

平成 30 年 5 月 25 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10560

研究課題名(和文) 神経障害性痛における海馬BDNFの役割と治療応用への基礎的研究

研究課題名(英文) The role and therapeutic targeting of hippocampal BDNF in neuropathic pain

研究代表者

横山 正尚 (Yokoyama, Masataka)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：20158380

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)：慢性痛の有病率は年齢と共に高くなる。しかし、加齢に関連する痛みの慢性化機序は不明で、エビデンスの高い治療法は存在しない。本研究課題では、加齢に関連する痛みの慢性化機序における脳由来神経栄養因子(BDNF)の役割について検討し、1) 高齢ラット神経障害性痛モデルを確立したこと、2) 高齢ラットは若年ラットと比較して神経障害性痛の程度が増加すること、3) 加齢による痛みの慢性化機序に海馬BDNF濃度の低下が関与すること、4) 外因性BDNFの経鼻投与により加齢による痛覚過敏反応を抑制できること、を明らかにした。今後、BDNFを標的とした安全で有効な新規治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Especially in the elderly, chronic pain is a major public-health burden because of its high prevalence and debilitating nature. Currently, however, several types of chronic pain, e.g., neuropathic pain, are still difficult to treat. In this project, we compared the pain sensitivity and BDNF levels after painful nerve injury between adult and aged rats. Furthermore, we examined the therapeutic potential of exogenous BDNF. Our findings demonstrated that aged rats were more susceptible to the development of sensitized pain behaviors than adult animals. Especially, the brain-region-specific reduction in hippocampal BDNF was significantly correlated with the neuropathic pain behaviors. The intra-nasal administration of BDNF produced significant anti-hyperalgesic effects in aged neuropathic animals. No adverse behavioral effects were observed. These findings imply that hippocampal BDNF may represent a novel modifiable pathogenic factor and therapeutic target for chronic pain.

研究分野：麻酔科学

キーワード：脳由来神経栄養因子 神経障害性痛 慢性痛 加齢

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性痛は、難治性慢性痛の主要な原因で、生活の質を低下させ、就労問題や社会的損失も大きい。これまでに多くの新規治療薬の候補が検討されてきたが、未だ有効な治療方法が見出せていない。その原因の一つとして、神経障害性痛の病態が、痛覚伝導系の異常に留まらず、精神・心理的側面にまで及び複雑系であることが挙げられる。その中でも、神経障害性痛の痛覚伝導機序と比較して、精神・心理的側面に対する研究は緒に就いたばかりと言える。

脳由来神経栄養因子 (BDNF) の増加は、末梢、脊髄後角、脳幹レベルで侵害シグナルを増強することで神経障害性痛の発症・維持に重要な役割を担う。しかし、BDNF は、末梢神経、脊髄、脳に対する種々の障害、ストレスに対して発現を増加させ、神経細胞の生存維持、神経突起の伸長促進、神経伝達物質の合成促進等の代償機構に重要な役割を果たす。つまり、BDNF シグナルの抑制は正常な神経活動を抑制し、重大な副作用を生じ得るというジレンマがある。

BDNF は、海馬でも興奮性作用も示されていることから、海馬の侵害シグナルへの関与が推測される。しかし、神経障害性痛モデルで海馬 BDNF 蛋白量を検討した我々の予備実験では、海馬 BDNF 濃度と痛覚過敏様行動に有意な逆相関関係が認められた。BDNF は海馬でのシナプス伝達の可塑性発現に関与し、学習や記憶の形成に関わる。また、海馬 BDNF の低下は、うつ病と関連することが知られている。これらの現象は、海馬 BDNF のダウンレギュレーションが神経障害性痛の病態機序に関連すると同時に、併発する抑うつ、認知機能障害に関与することが推測される。また、海馬は BDNF が最も豊富に存在する部位で、血液中に僅かに検出される BDNF 濃度は海馬 BDNF 濃度と相関することが知られている。さらに、海馬への効率的かつ選択的な BDNF 伝達法として、鼻と脳とのつながりに着目した鼻粘膜経路の有用性の可能性も考えられる。つまり、神経障害痛発症時の海馬 BDNF の変調機構を詳らかにすることにより、慢性痛の客観的なバイオマーカーの開発や患者の QOL 改善に直結する新規治療法への応用が期待される。

