

令和元年6月12日現在

機関番号：10107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16716

研究課題名(和文) 妊娠が神経障害性痛を抑制する新しい機序の解明：活性酸素に着眼して

研究課題名(英文) Elucidation of a new mechanism by which pregnancy suppresses neuropathic pain:
Focusing on reactive oxygen species

研究代表者

小野寺 美子 (Onodera, Yoshiko)

旭川医科大学・医学部・講師

研究者番号：50516953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、妊娠が痛み閾値を上昇させることに着目し、さまざまな痛みと同様に神経障害性疼痛も分娩直前に抑制されることを明らかにした。またその機序に脊髄後角が大きく関わり、活性化したグリア細胞を抑制することが重要であることも示している。さらに脊髄後角において活性酸素の産生の主座であるミトコンドリアの分裂を触媒するDrp1(dynamic-related protein 1)が神経障害性疼痛時には増加しているが、分娩直前にはその増加が抑制されると言うことを明らかにした。今後その詳細を明らかにすることにより神経障害性疼痛の新たな治療法につながっていくと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

“痛み”は人体に危険を知らせるシグナルとして重要であるが、神経障害性疼痛はそのシグナルの異常発生により病的な痛みを発生し続けるという強い苦痛を伴う疾患である。これまでに使用されている鎮痛薬の神経障害性疼痛に対する効果は限られており、新しい鎮痛方法が求められている。その中で生物が元々有している生理的な鎮痛方法に注目した。分娩という強い痛みに対して生物が持つ鎮痛方法の応用を目指している。

研究成果の概要(英文)：At present, there are social needs for coping with neuropathic pain in order to extend the healthy life span in Japan. We noted that pregnancy raises the pain threshold. And we revealed that neuropathic pain is suppressed just before parturition. We also indicate that the spinal dorsal horn plays a major role in the mechanism and it is important to suppress activated glial cells. Furthermore Drp1 (dynamin-related protein 1), which catalyzes division of mitochondria is increased during neuropathic pain, but the increase is suppressed just before parturition. It is thought that it will lead to a new treatment of neuropathic pain by clarifying the details in the future.

研究分野：神経障害性疼痛

キーワード：神経障害性疼痛

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

わが国では約 1700 万人が慢性疼痛に苦しんでおり、高齢化社会を迎えさらに増加の一途をたどっている。急性痛は身体の障害としての警告の意味を持つが、慢性疼痛は患者の QOL を著しく損なうだけであり治療が重要である。慢性疼痛は、リウマチ性関節痛などに代表される侵害受容性疼痛、帯状疱疹後神経痛や複合性局所疼痛症候群 (CRPS) に代表される神経障害性疼痛、心因性疼痛に分類される。その中でも難治性である神経障害性疼痛への有効な治療法は確立されておらず、その治療薬の開発は急務である。新たな神経障害性疼痛に対する鎮痛薬を模索するために生理的な機構のなかから分娩直前の疼痛閾値上昇に注目したが、この機序については不明な点が多い。

2. 研究の目的

妊娠による疼痛閾値の上昇の機序についてはエンドルフィンなどの内因性鎮痛物質が関与していることを 1980 年に Gintzler が発表しており¹⁾、1989 年には Howaed らがダイノルフィンの脊髄への作用について報告している²⁾。我々も先行研究で妊娠に伴い、内因性鎮痛機序は分娩直前に活性化されることを体性および内臓性侵害刺激を用いて確認してきた³⁾。

我々は妊娠による疼痛閾値の上昇が、内因性オピオイドなどで賦活された下行性疼痛抑制系に起因するものと仮定し、痛いという信号が一次求心性線維にて伝達されるのを防いでいると考えている。c-fos は immediate early gene (IEG) と呼ばれる遺伝子群の 1 つからつくられる蛋白であり、転写調節因子として遺伝子の発現を調節し、侵害刺激や神経切断によって、受容野と一致する部分の二次ニューロンや痛みの上行路に沿って現れる。この c-fos の発現が分娩直前には抑制され減少していることを我々は示してきた⁴⁾。さらなる機序の解明に活性酸素に注目する。神経障害性痛では脊髄後角にある神経細胞内のミトコンドリアで活性酸素が産生、蓄積されることが分かっている。神経障害性痛の成立には、脊髄のミトコンドリアの Fission (分裂) による活性酸素の産生が関与する。ここで分裂を触媒する Drp1 (dynamic-related dprotein) の調整が重要となる。この Drp1 を抑制することで神経障害性痛が抑制されたという報告がある。共同研究者は活性酸素とその下流シグナル pCREB (phosphorylation cAMP response element binding protein) と pC/EBP β (phosphorylation CCAAT-enhancer binding protein β) が深くかかわっていることも明らかにしてきた⁵⁾。以上のことから、分娩直前には Drp1 の抑制を介して、活性酸素の産生が抑制され、その結果、痛みが減弱すると仮定し、機序を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 行動学的検討

