

令和 3 年 5 月 24 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09087

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛と TRP チャンネルおよびオキシトシンの関連メカニズムの解明

研究課題名(英文) Hypothalamo-neurohypophysial and hypothalamo-spinal interaction between TRP channel and oxytocin in neuropathic pain using TRP gene deficient mice

研究代表者

大西 英生(OHNISHI, Hideo)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：20279342

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)：TRPV1 遺伝子ノックアウト(KO)マウスを用いて神経障害性疼痛モデルを作成し、痛覚閾値、視床下部・脊髄後角オキシトシン(OXT)ニューロンの活性化、脊髄後角グリア細胞(ミクログリアおよびアストロサイト)の発現変化を調べた。処置後14日に、TRPV1 KOマウスの熱刺激に対する疼痛逃避行動潜時および脊髄後角I-II層のアストロサイトの発現およびニューロンの活性化が、野生型マウスと比較し有意に低下していた。一方OXTニューロンでは有意な差はなかった。神経障害性疼痛の慢性期にTRPV1が脊髄後角のアストロサイトを介して熱痛覚過敏に関与することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛の病態は複雑であり、難治性である。TRPチャンネルの中樞神経系や脊髄における役割は不明な点が多い。TRPチャンネルの一つであるTRPV1に着目し、TRPV1 KOマウスを用いてTRPV1が神経障害性疼痛の熱痛覚過敏に関与していることを明らかにした。本研究課題では、アストロサイト阻害薬やTRPV1拮抗薬を投与すると神経障害性疼痛による痛覚過敏が改善することを証明したことにより、これらの薬剤が神経障害性疼痛の治療のターゲットとして注目される可能性があり、社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed mechanical/heat sensitivities and glial/neuronal activities in laminae I and II in the spinal dorsal horn by employing partial sciatic nerve ligation (pSNL) using TRPV1 knockout (Trpv1^{-/-}) mice. Mechanical/heat sensitivities, expression levels of microglial Iba-1 and astrocytic GFAP, and the number of FosB-positive neurons were significantly increased on days 7 and 14 in the pSNL group of both wild type (WT) and Trpv1^{-/-} mice. The number of FosB/OXT double positive neurons in the hypothalamus were few in both WT and TRPV1^{-/-}. While mechanical sensitivity was comparable between WT and Trpv1^{-/-} mice, the threshold against heat sensitivity was markedly prolonged in Trpv1^{-/-} than WT mice on day 14 after pSNL. Conversely, the increment of FosB-positive neurons was significantly attenuated in Trpv1^{-/-} than WT mice on days 7 and 14 after pSNL. These results suggest that TRPV1 may modulate thermal perception via increased astrocytes in the dorsal horn.

研究分野：整形外科学

キーワード：TRPV1 神経障害性疼痛 坐骨神経部分結紮 視床下部 脊髄後角

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

1. 研究開始当初の背景

整形外科の日常診療において、神経障害性疼痛を呈する患者は多い。神経障害性疼痛は非常に難治性であり、患者の日常生活動作 (ADL) および生活の質 (QOL) を低下させるため、社会的損失が大きい。近年、非選択的陽イオンチャネルである Transient receptor potential vanilloid (TRPV) の侵害受容への関与や、下垂体後葉ホルモンであるオキシトシン (OXT) の疼痛調整への関与が注目されている。TRPV1 は一次感覚神経線維に発現しており、ポリモーダル受容器として種々の刺激に応答することが報告されているため、新規鎮痛薬のターゲットとなる可能性がある。我々は、これまでに、本学第1生理学教室と共に疼痛の受容・調節に関する生理的メカニズムを研究しており、TRPV1 ノックアウト (KO) マウスを用いて、TRPV1 が侵害受容性疼痛の受容機序に関与する可能性を明らかにしてきた (Ishikura et al., 2015)。さらに、TRPV1 KO マウスを用いて、TRPV1 遺伝子欠損することで脊髄後角 III-IV 層における神経細胞の活性化を促すことを明らかにした (Motojima et al., 2018)。また、視床下部の室傍核 (PVN) および視索上核 (SON) で合成される OXT は中枢神経系に作用して疼痛を抑制すると考えられており、新規鎮痛薬となる可能性がある。我々は、TRPV1 および OXT の侵害受容性疼痛に対する関与を明らかにしてきたが、さらに神経障害性疼痛における関与を解明することが神経障害性疼痛治療の発展に寄与すると考えた。