## 2. 研究の目的

神経障害性痛は、難治性慢性痛の原因となるだけでなく、多くは抑うつ、認知障害など精神機能障害を伴う。これらの症候は、患者 QOL を低下させるが、その機序および対処法は確立されていない。脳由来神経栄養因子 (BDNF) は、末梢-脊髄レベルにおいて神経障害時の痛覚異常に関連することが知られている。一方、海馬における BDNF は、抑うつの発症、認知機能に重要であるが、神経障害

性痛での役割はほとんど調べられていない。本研究では、神経障害性痛の病態機序における海馬 BDNF 機能変化・役割を明らかとすることにより、海馬 BDNF を標的とした新しい神経障害性痛の治療法の可能性を検討することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 高齢ラットを用いた神経障害性痛モデルの確立

すべての研究において、雄性 SD 系ラット (成獣 2-4 カ月齢、高齢 19-24 カ月齢) を対象とした。神経障害性痛モデルは、右側 L5-6 脊髄神経を 6-0 絹糸で結紮・切断することにより作製する脊髄神経切断 (SNL) モデルを用いた。SNL モデルは若年・成獣ラットではその手技が確立しているが、高齢ラットでの方法はこれまでに調べられていなかった。今回、傍脊椎骨解剖の加齢性変化に応じた方法を考案した。イソフルラン深麻酔下に断頭し、第 2 腰椎レベル以下の傍脊髄領域の解剖学的特徴を記録した。ラットを SNL 手術の手技によって、1) 従来群: 第 6 腰椎横突起を切断後に第 5 腰髄神経を結紮・切断、と 2) 高齢ラット変法群: 横突起の切断を行わず第 5-6 腰椎横突起間の筋膜下で第 5 腰髄神経を結紮・切断、とに分類した。若年ラットにおいて SNL 手術の十分なトレーニングを受けた同一の研究者がすべての手術を行った。

### (2) 神経障害性痛の加齢性変化

SNL 手術後の痛みの程度を、成獣ラット群と高齢ラット群で比較することにより、神経障害性痛の加齢性変化を検討した。痛みの評価は、von Frey 試験の逃避行動閾値および pin 試験の痛覚過敏様行動の発生頻度を用いて、それぞれアロディニアおよび痛覚過敏の程度を検討した。

### (3) 神経障害性痛モデルラットにおける脳内 BDNF 変化の同定

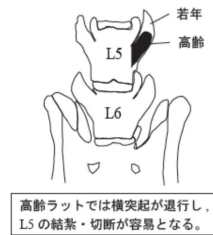
神経障害性痛の病態機序における脳内 BDNF の関与を明らかとするために、SNL 手術 2, 5, 7, 14 日後に脳の各部位を摘出し、BDNF の発現変化を ELISA 法で測定し、正常群と比較した。

### (4) 海馬 BDNF を標的とした慢性痛治療の可能性の検討

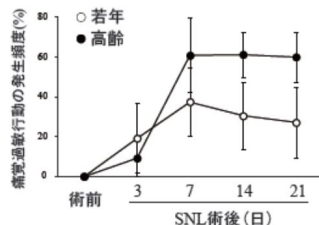
海馬 BDNF シグナル刺激が慢性痛の治療になり得ることを検討した。ただし、海馬以外の痛覚伝導系では BDNF は疼痛反応を誘発することが想定される。今回我々は、BDNF を選択的に海馬に伝達する方法として、外因性 BDNF の経鼻投与を検討した。これまでも経鼻投与により様々な物質が中枢神経系 (嗅神経経由) に効率的に移行するという報告があり、BDNF もその可能性を示唆する報告がある。成獣および高齢神経障害性痛モデルラットで BDNF 経鼻投与の鎮痛効果を評価した。

