

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11535

研究課題名（和文）術後遷延性疼痛における脳内マクロファージの役割の解明

研究課題名（英文）The study of the interaction between the macrophages and the brain under the chronic postsurgical pain condition

研究代表者

中井 國博（Nakai, Kunihiro）

福井大学・学術研究院医学系部門（附属病院部）・准教授

研究者番号：80362705

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：超常磁性酸化鉄投与によるMRIにおいて、術後遷延性疼痛マウスモデルおよびリボポリサッカライド投与マウスモデルで、脳内へのマクロファージ迷入の変化は明らかではなかった。CCR2ノックアウトマウスによる術後遷延性疼痛動物モデルでは、術後4週において、疼痛行動が抑制されていた。CCR2受容体阻害薬の投与により、術後4週において、疼痛行動が抑制されていた。術後遷延性疼痛においてマクロファージが関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術後遷延性疼痛の発端は手術直後の組織損傷と炎症であることは明らかである。手術に伴う組織損傷の修復では免疫細胞の中でもマクロファージがその中心的な役割を果たす。しかし、術後遷延性疼痛においてマクロファージがどのように関与するかは明らかでなかった。術後遷延性疼痛におけるマクロファージの関与を解明することは術後遷延性疼痛の予防及び治療につながり、学術的意義及び社会的意義は大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：MRI combined with administration of super-paramagnetic iron oxide revealed no changes of the macrophage migration into the brain both in the chronic postsurgical pain mouse model and in the lipopolysaccharide-administered mouse model. Mice deficient in CCR2 showed attenuation of the pain-related behavior in the chronic postsurgical pain model at 4 weeks postoperatively as compared to wild type mice. Administration of the CCR2 receptor inhibitor suppressed the pain-related behavior of the chronic postsurgical pain mouse model at 4 weeks postoperatively.

研究分野：形成外科

キーワード：術後遷延性疼痛 マクロファージ MRI

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

術後遷延性疼痛は、創傷は十分に治癒していると考えられるのに長期にわたって痛みや不快感の訴えが続くことであり、その発症頻度は5~50%とされている。末梢においては創傷が治癒しているため、遷延性疼痛の原因として中枢神経系で痛みの感受性が亢進した状態が考えられる。術後遷延性疼痛の発端は手術直後の組織損傷とそれに伴う炎症であることは明らかであるが、末梢における組織損傷と炎症がどのように脳内の異常につながるかについての研究は進んでいない。手術に伴う組織損傷の修復に関して、免疫細胞の中でもマクロファージがその中心的な役割を果たす。マクロファージから脳へのシグナル伝達の機序として、炎症反応に伴うサイトカインなどが血液を介して脳内に伝達されて脳内に存在する免疫細胞が活性化されることだけでなく、末梢にあったマクロファージが脳内に迷入して炎症性物質を放出することも考えられるが、その機序は明らかでなかった。

2. 研究の目的

本研究は、術後遷延性疼痛においてマクロファージからどのように脳へシグナルが伝達されて痛みの感受性が亢進した状態となるかの機序の解明を目指す。

(1) 急性痛から慢性痛まで同一個体で連続的評価が可能な新規術後遷延性疼痛動物モデルを開発する。その新規動物モデルを用いてマクロファージの関与を検討する。マクロファージの活性化の促進に関与する CCR2 について評価を行う。

(2) 超常磁性酸化鉄投与による MRI 撮像を行い、モデル動物の脳内へのマクロファージ迷入を評価する。超常磁性酸化鉄はマクロファージに貪食されてそれにより MRI でマクロファージが描出される。

(3) 新規術後遷延性疼痛モデルにおいて脳での RNA の変化の解析を行う。術後遷延性疼痛モデルに関与する RNA を見出し、その RNA に関係する薬物投与実験を行い、術後遷延性疼痛モデルとその RNA との関連を検討する。

(4) 神経障害性遷延性疼痛モデルにおいてカンナビノイドが関与するか薬理的な評価を行う。カンナビノイド受容体には CB1、CB2 受容体があり、CB1 受容体は中枢神経に広く分布している一方、CB2 受容体は末梢でのマクロファージなどの免疫細胞に局限して存在しているが CB2 受容体は神経障害に伴い脊髄など中枢神経に発現が起こるとされている。

3. 研究の方法

(1) 新規術後遷延性疼痛マウスモデルを作成して、疼痛行動の評価を経時的に行った。疼痛行動の評価は von Frey filament による機械刺激で行った。新規動物モデルは、足底の皮膚全体を剥離し皮弁状に挙上した上で元の位置に戻す手術を行うもので、足底部分に強い炎症が引き起こされる。従来からよく用いられている足底皮膚切開創モデルを作成し、疼痛行動を比較した。マクロファージとの関連を明らかにするため、マクロファージの遊走および活性化の促進に関与する CCR2 について評価を行った。CCR2 ノックアウトマウスを用いて同様の術後遷延性疼痛動物モデルを作成し、疼痛行動を経時的に評価した。また、術後遷延性疼痛動物モデルに CCR2 受容体阻害薬を術直後 3 日間投与して疼痛行動を経時的に評価した。

(2) モデル動物の脳内へのマクロファージの迷入を検討するために、超常磁性酸化鉄投与による MRI 撮像を行った。超常磁性酸化鉄はマクロファージに貪食されてそれにより MRI でマクロファージが描出される。全身の炎症を惹き起こすリポポリサッカライド投与モデルおよび新規術後遷延性疼痛動物モデルにおいて脳内にマクロファージが迷入する状況の評価した。炎症のピークは投与もしくは手術直後であるために、投与もしくは手術前と、投与もしくは手術後 4 時間、12 時間、1 日において、脳内へのマクロファージ迷入を経時的に評価した。

