

令和 5 年 6 月 25 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K08837

研究課題名(和文) 複合性局所疼痛症候群の機序解明に基づく新規治療戦略の開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment strategies based on elucidation of the mechanisms of complex regional pain syndrome (CRPS)

研究代表者

柴田 志保 (Shibata, Shiho)

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：50708063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：複合性局所疼痛症候群(CRPS)は、痛覚過敏、浮腫、血流障害などさまざまな症状を伴う難治性の慢性疼痛症候群である。CRPSの発症には炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-1 β)の関与が推察されるが、その詳細な病態形成機序は不明であり、CRPSの発症機序の全容解明と新規治療薬の開発が望まれている。本研究では、CRPSの発症機序(痛みの増悪および慢性化)に、細胞内Ca²⁺イオン環境を適切に調節しているNa⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)やNa⁺,K⁺-ATPase(NKA)の異常な発現変動ならびに炎症関連細胞(マクロファージ、ミクログリア)の活性・浸潤が関与していることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複合性局所疼痛症候群(CRPS)は、四肢の堪え難い痛み、浮腫、血流障害、運動障害、萎縮性変化などを伴い、日常生活を著しく障害する。CRPSの症状は多彩で、時期によっても変化するが、発症初期に着目すると、浮腫や色調変化などの炎症を示唆する症状が発現することが多い。CRPSの発症には炎症性サイトカインの関与が推察されるが、その詳細な病態形成機序は不明であり、CRPSの発症機序の全容解明と新規治療薬の開発が望まれている。

研究成果の概要(英文)：Complex regional pain syndrome (CRPS) is an intractable chronic pain syndrome with various signs and symptoms including allodynia/hyperalgesia, edema, swelling, and skin abnormalities. However, a definitive therapeutic treatment for CRPS has not been established. In CRPS patients, inflammatory cytokines such as TNF- α and IL-1 β have been shown to increase in affected areas, suggesting that these molecules may be potential therapeutic targets for CRPS. In this study, we found that the abnormal expression changes of Na⁺/Ca²⁺ exchanger (NCX) and Na⁺,K⁺-ATPase (NKA), and the abnormal activity of inflammation-related cells (macrophages and microglia).

研究分野：医歯薬学

キーワード：複合性局所疼痛症候群 TNF- α TNF- α 中和抗体 局所投与 NCX NKA

1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群 (CRPS) は発症率 10 万人あたり 5.46 人の稀な疾患であるが、その症状は激しく、四肢の堪え難い痛み、浮腫、血流障害、運動障害、萎縮性変化などを伴い、日常生活が著しく障害される。CRPS の症状は多彩で、時期によっても変化するが、発症初期に着目すると、浮腫や色調変化などの炎症を示唆する症状が発現することが多い。CRPS の発症には炎症性サイトカインの関与が推察されるが、その詳細な病態形成機序は不明であり、CRPS の発症機序の全容解明と新規治療薬の開発が望まれている。

我々は、平成 28 年度採択の若手研究 (B) (研究課題番号: 16K20120) 以降の研究において、坐骨神経部分結紮 (pSNL) 後に患肢をギプス固定で 2 週間不動化することにより、CRPS の臨床症状に類似する「患肢の激しい痛み、腫脹、色調変化」を呈する CRPS モデルマウスの開発に成功している。本 CRPS モデルは、既存のモデルよりも病態形成の再現性が高く、CRPS 様症状を安定的に示す優れた病態モデルである。他方で、我々の予備的研究結果やこれまでの報告から、急性および慢性疼痛において、患部周縁の末梢神経細胞から関連する中枢神経細胞に到るまで、 Ca^{2+} 過剰負荷に伴う神経細胞傷害および炎症性細胞 (マクロファージ、ミクログリア) の活性化・浸潤亢進がそれぞれ認められている。しかしながら、炎症性細胞 (マクロファージ、ミクログリア) の活性化・浸潤亢進と Ca^{2+} 過剰負荷との関連は不明である。本研究では、細胞内 Ca^{2+} イオン環境を適切に調節している $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体 (NCX) や Na^+, K^+ -ATPase (NKA) の遺伝子変異マウスを用いて、我々が独自に開発した CRPS モデルマウスと既存モデルである pSNL マウスを作製し、炎症性細胞 (マクロファージ、ミクログリア) の活性化・浸潤亢進と Ca^{2+} 制御機構の関係を明らかにする。

2. 研究の目的

- (1) CRPS および pSNL モデル動物を作成し、炎症性細胞の活性および浸潤度合いを検討する。
- (2) CRPS および pSNL 発症の病態機序 (Ca^{2+} 制御機構) を明らかにし、新規治療法を考案する。

3. 研究の方法

(1) pSNL および CRPS モデルマウスの作製

全ての実験は、5 週齢の雄性 ddY マウスおよび C57BL/6 (遺伝子改変マウス) を用いて実施した。坐骨神経を部分結紮する坐骨神経部分結紮 (pSNL) モデルは、イソフルラン麻酔下に左後肢の大腿中央部より中枢側の坐骨神経を部分結紮し作製した。CRPS モデルは、pSNL モデルと同様に左坐骨神経を部分結紮した後に、左下肢を最大伸展位でギプス固定し、2 週間左下肢を不動状態として作製した。対照群として、左坐骨神経を露出するのみで、結紮を行わなかった sham 手術群も作成した。また、本研究では、ギプス装着のみのモデルマウスも作製し、ギプス固定による疼痛・浮腫・炎症への影響も確認している。