2. 研究の目的

TRPV1 は一次感覚神経線維に発現しており、ポリモーダル受容器として種々の刺激に応答することが報告されている。末梢神経障害による神経障害性疼痛モデルラットの脊髄後角において TRPV1 の発現が増加し、異痛症 (アロディニア) の発症に関与することが報告されている (Kanai et al., 2005)。また、我々は mRFP1 蛍光を指標に OXT の発現を可視化できる遺伝子改変動物である OXT mRFP1 トランスジェニックラットを用いて、神経障害性疼痛モデルラットでは視床下部および脊髄後角 I-II 層における OXT の発現が増加することを明らかにした (Nishimura et al., 2019)。しかし、神経障害性疼痛の病態やその受容における TRPV1 および OXT の関与については不明な点が多い。本申請課題の目的は、TRPV1 KO マウスを用いて OXT および TRPV1 が神経障害性疼痛の受容および調節機序に関与するメカニズムを解明することである。

3. 研究の方法

(1) 野生型マウス (C57BL/6J) および TRPV1 KO マウスを実験に使用した。神経障害性疼痛モデルは、片側坐骨神経部分結紮処置 (partial sciatic nerve ligation; pSNL) を行う Seltzer モデルを採用した。それぞれの系統のマウスを無処置 (Control) 群、神経の露出のみを行う偽手術 (Sham) 群、および神経障害性疼痛モデル (Seltzer) 群に無作為に分けた。機械刺激および熱刺激に対する痛覚閾値を評価するために、処置前、処置後7日および処置後14日に von Frey test (機械刺激) および Hot plate test (熱刺激) を行なった。処置後7日および14日に灌流固定を行い、脳および脊髄を採取し、30 μ m 厚のスライスを作成した。最初期遺伝子の一つである FosB を神経活性化の指標とした。抗 OXT 抗体と抗 FosB 抗体を用いて二重免疫組織化学的染色を行い、視床下部の PVN および SON における OXT と FosB が共発現している神経の数を計数した。

(2) (1) で得た脊髄切片を用いて脊髄後角のグリア細胞 (ミクログリアおよびアストロサイト) の発現および神経の活性化の評価を行なった。ミクログリアの活性の指標として抗 Iba-1 抗体を使用し、アストロサイトの活性の指標として抗 GFAP 抗体を使用した。抗 Iba-1 抗体および抗 GFAP 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行った。蛍光顕微鏡を用いて L5 レベル脊髄後角 I-II 層における Iba-1 および GFAP の活性を評価した。抗 FosB 抗体を用いて免疫組織化学的染色を行ない、第5腰椎レベル (L5) の脊髄後角 I-II 層における FosB 陽性細胞を、蛍光顕微鏡を用いて観察し計数し神経の活性化を評価した。さらに、Seltzer 群と Sham 群の L5 レベル脊髄切片を用いて抗 TRPV1 抗体および抗 GFAP 抗体の二重免疫組織化学的染色を行い、脊髄後角 I-II 層においてアストロサイトと TRPV1 が共発現の有無を確認した。

(3) 野生型マウス (C57BL/6J) および TRPV1 KO マウスを用いて pSNL 処置を行い、神経障害性疼痛モデルを作成した。さらに、アストロサイト阻害薬投与群と溶媒群に分け、合計4群とした。処置後7日から13日の間にアストロサイト阻害薬ならびに溶媒を1日1回連日髄腔内投与した。処置前、処置後7日および処置後14日に(1)と同様の方法で機械刺激および熱刺激に対する痛覚閾値を評価した。

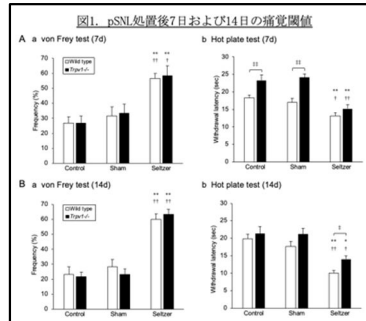
(4) 野生型マウス (C57BL/6J) を用いて pSNL 処置を行い、神経障害性疼痛モデルを作成した。TRPV1 拮抗薬群と溶媒群に分け、合計2群とした。処置後7日から13日の間に TRPV1 阻害薬ならびに溶媒を1日1回連日腹腔内投与した。処置前、処置後7日および14日に(1)と同様の方法で機械刺激および熱刺激に対する痛覚閾値を評価した。