妊娠痛みモデル群、妊娠 Sham 群、非妊娠痛みモデル群、非妊娠 Sham 群の 4 群に分け、機械刺激性アロディニアと温熱性痛覚過敏反応について調査し、妊娠を通じた痛み閾値の経時的変化を確認する。

(2) 活性酸素の定量

活性酸素のマーカーである MitoSox Red を染色し、脊髄後角に存在する神経細胞内の活性酸素の量に妊娠・分娩が及ぼす影響を明らかにする。

MitoSox Red を第 2-4 腰髄付近のくも膜下に投与するためカテーテルを留置する。全身麻酔下にラットを両耳道で固定し、両耳間の正中線に沿って皮膚を切開する。環椎後頭膜を露出、切

開し、PE-10 カテーテルをくも膜下腔に 8.5cm 留置する。術後、運動麻痺の発生を注意深く確認し、5 日間の回復期間が経過してから本研究に使用する。行動学的検討と同様に 4 群のモデルを作成する。妊娠 21 日目にくも膜下カテーテルより MitoSox Red を投与したのち、4%PFA を含む 0.1M リン酸溶液を用いて還流固定を行い、第 4・5 腰神経が起始する脊髄を取り出す。組織は後固定してから 30%スクロース PBS 不凍液に 2 日間浸す。その後凍結させ、クリオスタットにて切片とする。共焦点蛍光顕微鏡を用いて画像を作成し、細胞核周囲に斑点状の MitoSox Red による染色が認められる神経細胞を陽性細胞とする。脊髄後角の各 laminae に存在する MitoSox Red に染色された細胞の個数を計測する。

(3) Drp1 の発現量の比較

ウェスタンブロット法を用いて Drp1 の発現量を測定し、上記の 4 群で分娩直前の Drp1 の発現量を比較する。

検体は第 4-5 脊髄後角とする。これらの組織はホモジナイズし蛋白定量を行う。30ug ずつ蛋白を分注し、蛋白変性させる。蛋白は、10-12%の gel を用いて電気泳動により展開され、メンブレンに転写する。固定後、一次抗体を含んだ溶液中に摂氏 4 度で 1 晩、振盪させる。一次抗体は、rabbit anti-Drp1 を使用しハウスキーピングとして mouse anti- β -actin を使用する。2 次抗体と反応させ、次に chemiluminescence solution を用いて検出する。得られたバンドは ImageJ を用い PC 上で定量し、比較する。

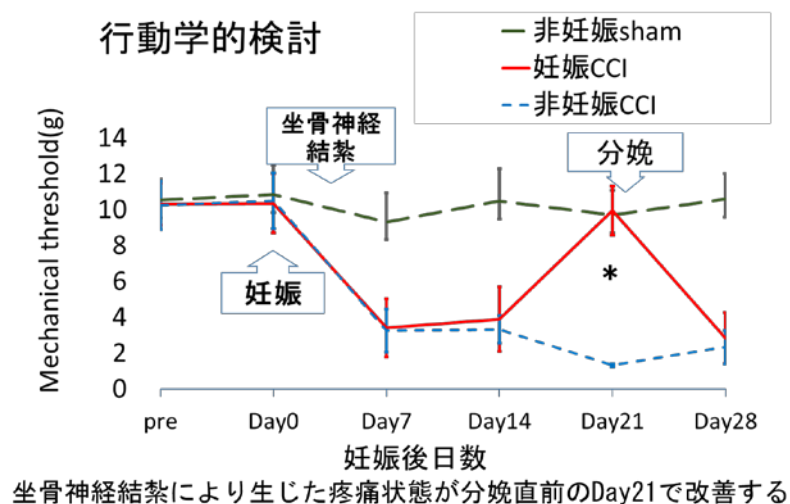
(4) pCREB、pC/EBP β 発現量の比較

活性酸素からの下流シグナルである pCREB、pC/EBP β の発現量を免疫染色により比較し、pCREB、pC/EBP β に及ぼす妊娠の影響を明らかにする。

脊髄後角の pCREB、pC/EBP β の発現と分布を免疫染色法により評価する。ラットは MitoSox Red の場合と同じ方法で還流固定、切片の作成を行う。一次抗体は、rabbit anti-pCREB、anti-pC/EBP β 、二次抗体は、fluorescent anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488) を用いる。共焦点蛍光顕微鏡で観察を行い、画像とする。pCREB-IR (immunoreactivity) と pC/EBP β -IR は、各画像における pCREB と pC/EBP β の density を Image J ソフトウェアを用いて算出する。