(2) 痛み閾値の測定 (sham 群、pSNL 群、CRPS 群の比較)

pSNL 処置を行った 2 週間後から 1 週間ごとに痛みの閾値を測定した。痛み閾値の測定には von Frey フィラメントを用いた触圧刺激試験を実施した。痛み閾値は、von Frey フィラメントをマウス後肢足蹠に押し当て、刺激に対する行動 (後肢を挙上する、後肢を舐める) を解析して算出した。

(3) アイクロアレイ解析 (sham 群、pSNL 群、CRPS 群の比較)

pSNL 処置の 4 週間後に、sham、pSNL、CRPS の各モデルマウスから坐骨神経組織を採取した。pSNL および CRPS の坐骨神経は、神経結紮部位の両側 5 mm を採取した。sham の坐骨神経は、左後肢の大腿中央部より中枢側で 1 cm の長さで採取した。採取した坐骨神経組織でマイクロアレイ法により、各遺伝子の発現変化を解析した。

(4) 薬物局所投与実験

pSNL 処置の 2 週間後、ギプスを抜去した CRPS モデルマウスの坐骨神経周囲に薬物局所投与を行った。薬物の局所投与は、イソフルラン麻酔下に行い、マイクロシリンジを用いて 1 回あたり 10 μL とした。投与薬物には、生理食塩液、control IgG、TNF- α 中和抗体 (0.1 μg , 1 μg)、MMP-9 阻害薬 (1 μg) を用いた。治療効果は、von Frey テストを用いた痛み閾値によ

って判定した。von Frey テストは、投与前、投与1時間後、2時間後、3時間後、24時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後に実施し、急性期の効果と長期効果を確認した。また、pSNL処置のみを行い、ギプス固定を行わなかったpSNL群にも同様の薬物局所投与を行った。pSNL群では、生理食塩液、control IgG、TNF- α 中和抗体(0.1 μ g, 1 μ g)、MMP-9 阻害薬(1 μ g)、recombinant TNF- α (0.01 μ g)を投与した。治療効果は、von Frey テストを用いた痛み閾値によって判定した。von Frey テストは、投与前、投与1時間後、2時間後、3時間後、24時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後に実施し、急性期の効果と長期効果を確認した。

(5) 免疫組織染色

薬物局所投与前後に適宜、坐骨神経組織を採取後、凍結切片を作製し、免疫組織染色を実施した。免疫組織染色には、TNF- α 、S100 β 、CD68、CD206、Iba-1の各抗体を用いた。

(6) リアルタイム PCR

薬物局所投与前後に適宜、坐骨神経組織を採取し、リアルタイム PCR を実施した。

(7) 下肢の血流測定

ギプス固定による下肢血流の影響を検討する目的で、ギプス装着のみの処置を施したマウスの下肢血流を、ギプス脱装直後に測定した。血流測定は、2次元血流測定装置を使用した。

4. 研究成果

(1) CRPS モデル動物の疼痛持続性(慢性疼痛モデル)

従来の神経障害痛モデルに不動の時期を加えることで、CRPS 患者に類似した皮膚の色調変化、患肢の腫脹が発現し(膨張率: $127 \pm 9.5\%$)、痛み閾値が著明に低下した CRPS モデル動物を作製することができた。pSNL モデル動物では痛み閾値が正常化する術後6週目においても、今回作成した CRPS モデル動物では強い痛みが持続していた。

(2) CRPS および pSNL モデルの坐骨神経における NCX と NKA の発現変動

神経障害性疼痛の分子実体を探るため、坐骨神経部分損傷(pSNL)モデルマウスの傷害坐骨神経部位を用いてマイクロアレイ解析を実施したところ、細胞内外のイオン輸送を担う Na⁺/Ca²⁺交換輸送体1(NCX1: Slc8a1)と α_3 NKA(NKA α_3 サブユニット: Atp1a3)の発現が増加しており、 α_2 NKA(Atp1a2)の発現が低下していた。NCXは神経興奮(侵害刺激や神経障害)時のCa²⁺過剰負荷の経路となるCa²⁺輸送体である。中枢神経においてNKAは、NCXのリバースモードによるCa²⁺過剰負荷(神経障害)を抑制しているという報告があるため、NCXおよびNKAの機能連関による細胞内イオン環境の変動が、神経障害性疼痛の発症および緩和機構を制御している可能性が示唆された。

(3) α_2 NKA 遺伝子欠損マウス: pSNL モデルマウスにおける疼痛抑制

マイクロアレイ解析の結果より、 α_2 NKAが疼痛発症に関与していることが示唆されたため、 α_2 NKA 遺伝子欠損マウスを用いて、pSNLモデルを作製し、von Frey フィラメントによる触圧刺激試験を実施した。その結果、痛み反応閾値が、通常マウスを使用したpSNLモデルに比べて高い値を示しており、疼痛が緩和されていることを示した。