#### 4. 研究成果

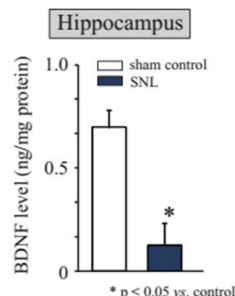
(1) 高齢ラット神経障害性痛: 一般に若年ラットでは第4, 5 腰髄神経を第6 腰椎横突起下に認めるのに対して, 今回検討したすべての高齢ラットでは, 第5-6 腰椎横突起間の筋膜下に位置していた。このことから, このレベルの筋膜下で第5 腰髄神経を処理することで, 横突起の処理が不要となり, 手技の難易度も改善されることが予想された。従来群では, 10 例中2 例で第4, 5 腰髄神経の同定が困難で第4 神経損傷に伴う下肢麻痺が生じたが, 高齢変法群ではすべてのラットで第4, 5 腰髄神経を第5 第6 横突起間の筋膜下に確認でき, 第4 腰髄神経損傷に伴う下肢麻痺は生じなかった。従来群および高齢ラット変法群ともに手術成功例では, 手術側での疼痛閾値の低下が同程度に生じた。脊髄神経解剖の加齢性変化に合わせたSNLモデル変法は, 高齢ラットに適しており, 神経障害性痛の加齢変化について基礎研究に応用できると考えられる。



(2) 神経障害性痛の加齢性変化: 今回, von Frey 試験による疼痛閾値 (アロデニア) は年齢群間で有意さは生じなかった。一方, Pin 試験による痛覚過敏様行動は若年群と比較して高齢群で有意に増加した (下図)。このことは, 神経障害後に生じる慢性痛への移行は若年動物より高齢動物で多いことを示唆する。

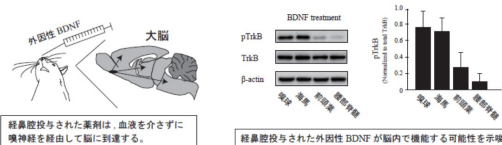
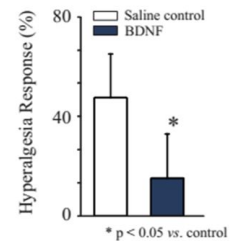


(3) 脳内BDNF変化: SNL手術後の脳内 (前帯状回, 前頭前野, 視床, 小脳, 海馬, 扁桃体) BDNF濃度を対照群と比較した。その結果, 高齢SNLラットにおいては, すべての脳部位においてBDNF濃度の低下が生じていた。特に, 海馬でのBDNF濃度低下が最も顕著であった (右図)。さらに, 海馬のBDNF濃度は痛覚過敏様行動の発生頻度と有意な逆相関関係が示された。その他の部位では, 統計学的に有意な相関関係はなかった。一方, 若年ラットにおいては, SNL手術による脳内BDNF濃度の変化は生じなかった。追加の電気生理実験



では, SNL手術後の一次知覚ニューロンの興奮性は, 若年ラットと高齢ラット間で差はなかった。これらの結果は, 高齢ラットにおける慢性痛発生の増加は, 痛みの末梢性機序というよりむしろ中枢性機序を介すると考えられた。

(4) 経鼻BDNF投与の鎮痛効果: SNL手術7日目, 生食水経鼻投与群 (対照群) とBDNF (50 μg/日) 経鼻投与群 (BDNF群) に振り分け, それぞれ1週間連日投与した。痛覚過敏様行動の発現頻度は, SNL手術7日目 (基準値) は2群間で差はなかったが, 14日目では, BDNF群は対照群と比較して有意に減少した (右図)。海馬のリン酸化TrkBの発現量は, 対照群と比較して, BDNF群で有意に多かった。経鼻投与されたBDNFのTrkBへの作用は, 嗅球でもっとも大きく, 次に海馬, 扁桃体で反応 (リン酸化) が生じたが, 血液, 脊髄では有意な反応は認めなかった (下図)。



