579, 2017.5 ISSN 0388-4171

14) Kami K, Tajima F, Senba E: Exercise-induced hypoalgesia.-Potential mechanisms in animal models of neuropathic pain-. *Anatomical Science International* 92: 72-90. 2017. (査読有) DOI 10.1007/s12565-016-0360-z

15) Senba E, Kami K: A new aspect of chronic pain as a lifestyle-related disease. *Neurobiology of Pain* 1: 6-15, 2017.(査読有)

16) 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子:運動療法の鎮痛メカニズム.ペインクリニック 38: 571-579. 2017. ISSN 0388-4171

17) 仙波恵美子, 川西誠, 田島文博, 上勝也:慢性痛に対する運動療法の効果:脳報酬系の

役割. 日本運動器疼痛学会誌 9 (2) : 198-209、2017. (査読有) ISSN 2186-2796

18) 上勝也, 田島文博, 仙波恵美子: 運動療法の鎮痛メカニズム. ペインクリニック 38: 571-579. 2017. ISSN 0388-4171

19) 仙波恵美子, 川西誠, 田島文博, 上勝也: 慢性痛に対する運動療法の効果: 脳報酬系の役割. 日本運動器疼痛学会誌 9 (2) : 198-209、2017. (査読有) ISSN 2186-2796

20) Kami K, Tajima F, Senba E. Activation of mesolimbic reward system via laterodorsal tegmental nucleus and hypothalamus in exercise-induced hypoalgesia. Sci Rep. 2018 Aug 1;8(1):11540. doi: 10.1038/s41598-018-29915-4. PubMed PMID: 30069057 (査読有)

21) 仙波恵美子: 慢性痛に対し患者主動型治療が奏効する脳メカニズム (試論). 大阪行岡医療大学紀要 5:7-18, 2018. ISSN 2188-4935

22) 仙波恵美子: 慢性痛に対し患者主動型治療が奏効する脳メカニズム: Mesocortico-limbic system とは? ペインクリニック 39:S9-S23, 2018. ISSN 0388-4171

23) 上 勝也, 田島文博, 仙波恵美子: 運動による鎮痛(Exercise-induced hypoalgesia)のメカニズム: 最近の知見. ペインクリニック 39:S42-S50, 2018 ペインクリニック 39(8):981-989, 2018. ISSN 0388-4171

24) 仙波恵美子: 運動による鎮痛(exercise-induced hypoalgesia)と側坐核. Clinical Neuroscience 36(12):1457-1460, 2018. ISSN 0289-0585

25) 藤田信子, 仙波恵美子: 線維筋痛症の運動療法 - その効果と奏功メカニズム - . 日本臨床 76(11):2023-2029, 2018. ISSN 0047-1852

[学会発表](計 35 件) ---省略---

[図書](計 2 件)

1) 仙波恵美子: 第4章 痛みと脳「痛みの集学的診療: 痛みの教育コアカリキュラム」真興交易(株) p.43-52, 2016.10 ISBN978-4-88003-910-7

2) 仙波恵美子「慢性疼痛に対する脳科学的アプローチ-----生物心理社会モデルとは?」P.11-29 日本は慢性疼痛にどう挑戦していくのか(野口光一、柴田政彦、福井聖 監修)

2017. 11.25 発行 (株)薬事日報社 東京

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 上 勝也

ローマ字氏名: Kami Katsuya

所属研究機関名: 和歌山県立医科大学

部局名: 医学部リハビリテーション医学

職名: 特別研究員

研究者番号(8桁): 20204612

研究分担者氏名: 成田 年

ローマ字氏名: Narita Minoru

所属研究機関名: 星薬科大学

部局名: 薬理学

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40318613