4. 研究成果

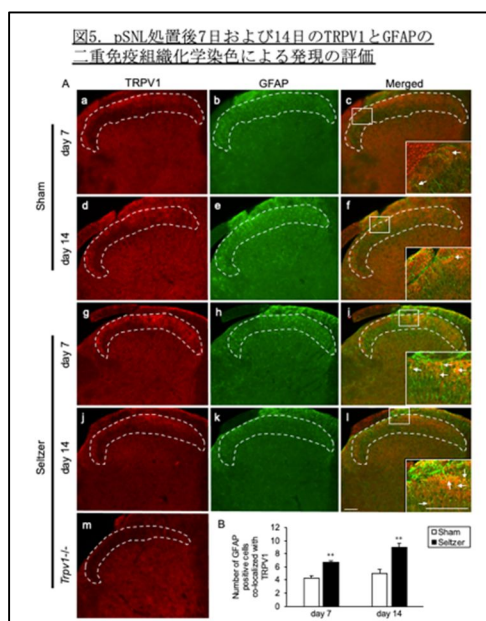
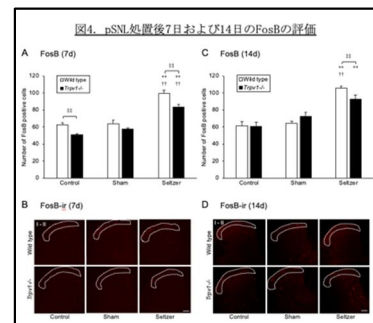
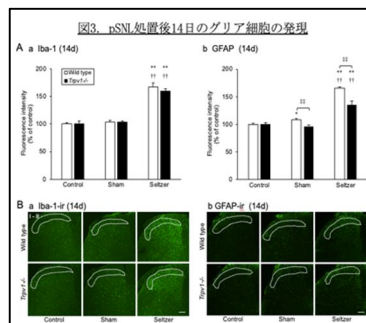
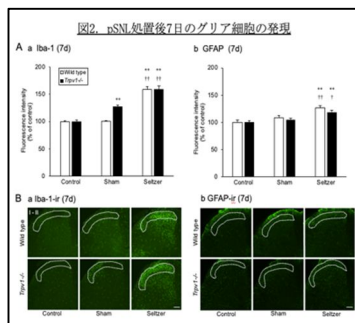
方法(1)～(4)に対応して記載する。

(1) pSNL 処置を行なった全てのマウスに神経障害性疼痛を認めた。処置後7日および14日の機械刺激に対する痛覚閾値は対照群と比較して Seltzer 群で痛覚閾値が低下していたが、野生

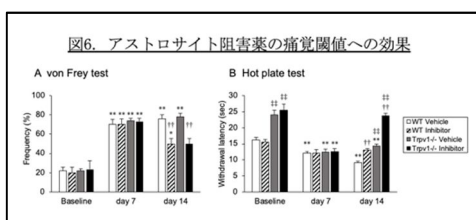
型マウスと TRPV1 KO マウスの Seltzer 群の系統間に有意差は認めなかった。処置後 7 日および 14 日の熱刺激に対する痛覚閾値は対照群と比較して Seltzer 群で痛覚閾値の低下を認め、処置後 14 日のみ TRPV1 KO マウスの Seltzer 群の疼痛逃避行動を示すまでの潜時は野生型マウスと比較すると有意に延長していた (図 1)。抗 OXT 抗体と抗 FosB 抗体の二重免疫組織化学的染色を行なったが、共発現している神経はわずかであり、野生型マウスおよび TRPV1 KO マウスの両系統で Seltzer 群と対照群の間に有意差は認めなかった。