これまでの研究により, BDNFは障害・ストレスからの代償反応と疼痛の増強の2面性があり治療応用が困難と考えられていたが, 経鼻粘膜投与による低侵襲かつ部位特異的な治療応用の可能性が明らかになった。神経障害性痛とBDNFの関連性に関する研究は, 末梢神経, 脊髄後角レベルで多く報告されているが, 上位中枢での変化については十分な検討がなされてない。また, 加齢に伴う脳内BDNFの変化と認知機能および抑うつなどの精神・心理的問題の関連は高齢者慢性痛の要素とオーバーラップするが, その詳細は検討されていない。本研究結果は, これらの関連性を示唆するものであり, 高齢者の慢性痛に対する病態機序に基づく新規治療法の開発に繋がる可能性が考えられる。

#### 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 7件)

1. Tateiwa H, Kawano T, Nishigaki A, Yamanaka D, Aoyama B, Shigematsu-Locatelli M, Eguchi S, Locatelli FM, Yokoyama M. The role of hippocampal brain-derived neurotrophic factor in age-related differences in neuropathic pain

behavior in rats. Life Sci. 査読有. 2018; 197:56-66. doi: 10.1016/j.lfs.2018.01.030.

2. Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M. Effects of epigallocatechin-3-gallate on systemic inflammation-induced cognitive dysfunction in aged rats. J Anesth. 査読有. 2017; 31: 726-735. doi: 10.1007/s00540-017-2392-5.

3. Yamanaka D, Kawano T, Nishigaki A, Aoyama B, Tateiwa H, Shigematsu-Locatelli M, Locatelli FM, Yokoyama M. Preventive effects of dexmedetomidine on the development of cognitive dysfunction following systemic inflammation in aged rats. J Anesth. 査読有. 2017; 31: 25-35. doi: 10.1007/s00540-016-2264-4

4. Kawano T, Iwata H, Aoyama B, Nishigaki A, Yamanaka D, Tateiwa H, Eguchi S, Locatelli FM, Yokoyama M. The role of hippocampal insulin signaling on postoperative cognitive dysfunction in an aged rat model of abdominal surgery. Life Sci. 査読有. 2016; 162:87-94. doi: 10.1016/j.lfs.2016.08.020

5. Kawano T, Eguchi S, Iwata H, Yamanaka D, Tateiwa H, Locatelli FM, Yokoyama M. Effects and underlying mechanisms of endotoxemia on post-incisional pain in rats. Life Sci. 査読有. 2016; 148: 145-53. doi: 10.1016/j.lfs.2016.01.046.

6. Kawano T, Eguchi S, Iwata H, Yamanaka D, Tateiwa H, Locatelli FM, Yokoyama M. Pregabalin can prevent, but not treat, cognitive dysfunction following abdominal surgery in aged rats. Life Sci. 査読有. 2016; 148: 211-9. doi: 10.1016/j.lfs.2016.02.021

7. Kawano T, Eguchi S, Iwata H, Tamura T, Kumagai N, Yokoyama M. Impact of Preoperative Environmental Enrichment on Prevention of Development of Cognitive Impairment following Abdominal Surgery in a Rat Model. Anesthesiology. 2015; 123: 160-70. doi: 10.1097/ALN.0000000000000697

〔学会発表〕(計 12 件)  
(国際)

1. Yamanaka D, Kawano T, Koyama T, Locatelli FM, Iwata H, Yokoyama M. Effects of (-)-Epicatechin on Post-septic Cognitive Dysfunction in Aged Rats. ANESTHESIOLOGY® Annual Meeting 2016. 2016. 10.22. Chicago, USA