(3) 新規術後遷延性疼痛モデルにおいて、術前と術後 4 週で全脳での RNA の網羅的解析を行った。その結果から、術後遷延性疼痛モデルに関与する RNA を見出し、その RNA に関係する薬物投与実験を行い、術後遷延性疼痛モデルとその RNA との関連を検討した。

(4) 神経障害性遷延性疼痛モデルである眼窩下神経絞扼ラットモデルにおいてカンナビノイドが疼痛行動に関与するかの薬理的な評価を行った。カンナビノイド受容体は CB1、CB2 受容体があり、通常では、CB1 受容体は中枢神経に広く分布している一方、CB2 受容体は末梢でのマクロファージなどの免疫細胞に局限して存在しているが CB2 受容体は神経障害に伴い脊髄など中枢神経に発現が起こるとされている。眼窩下神経絞扼ラットモデルは眼窩下神経を 5-0 ナイロン糸で 2ヶ所緩く結紮して作成した。CB1 受容体及び CB2 受容体の作動薬及び拮抗薬の投与を手術後 3 週で行った。また、内因性カンナビノイドが疼痛行動に関与するかどうかの薬理的な評価を行った。内因性カンナビノイドは脂肪酸アミド加水分解酵素 (FAAH) やモノアシルグリセロ

ールリパーゼ(MAGL)により分解代謝される。内因性カンナビノイドを高めるために FAAH 阻害薬と MAGL 阻害薬の投与を手術後 3 週で行った。疼痛行動の評価は von Frey filament による機械刺激で行い、薬物投与前より経時的に行った。

4. 研究成果

(1) 新規術後遷延性疼痛マウスモデルは、術後 4 週においても疼痛行動を認めた。足底皮膚切開創モデルに比べて手術後の疼痛が遷延していることを認めた。新規術後遷延性疼痛動物モデルは急性痛から慢性痛まで同一個体で連続的評価が可能な新たなモデル動物である事を見出した。CCR2 ノックアウトマウスによる術後遷延性疼痛動物モデルでは術後 4 週において疼痛行動が抑制されていた。CCR2 受容体阻害薬の術直後 3 日間投与により術後 4 週において疼痛行動が抑制されていた。術後遷延性疼痛においてマクロファージが関与していることが示唆された。

(2) 超常磁性酸化鉄投与による MRI において、全身の炎症を惹き起こすリポポリサッカライド投与モデルでは、投与前、投与後 4 時間、12 時間、1 日で経時的に評価を行ったが、脳内へのマクロファージ迷入の変化は明らかでなかった。また、新規術後遷延性疼痛動物モデルにおいても、手術前、手術後 4 時間、12 時間、1 日で経時的に評価を行ったが、脳内へのマクロファージ迷入の変化は明らかでなかった。

(3) 術後遷延性疼痛マウスモデルの術前と術後 4 週全脳での RNA の網羅的解析において、マクロファージに関連する RNA に変化が明らかでなかったものの、オリゴデンドロサイトに関連した RNA において変化がある傾向を見出した。これは、術後 4 週において脳内で脱髄が生じている可能性が示唆された。中枢神経系の脱髄疾患である多発性硬化症の治療として再髄鞘化を促す薬物を術後 2 週以降で投与したところ術後 4 週において疼痛行動が抑制された。

(4) 神経障害性遷延性疼痛ラットモデルにおいて、CB1 受容体拮抗薬と CB2 受容体作動薬投与により疼痛行動が抑制された。また、内因性カンナビノイドを高めることで疼痛行動が抑制され、これは CB2 受容体を介していた。遷延性疼痛の状況においては免疫細胞に発現する CB2 受容体が疼痛制御に関与する可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 K.Nakai, A.Nakae, Y.Minegishi, R.Urabe, M.Miyamae, T.Kubo, K.Hosokawa |
| 2. 発表標題 Possible involvement of spinal cannabinoid receptors in trigeminal nerve injury-induced mechanical hypersensitivity of rats |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井國博、中江文、久保盾貴、峯岸芳樹、浦邊 亮太郎、宮前 誠、細川互 |
| 2. 発表標題 ラット神経障害性顔面遷延性疼痛モデルにおける脊髄カンナビノイド受容体の関与 |
| 3. 学会等名 第27回日本形成外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Yoshiki Minegishi, Ryotaro Urabe, Makoto Miyamae, Toshio Yanagida, Ko Hosokawa, Tateki Kubo |
| 2. 発表標題 Possible involvement of spinal endocannabinoids in a rat model of trigeminal neuropathic pain |
| 3. 学会等名 11th Congress of the European pain federation (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kunihiro Nakai, Aya Nakae, Yoshiki Minegishi, Ryotaro Urabe, Makoto Miyamae, Toshio Yanagida, Ko Hosokawa, Tateki Kubo |
| 2. 発表標題 The role of spinal endocannabinoids in a rat model of oro-facial neuropathic pain |
| 3. 学会等名 Neuroscience 2019 (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井國博、中江文、峯岸芳樹、浦邊亮太郎、宮前誠、細川互、久保盾責 |
| 2. 発表標題 ラット神経障害性顔面遷延性疼痛モデルにおける脊髄での内因性カンナビノイドの関与 |
| 3. 学会等名 第28回形成外科学会基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|--|---|----|
| 研究分担者 | 久保 盾責 (Kubo Tateki) (00362707) | 大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401) | |
| 研究分担者 | 中江 文 (Nakae Aya) (60379170) | 大阪大学・生命機能研究科・特任准教授(常勤) (14401) | |