

令和元年6月14日現在

機関番号：33920

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08988

研究課題名(和文) 機能性身体症候群にみられる病的疼痛と疲労の発症メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of pathogenesis mechanism of pathological pain and fatigue in Functional somatic syndrome.

研究代表者

安井 正佐也 (Yasui, Masaya)

愛知医科大学・医学部・助教

研究者番号：10723695

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：慢性疲労症候群/筋痛性脳脊髄炎や線維筋痛症は過度の疲労感や痛みをはじめとした様々な症状を呈する。これら両疾患の動物モデルをそれぞれ作製して実験を行った。その結果、ストレスは抗重力筋の持続的で異常な筋緊張を誘発し、通常では意識しない固有感覚の過剰な興奮が、脊髄内の反射弓に沿ってミクログリアを活性化させた。このことが慢性的に痛みを生じさせていると考えられた。本研究による結果は、ストレスによって抗重力筋の異常な筋緊張が長期に及び、固有感覚が過剰に興奮することによって発病のトリガーとなっている可能性を示唆しており、治療の標的として筋緊張の抑制が有効であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疲労症候群/筋痛性脳脊髄炎や線維筋痛症は機能的身体症候群(FSS)に分類される。FSSでは身体の疼痛をはじめ共通の症状が見られる。発症の起因は患者によって異なるが、いずれもストレスの関与が示唆されている。本研究によって、ストレスは無意識に筋の過緊張を持続的に誘発し、固有感覚の過活動が脊髄内のミクログリアを活性化させるために慢性痛に至るといったメカニズムが示唆された。この結果より、FSSなどの患者さんの疼痛を和らげる治療には、脳や脊髄に存在するミクログリアを標的とすることが有効であると考えられると伴に、一部の筋の過緊張を解除し、固有感覚ニューロンの活動を抑制させることが必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Chronic fatigue syndrome (myalgic encephalomyelitis) and fibromyalgia cause various symptoms including excessive fatigue and pain. We conducted experiments using these animal models. As a result, as one of the causes of abnormal pain, persistent and excessive neural excitation of the usually unconscious proprioceptive sensation activates microglia along the reflex arch in the spinal cord. We clarified that this series of reactions caused chronic pain. These results suggest that stress may prolong the muscle tone of anti-gravity muscle and cause excessive neural excitation of proprioceptive sensation, which may trigger the onset. Suppression of muscle tone was considered to be effective as a therapeutic target.

研究分野：疼痛学

キーワード：慢性疲労症候群 線維筋痛症 固有感覚 ミクログリア 筋緊張 疼痛 疲労 ストレス

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

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、慢性的な極度な疲労感や疼痛などを主体とし、睡眠障害、認知障害、自律神経障害など様々な症状を呈する疾患であり、症状の共通性が多く、しばしば両疾患は併発する。その為、近年ではこれらの類似疾患(機能性胃腸症、過敏性腸症候群、心的外傷後ストレス障害など)を含めて機能性身体症候群(Functional somatic syndrome: FSS)として分類される(Wessely et al, 1999)。発症原因は身体的・精神的ストレスとされる説が有力であるが、その発症メカニズムについては未だ不明である。

これまで、CFSモデル動物(1.5cmの水を張ったケージで5日間飼育することでヒトにおける複合的なストレスを再現する目的で開発された)を用いて、)ストレス期間中の過活動化、)REM睡眠の消失、)下垂体細胞の崩壊、)胸腺の萎縮、)脳内セロトニン・ドーパミン代謝低下、という生体のホメオスタシス崩壊が生じていることが明らかになっている(Tanaka et al, 2003. Ogawa et al, 2005. Ogawa et al, 2009. Ogawa et al, 2012. Konishi et al, 2010. Konishi et al, 2011)また、本モデルで発見された血漿中の MSH の増加現象は、CFS患者においても有意に増加しており、モデルの妥当性が示唆されている(Shishioh-Ikejima et al, 2010)。近年では、CFS患者のPET検査において脳内でミクログリア/アストロサイトの活性化が確認され脳内炎症との関係が証明された(Nakatomi et al, 2014)。しかし、どのような原因で本症が発症するのか、そのメカニズムについては未だ不明である。一方、FMモデル動物は繰返し寒冷ストレス(Repeated cold stress: RCS)によって長期的な筋痛やアロディニアが誘発され(Nishiyori et al, 2008. Nasu et al, 2010)、認知障害や鬱様行動が生じる(Paz et al, 2015)。これは、CFSモデル動物で見られる症状と多くの点で類似しており、臨床における類似性を反映している。しかし、CFSモデル動物と同様にFMモデル動物についても発症メカニズムは解明されていない。これらの両疾患のモデル動物は臨床症状を再現性良く反映している点においては研究対象として非常に優れていると考えられる。