2. Koyama T, Kawano T, Iwata H, Yamanaka D, Locatelli FM, Yokoyama M. Dexmedetomidine can Prevent Cognitive Dysfunction Following Abdominal Surgery in Aged Rats. ANESTHESIOLOGY® Annual Meeting 2016. 2016. 10.25. Chicago, USA

3. Nagano S, Kawano T, Yamanaka D, Iwata H, Yokoyama M. Role of the Central Brain-derived

Neurotrophic Factor in the Hyperalgesic Behavior Induced by Painful Nerve Injury in Rats. ANESTHESIOLOGY® Annual Meeting 2016. 2016. 10.22. Chicago, USA

4. Watanabe S, Kawano T, Eguchi S, Iwata H, Yamanaka D, Locatelli FM, Kataoka H, Hatakeyama Y, Okuhara Y, Yokoyama M. Dynamic Behavior of Perioperative Uric Acid Levels for Early Prediction of Postoperative Acute Kidney Injury: A Single-center Retrospective Database Analysis. ANESTHESIOLOGY® Annual Meeting 2016. 2016. 10.25. Chicago, USA

5. Shigematsu-Locatelli M, Kawano T, Kitamura S, Yamanaka D, Tateiwa H, Iwata H, Locatelli FM, Yokoyama M. The Relationship between the Estimated Tolerable Pain before Surgery and Patient Satisfaction with Postoperative Pain Treatment. 16th World Congress of Anesthesiologists. 2016.8.28-9.2. Hong Kong

6. Locatelli F, Kawano T, Shigematsu-Locatelli M, Yamanaka D, Tateiwa H, Iwata H, Yokoyama M. A single high oral dose of Resveratrol can prevent the development of cognitive dysfunction after abdominal surgery in aged rats. 16th World Congress of Anesthesiologists. 2016.8.28-9.2. Hong Kong

(国内)

1. 青山 文, 河野 崇, 西垣 厚, 山中大樹, 立岩浩規, 横山正尚. 高齢ラットにおける運動誘発性痛み抑制効果. 第 21 回日本神経麻酔集中治療学会, 2017, 6.30-7.1, 山口

2. 西垣 厚, 青山 文, 山中大樹, 立岩浩規, 河野 崇, 横山正尚. 高齢ラット敗血症後認知機能障害モデルの確立に向けて. 第 21 回日本神経麻酔集中治療学会, 2017, 6.30-7.1, 山口

3. 青山 文, 山中大樹, 勝又祥文, ロカテリファプリシオ, 河野 崇, 横山正尚. Exercise-induced Hypoalgesia に及ぼす加齢の影響 - 高齢ラットでの検討 - 日本麻酔科学会 中国・四国支部 第 54 回学術集会. 2017. 9.2, 徳島

4. 山中大樹, 西垣 厚, 河野 崇, 青山 文, 立岩浩規, 横山正尚. デクスメトミジンのエンドキシン誘発性痛覚過敏抑制効果に及ぼす 2 アドレナリン受容体の役割-ラット皮膚切開モデルでの検討- 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会, 2017, 6.8-10, 神戸

5. 立岩浩規, 河野 崇, 青山 文, 山中大樹, 西垣 厚, 横山正尚. ラット脊髄神経解剖の加齢性変化と神経障害性痛モデルへの応用 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会, 2017, 6.8-10, 神戸

6. 青山 文, 河野 崇, 立岩浩規, 山中大樹, 西垣 厚, 横山正尚. 神経障害性痛に及ぼす加齢の影響-ラット神経障害性痛モデルでの検討- 日本麻酔科学会 第 64 回学術集会, 2017, 6.8-10, 神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0件)

○取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm\\_ansth/department/research.html](http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_ansth/department/research.html)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

横山正尚 (YOKOYAMA, Masataka)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・教授

研究者番号：20158380

### (2)研究分担者

河野 崇 (KAWANO, Takashi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部  
門・准教授

研究者番号：40380076