4. 研究成果

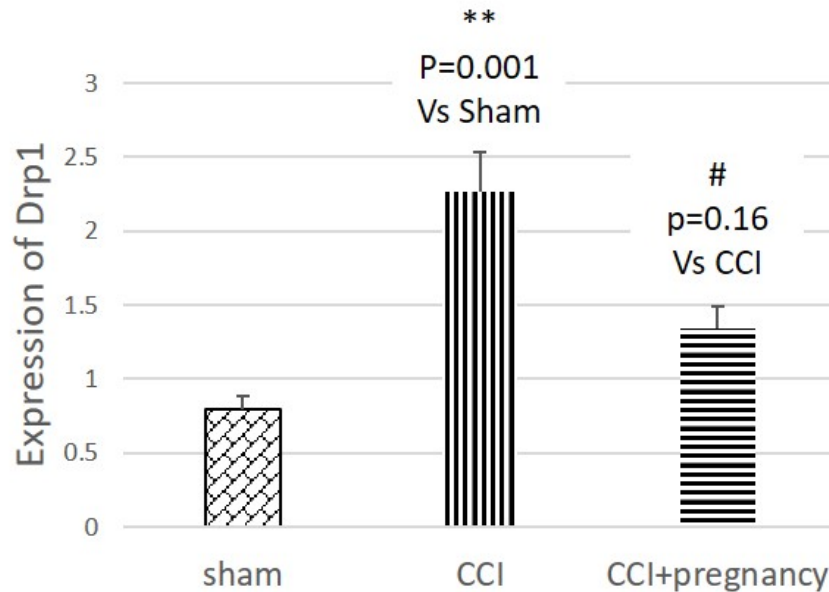
(1) Von frey test から妊娠ラットでは、分娩直前の Day21 に疼痛閾値の上昇が認められた。またその効果は分娩直後に消失した。



(2) 活性酸素の定量

PE-10 カテーテルをクモ膜下腔へ挿入後、妊娠を成立させることが困難であり、期間内に明らかな結果を得ることができなかった。

(3) 神経障害性疼痛モデルにおいて脊髄後角で有意に増加していた Drp-1 は分娩直前に減少した。



(4) pCREB、pC/EBP β 発現量の比較については今回の研究期間内に明らかにすることは出来なかった。

以上の結果より、分娩直前に生じる疼痛閾値上昇には、脊髄の後角における Drp1 の調整が関与しており、分娩直前の生理的な反応によって Drp1 の産生が抑制されると考えられる。このことによりミトコンドリアで産生される活性酸素が減少すると考えられる。

今後はホルモン偽妊娠状態としたラットでも同様のことが起こるかどうかが、近年神経障害性疼痛の成立・維持に重要と考えられているミクログリアやアストロサイトなどの妊娠による動向などを検討する。また本年までに到達出来なかった活性酸素の下流シグナルなどに対する妊娠の影響についても検討を深めていきたいと考えている。

これらの検討により、さらなる Pregnancy induced analgesia の検討を進め、神経障害性疼痛の治療法を模索していきたい。

<参考文献>

- 1) Gintzler .Science 1980; 210:193-195
- 2) Haward W et al. Eur J pharmacol 1989; 159: 205-209
- 3) Iwasaki H et al. Anesthesiology 1991; 74: 927-933
- 4) Onodera Y et al. J Pain Res. 2017; 10: 567-574
- 5) Kanda H et al. Anesth Analg. 2016; 122: 264-272

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 0 件）

〔学会発表〕（計 2 件）

①Eri Anno, Megumi Kanao-Kanda, Yoshiko Onodera, Izumi Sato, Hirotugu Kanda, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa.

Pregnancy Suppresses Mechanical Allodynia by Reversing Decreased Mitochondrial Sirt3 in the Spinal Dorsal Horn in the Chronic Constriction Injury Rat Model

ANESTHESIOLOGY 2018 annual meeting, 2018 年

②Chinami Takahashi, Megumi Kanda, Hirotugu Kanda, Yoshiko Onodera, Izumi Sato, Takafumi Iida, Hiroshi Iwasaki, Takayuki Kunisawa.

Pregnancy Attenuates the Expression of TLR4 and Drp1 in the Spinal Cord of Rats with Neuropathic Pain

ANESTHESIOLOGY 2017 annual meeting, 2017 年

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究協力者

研究協力者氏名：神田 恵

ローマ字氏名：(KANADA-KANAOK, Megumi)

研究協力者氏名：神田 浩嗣

ローマ字氏名：(KANADA, Hirotugu)

※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。