申請者はCFSモデル動物において)筋痛およびアロディニアが生じること、)血液や末梢組織に炎症や損傷所見が見られないこと、)腰髄(特にL5)後角に活性化したミクログリアが増殖し集まっていること、)ミクログリアの活性化を薬剤(ミノサイクリン)で抑制すると病的疼痛が抑制されたことを報告し、CFSで見られる原因不明の痛みは脊髄ミクログリアの活性化により生じていることを報告した(Yasui et al, 2014)。興味深いことに、異なるストレスを負荷するFMモデルにおいてもCFSモデル同様にL5腰髄後角でミクログリアが活性化していた(T Akagi et al, 2014)。このようにストレス環境の異なるFMモデルとCFSモデルにおいて、L5腰髄後角内側の限局した部位にミクログリアが活性化し疼痛発症に関与しているという共通した現象が見られる。これらのミクログリアの動態は末梢組織損傷が原因の急性炎症モデルや神経障害モデルに見られるグリア応答と異なっている。異なるストレスを負荷した2つの動物モデルにおいて、共通した現象が脊髄に生じており、ここに2つの疾患の共通症状を説明する鍵があると推測される。

2. 研究の目的

慢性疲労症候群(CFS)や線維筋痛症(FM)はADLが著しく損なわれる疾患であるが、決定的な治療法が無く病態解明が強く望まれている。いずれも複合ストレスが発症に深く関与し、極度な疲労感・病的疼痛が生じる。これまでにCFSおよびFMモデル動物において、病的疼痛の発症には脊髄後角ミクログリアの活性化が関与する事を報告した。しかし、ストレスがどのようにして脊髄のミクログリアを活性化させるかについては不明である。本研究では、CFSやFMで見られる病的疼痛と疲労感の関係に焦点をあて、ミクログリア活性化機序について解析を行い、本疾患の発症メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1)動物モデル作成

CFSモデル: 1.5cmの高さの水を入れたケージでラットを6日間飼育しモデルを作製した。

FMモデル: 日中は室温と4℃を30分毎にラットの飼育環境を変更させ、夜間は4℃で飼育し5日間繰返すことでモデルを作製した。

(2)行動学的解析

疼痛閾値の測定には、von Frey test(皮膚触覚の閾値を測定)およびRandall-Selitto test(筋の圧痛閾値を測定)を用いて解析を行った。

(3)組織学的解析

組織の解析には主に免疫組織化学染色を行った。また、逆行性神経トレーサー(Fluoro Gold)を用いてターゲットとなる筋の同定を行った。

(4)mRNA解析

末梢組織(皮膚組織、筋組織、神経組織)のmRNAの発現の変化をPCRおよびReal time PCRにて確認した。

(5)筋電図測定

テレメトリーシステムを用いて筋電図を測定し、ストレス負荷期間中の筋活動量の変化を解析した。

(6)心電図測定

テレメトリーシステムを用いて心電図を測定し、ストレス中の自律神経機能評価を周波数解析した。

(7)関節固定術

後肢筋活動を抑制する目的で、片側足関節に髄内釘固定術を施して、CFSモデルを作製した。DRGにおけるATF3発現や脊髄ミクログリア活性化について、固定側と非固定側と比較し調査した。

4. 研究成果

複合的持続ストレスを負荷するCFSモデルにおいて、ストレス負荷日数を5日から6日に増やした結果、筋の機械性痛覚過敏を示す期間が延長され、L5脊髄ミクログリア(Iba1)の活性化領域に変化が現れた。すなわち5日間のストレスを負荷した脊髄ミクログリアは、後角に活性化を示すが、6日間のストレスを負荷したモデルの脊髄ミクログリアは、後角に加え前角にも活性化を認めた。L5脊髄のミクログリアが集積した前角運動ニューロンは、NeuN(運動ニューロンのマーカー)およびATF3(神経過活動・障害マーカー)で標識されたことから、脊髄の反射弓を形成する運動ニューロンに異常をきたしている可能性が示唆された。また、逆行性神経トレーサーFluoro-Gold(FG)を後肢の各筋(ヒラメ筋、腓腹筋、前脛骨筋、長趾伸筋、浅指屈筋、短指屈筋、足底筋、虫様筋、腓骨筋)に注入し、CFSモデルを作製した。その結果、ヒラメ筋に注入して標識された前角運動ニューロンの周囲にミクログリアが集積することが明らかとなった。

CFSモデルにおいて、一部のDRGニューロンにATF3(神経過活動・障害マーカー)が発現する。本研究において、DRGにおけるATF3の発現は、ミクログリアが活性化する髄節と同じL5に最も多いことが明らかとなった。また、ATF3を発現したDRGニューロンの約6割がTrkC(固有感覚ニューロンマーカー)免疫反応陽性を示した。さらに、ストレス負荷後に十分な安静期間を与えると、DRGのATF3は消失した。このことから、固有感覚ニューロンの過活動がATF3発現を誘導した可能性が示唆された。疼痛モデル動物の代表とされる神経因性疼痛モデルや炎症性疼痛モデルにおいて、侵害受容ニューロンや触圧覚ニューロンが疼痛の増悪に関与する報告は多数見られるが、固有感覚ニューロンが関与する報告はない。複合的持続ストレスにより誘発される疼痛は、他の疼痛モデルとは疼痛誘発に関与するニューロンが異なる点において重要な知見であると考えられた。