(4) CRPS および pSNL モデルの坐骨神経における炎症性細胞の浸潤および活性化

リアルタイム PCR の結果から、CRPS 群では、坐骨神経組織において、sham 群およびpSNL 群よりも、TNF- α 、IL-1 β 、S100A9 の mRNA 量が増加しており、強い炎症応答が観察された。さらに、全群より坐骨神経を採取し、TNF- α 抗体と炎症性細胞マーカー抗体(CD68、CD206、Iba-1、S100 β)を用いて免疫染色を行ったところ、CRPS 群において最も高い蛍光を示した。また、CRPS モデルの坐骨神経細胞患部局所において、TNF- α は、CD68 陽性細胞(M1 マクロファージ)に最も多く発現しており、シュワン細胞でも一部発現を認めた。

(5) TNF- α 中和抗体局所投与の治療効果

TNF- α 中和抗体(抗マウス TNF- α 抗体)を局所投与した CRPS モデルマウスでは、痛み閾値が徐々に上昇した。1 μ g/回で投与した群では、6週間後には痛みの閾値が対照群レベル(1.50 ± 0.18 g)まで有意に回復した($P < 0.01$)。一方、0.1 μ g/回で投与した群では、回復傾向は見られたが、効果は限定的であった。

(6) pSNL 群に対する recombinant TNF- α の作用

pSNL 群では、患肢の外観に CRPS 様の変化は見られず、痛み閾値も自然に改善した。そのため、TNF- α 中和抗体を局所投与しても有意な治療効果は発現しなかった。しかし、recombinant TNF- α を局所投与した pSNL 群では、痛みの回復が遅れる傾向がみられた。

(7) ギブス装着による疼痛発現および下肢血流の影響

ギブス固定による下肢血流の影響を検討する目的で、ギブス装着のみの処置を施したマウスの下肢血流を、2次元血流測定装置を使用して、ギブス脱装直後に測定した。その結果、ギブス装着のみでは、下肢血流は sham 群（未装着群）との変化を示さなかった。同様に、ギブス脱装直後および脱装 1 週間後に痛み閾値を測定したところ、sham 群との有意な差は認めなかった。

以上の結果より、痛みの増大と遷延に TNF- α が関与している可能性が考えられた。CRPS の発症には TNF- α を介した炎症性シグナル、あるいは患部周縁神経細胞の Ca²⁺関連輸送体を介した Ca²⁺過剰負荷が重要であり、TNF- α 阻害薬（中和抗体）の検討結果より、TNF- α 阻害薬の局所投与が CRPS の治療に有効である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shiho Shibata, Hideaki Tagashira, Takayuki Nemoto, Satomi Kita, Tomo Kita, Yasuharu Shinoda, Kouzaburo Akiyoshi, Ken Yamaura, Takahiro Iwamoto	4. 巻 -
2. 論文標題 Perineural treatment with anti-TNF- antibody ameliorates persistent allodynia and edema in novel mouse models with complex regional pain syndrome	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jphs.2023.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 柴田志保、根本隆行、岩本隆宏、秋吉浩三郎
2. 発表標題 複合性局所疼痛症候群に対するインフリキシマブ局所静脈内投与の治療効果
3. 学会等名 第41回臨床薬理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 柴田 志保、平田 和彦、廣田 一紀、外山 恵美子、山浦 健
2. 発表標題 複合性局所疼痛症候群に対する低用量TNF- 阻害薬局所静脈内投与の効果
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柴田 志保、田頭 秀章、喜多 知、富永 健二、山浦 健、岩本 隆宏
2. 発表標題 炎症性サイトカインの複合性局所疼痛症候群病態形成における役割
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会第 53 回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田頭秀章、柴田志保、喜多知、喜多紗斗美、山浦健、岩本隆宏
2. 発表標題 複合性局所疼痛症候群に対する TNF- 中和抗体局所投与の治療応用への可能性
3. 学会等名 臨床薬理学会九州部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiho Shibata, Hideaki Tagashira, Satomi Kita, Tomo Kita, Sari Suzuki, Ken Yamaura, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 Perineural expression of TNF- contributes to long-term mechanical allodynia in CRPS model mice
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hideaki Tagashira, Asahi Nagata, Satomi Kita, Tomo Kita, Sari Suzuki, Kohtaro Abe, Akinori Iwasaki, Takahiro Iwamoto
2. 発表標題 The role of vascular smooth muscle NCX1 in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension
3. 学会等名 9th Federation of Asian and Oceanian Physiological Societies (国際学会)
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	田頭 秀章 (Tagashira Hideaki) (90735028)	福岡大学・医学部・准教授 (37111)	

6. 研究組織（つづき）

	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	鈴木 沙理 (Suzuki Sari) (30804611)	福岡大学・医学部・助教 (37111)	
研究分担者	山浦 健 (Yamaura Ken) (70264041)	九州大学・医学研究院・教授 (17102)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関