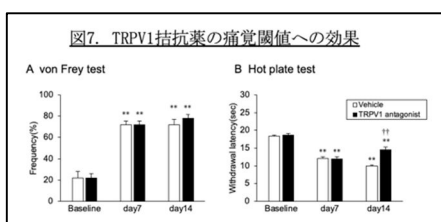
(2) L5 脊髄後角 I-II 層におけるグリア細胞の発現を評価した。処置後 7 日では、Seltzer 群では対照群と比較し L5 脊髄後角 I-II 層における Iba-1 および GFAP の発現が有意に増加し、野生型マウスと TRPV1 KO マウスの Seltzer 群の系統間に有意差は認めなかった (図 2)。処置後 14 日では、Seltzer 群では対照群と比較し L5 脊髄後角 I-II 層における Iba-1 および GFAP の発現が有意に増加し、TRPV1 KO マウスの Seltzer 群の GFAP の発現が野生型マウスと比較し有意に低下していた (図 3)。さらに、L5 脊髄後角 I-II 層における FosB 陽性細胞数の評価を行なった。処置後 7 日および処置後 14 日では、Seltzer 群で対照群と比較し L5 脊髄後 I-II 層の FosB 陽性細胞数が有意に増加しており、TRPV1 KO マウスの Seltzer 群の FosB 陽性細胞数は野生型マウスと比較し有意に低値であった (図 4)。さらに、L5 脊髄後角 I-II 層における TRPV1 と GFAP の発現の評価を行なった。TRPV1 KO マウスでは脊髄後角 I-II 層の抗 TRPV1 抗体の染色性は認められなかった (図 5.A.m)。処置後 7 日および 14 日の野生型マウスの Sham 群および Seltzer 群で、TRPV1 と GFAP の共発現を認め、アストロサイトに TRPV1 が発現していることを確認した (図 5A.c, f, i, l)。TRPV1-GFAP 陽性細胞数を計数したところ、Seltzer 群で Sham 群と比較し有意な増加を認めた (図 5B)。



(3) 処置後7日で pSNL 処置を行なった全てのマウスに痛覚過敏を認めた。アストロサイト阻害薬を7日間投与した処置後14日では、機械刺激および熱刺激の痛覚閾値が、溶媒 (Vehicle) 群と比較してアストロサイト阻害薬群で有意に改善した (図6)。以上よりアストロサイトは機械刺激および熱刺激の痛覚過敏に関与することを確認した。



(4) 処置後7日で pSNL 処置を行なった全てのマウスに痛覚過敏を認めた。TRPV1 拮抗薬を7日間投与した処置後14日では、TRPV1 拮抗薬投与群で Vehicle 群と比較し熱刺激に対する痛覚過敏の有意な改善を認めた (図7)。以上より TRPV1 KO マウスを用いた実験と同様の結果が得られた。