繰返し寒冷ストレスを負荷するFMモデルにおいて、脊髄ミクログリア活性化領域は、6日間の負荷を行ったCFSモデルと同じ領域(後角と前角)に認められた。FMモデルの一部のDRGニューロンは、CFSモデルと同様にATF3が発現した。CFSモデルのL5DRGにおけるATF3の発現率は6.6%であったのに対して、FMモデルは5.3%であった。また、FMモデルのATF3陽性DRGニューロンは、TrkC(固有感覚ニューロン)に発現する割合が4割であった。

DRGにおける交感神経線維の局在変化を、CFSモデルを用いて検討した。その結果、CFSモデルのDRG末梢側の神経細胞体領域にTH(交感神経マーカー)線維の増加と、神経細胞体近傍へのTH線維の侵入(神経発芽)が観察された。さらにDRGを採取しReal-time PCRを行った結果では、神経栄養因子であるBDNFとNT-3のmRNA発現の増加が確認された。しかし、DRGにおける交感神経線維の発芽がストレスによって生じる疼痛に関与するかについては不明であり、今後の検討課題である。

抗重力筋であるヒラメ筋の筋電図を、テレメトリーシステムを用いてストレス負荷前からストレス期間中を測定した。その結果、ストレス負荷前に比べてストレス期間中は、昼夜問わず筋活動量の持続的な亢進を認めた。さらにヒラメ筋の筋活動を抑制する目的で、片側足関節に髄内釘固定術を施して、CFSモデルを作製した。その結果、固定側の脊髄後角ミクログリア活性化が有意に抑制された。また、DRGにおけるATF3発現も、固定側が有意に抑制された。さらに、固定側の筋の圧痛閾値は、非固定側に比べて有意に上昇を認め、疼痛が減弱した。このことから、ストレスによって生じた抗重力筋の異常な活動が、固有感覚ニューロンの持続的な過剰興奮を惹起し、ATF3発現やミクログリア活性化を誘導した可能性が示唆された。

CFSモデルにおいてテレメトリーシステムを用いて自律神経機能検査を行った。その結果、交感神経と副交感神経の両方の活動を反映するLFパワー値はストレス負荷4日目以降で低下し、副交感神経の活動を反映するHFパワー値はストレス期間中低下した。交感神経の活性度の指標となるLF/HFはストレス3日まで高値、4日以降は低値を示した。以上のことからストレス期間中の交感神経は、3日目までは過活動であり、4日目以降は活動が低下することが示唆された。

以上の一連の解析によって、ストレスは抗重力筋の持続的で異常な筋緊張を引き起こし、固有感覚ニューロンの過活動を生じさせることが明らかとなった。固有感覚ニューロンの過活動は、反射弓を形成する脊髄内の領域に沿ってミクログリアを活性化し病的疼痛を生じさせたと考えられた。本研究結果より、FFSなどの患者さんの疼痛を和らげる治療には、脳や脊髄に存在するミクログリアを標的とすることが有効であると考えられると伴に、一部の筋の過緊張を解除し、固有感覚ニューロンの活動を抑制させることが重要であると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

(1) Yasui M, Menjyo Y, Tokizane K, Shiozawa A, Tsuda M, Inoue K, Kiyama H.

Hyperactivation of proprioceptors induces microglia-mediated long-lasting pain in a rat model of chronic fatigue syndrome.

J Neuroinflammation. 査読有り, 2019 30;16(1):67. doi: 10.1186/s12974-019-1456-x.

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) 安井正佐也, 校條由紀, 内藤宗和, 中野隆, 木山博資. ストレス誘発性疼痛における脊髄ミクログリア活性化機序の解析. 日本解剖学会第 76 回中部支部学術集会. 2016.

(2) 安井正佐也, 校條由紀, 内藤宗和, 中野隆, 木山博資. 複合的持続ストレスモデルラットにおける脊髄ミクログリア活性化機序の解析. 第 122 回日本解剖学会・全国学術集会. 2017.

(3) 歌 大介, 若月 康次, 坪島 功幸, 安井 正佐也, 木山 博資, 西条 寿夫, 水村 和 枝, 田口 徹. 慢性疲労症候群モデルラットにおける脊髄侵害感作 慢性疲労症候群モデルラットにおける脊髄侵害感作 慢性疲労症候群モデルラットにおける脊髄侵害感作. 第 95 回日本生理学会. 2018.

〔その他〕

ホームページ

名古屋大学医学部 HP よりプレスリリース

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_J/research/pdf/Jou_Neu_20190422.pdf

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 大道 裕介

ローマ字氏名: Ohmichi Yusuke

所属研究機関名: 愛知医科大学

部局名: 医学部

職名: 講師

研究者番号 (8 桁): 50506673

研究分担者氏名: 大道 美香

ローマ字氏名: Ohmichi Mika

所属研究機関名: 愛知医科大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 30581079

(2) 研究協力者

研究協力者氏名: 校條 由紀

ローマ字氏名: Menjo Yuki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。