以上(1)から(4)より TRPV1 が神経障害性疼痛の慢性期の熱痛覚過敏に脊髄後角のアストロサイトを介して関与している可能性が示唆された。

< 引用文献 >

- Kanai, Y., Nakazato, E., Fujiuchi, A., Hara, T., Imai, A., 2005. Involvement of an increased spinal TRPV1 sensitization through its up-regulation in mechanical allodynia of CCI rats. *Neuropharmacology* 49, 977-984.
- Ishikura T, Suzuki H, Shoguchi K, Koreeda Y, Aritomi T, Matsuura T, Yoshimura M, Ohkubo J, Maruyama T, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Mizuno A, Suzuki M, Ueta Y. Possible involvement of TRPV1 and TRPV4 in nociceptive stimulation induced nocifensive behavior and neuroendocrine response in mice. *Brain Research Bulletin* 118, 2015, 7-16
- Motojima Y, Nishimura H, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Tanaka K, Saito R, Yoshimura M, Maruyama T, Matsuura T, Suzuki H, Kawasaki M, Ohnishi H, Sakai A, Ueta Y. Role of Trpv1 and Trpv4 in surgical incision-induced tissue swelling and Fos-like immunoreactivity in the central nervous system of mice. *Neuroscience Letters*, 678: 76-82, 2018. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.05.001.
- Nishimura H, Kawasaki M, Suzuki H, Matsuura T, Motojima Y, Ohnishi H, Yamanaka Y, Yoshimura M, Maruyama T, Saito R, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Onaka T, Ueta Y, Sakai A. Neuropathic pain upregulates hypothalamo-neurohypophysial and hypothalamo-spinal oxytocinergic pathways in oxytocin-monomeric red fluorescent protein 1 transgenic rat. *Neuroscience*, 406: 50-61, 2019. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2019.02.027.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Nishimura H, Kawasaki M, Suzuki H, Matsuura T, Motojima Y, Ohnishi H, Yamanaka Y, Yoshimura M, Maruyama T, Saito R, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Onaka T, Ueta Y, Sakai A.	4. 巻 15
2. 論文標題 Neuropathic Pain Up-Regulates Hypothalamo-Neurohypophysial and Hypothalamo-Spinal Oxytocinergic Pathways in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rat.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 50-61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.02.027.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura H, Kawasaki M, Matsuura T, Suzuki H, Motojima Y, Baba K, Ohnishi H, Yamanaka Y, Fujitani T, Yoshimura M, Maruyama T, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Tanaka K, Sanada K, Onaka T, Ueta Y, Sakai A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Acute Mono-Arthritis Activates the Neurohypophysial System and Hypothalamo-Pituitary Adrenal Axis in Rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Endocrinol (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 43
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fendo.2020.00043.	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 -
1. 著者名 Motojima Yasuhito, Nishimura Haruki, Ueno Hiromichi, Sonoda Satomi, Nishimura Kazuaki, Tanaka Kentaro, Saito Reiko, Yoshimura Mitsuhiro, Maruyama Takashi, Matsuura Takanori, Suzuki Hitoshi, Kawasaki Makoto, Ohnishi Hideo, Sakai Akinori, Ueta Yoichi	4. 巻 678
2. 論文標題 Role of Trpv1 and Trpv4 in surgical incision-induced tissue swelling and Fos-like immunoreactivity in the central nervous system of mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 76 ~ 82
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.05.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nishimura Haruki, Kawasaki Makoto, Suzuki Hitoshi, Matsuura Takanori, Motojima Yasuhito, Ohnishi Hideo, Yamanaka Yoshiaki, Yoshimura Mitsuhiro, Maruyama Takashi, Saito Reiko, Ueno Hiromichi, Sonoda Satomi, Nishimura Kazuaki, Onaka Tatsushi, Ueta Yoichi, Sakai Akinori	4. 巻 406
2. 論文標題 Neuropathic Pain Up-Regulates Hypothalamo-Neurohypophysial and Hypothalamo-Spinal Oxytocinergic Pathways in Oxytocin-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Transgenic Rat	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 50 ~ 61
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2019.02.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Baba K, Kawasaki M, Nishimura H, Suzuki H, Matsuura T, Fujitani T, Tsukamoto M, Tokuda K, Yamanaka Y, Ohnishi H, Yoshimura M, Maruyama T, Sanada K, Ueno H, Sonoda S, Nishimura K, Tanaka K, Ueta Y, Sakai A.	4. 巻 10
2. 論文標題 Heat hypersensitivity is attenuated with altered expression level of spinal astrocytes after sciatic nerve injury in TRPV1 knockout mice.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neuroscience Research	6. 最初と最後の頁 In Press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neures.2020.12.007.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 西村春来, 川崎展, 元嶋耐士, 松浦孝紀, 馬場一彦, 鈴木仁士, 山中芳亮, 大西 英生, 吉村充弘, 丸山崇, 園田里美, 西村和朗, 田中健太郎, 真田賢哉, 上田陽一, 酒井昭典
2. 発表標題 カラゲニン誘発性膝関節炎ラットにおける視床下部-下垂体系および視床下部-脊髄系の侵害受容調節の検討
3. 学会等名 第49回日本心脈管作動物質学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村春来, 川崎展, 元嶋耐士, 松浦孝紀, 鈴木仁士, 山中芳亮, 藤谷晃亮, 大西英生, 上田陽一, 酒井昭典
2. 発表標題 カラゲニン誘発性膝関節炎ラットにおける視床下部 - 下垂体系および視床下部 - 脊髄系の侵害受容調節の検討
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川崎展, 西村春来, 元嶋耐士, 松浦孝紀, 鈴木仁士, 山中芳亮, 大西英生, 上田陽一, 酒井昭典
2. 発表標題 カラゲニンにおける誘発性膝関節炎ラットにおける視床下部-下垂体系および視床下部-脊髄系の侵害受容調節の検討
3. 学会等名 第63回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村春来, 川崎展, 元嶋尉士, 鈴木仁士, 大西英生, 吉村充弘, 丸山崇, 齋藤玲子, 上野啓通, 園田里美, 西村和朗, 田中健太郎, 上田陽一, 酒井昭典
2. 発表標題 オキシトシン-mRFP1トランスジェニックラットを用いた神経障害性疼痛モデルにおける中枢神経系生理活性について
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西村春来, 川崎展, 元嶋尉士, 鈴木仁士, 大西英生, 上田陽一
2. 発表標題 c-fos-eGFPトランスジェニックラットを用いた膝関節炎モデルにおける中枢神経系生理活性の解明
3. 学会等名 第62回日本リウマチ学会総会・学術集会
4. 発表年 2018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	上田 陽一 (UETA YOICHI) (10232745)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

	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
研究協力者	川崎 展 (KAWASAKI Makoto)		
研究協力者	鈴木 仁士 (SUZUKI Hitoshi)		

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
研究協力者	酒井 昭典 (SAKAI Akinori)		

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