

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：13201

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791421

研究課題名（和文） 急性膵炎に伴う難治性疼痛に対する新規治療ターゲットの研究

研究課題名（英文） The study of new therapeutic target for intractable pain associated with acute pancreatitis

研究代表者

大石 美緒子 (OISHI MIOKO)

富山大学・大学病院・助教

研究者番号：10536733

研究成果の概要（和文）：

今回の研究では、まず caerulein 投与後の膵組織で炎症を分子レベルで確認した後、このモデルが急性膵炎の疼痛を再現しているか否かを検討した。その結果、内臓痛・関連痛ともに caerulein 群と対照群間で有意差を認め、本モデルを疼痛面をも再現する急性膵炎モデルとして確立した。この動物モデルを使用し、急性膵炎における疼痛発現機序の検討を行った。その結果、末梢知覚神経系における BK や TRPV1、ならびに中枢神経系における cox-2 が本モデルにおける疼痛に関与する可能性が示唆され、急性膵炎における疼痛のメカニズムの一部を解明した。

研究成果の概要（英文）：

First, we found that the mRNA levels of interleukin-1b and monocyte chemotactic protein (MCP)-1 were significantly increased in the pancreas of caerulein-treated mice. The sensitivity of abdominal organs was enhanced in caerulein-injected mice, suggesting that caerulein caused pancreatic hyperalgesia. Moreover, repeated treatment with caerulein resulted in cutaneous tactile allodynia of the upper abdominal region indicating that caerulein-treated mice exhibited referred pain.

Under this condition, the mRNA level of cox-2 was significantly increased in the spinal cord. The mRNA levels of bradykinin B1 receptor (BKB1R) and bradykinin B2 receptor (BKB2R) were significantly increased in the dorsal root ganglion.

Finally, we found that intrathecal injection of celecoxib (selective cox-2 inhibitor) attenuated the acute pancreatitis pain-like state in caerulein-treated mice.

These findings suggest that the upregulation of cox-2 in the spinal code and BK receptors in the DRG may, at least in part, contribute to the development of the acute pancreatitis pain-like state in mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,900,000	570,000	2,470,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔蘇生学

キーワード：疼痛管理学

1. 研究開始当初の背景

急性膵炎に罹患したほぼ全患者が非常に強い疼痛（内臓痛および関連痛）を訴えるが、この疼痛は呼吸・循環機能に影響し全身状態を更に悪化させる。この疼痛による悪循環を予防・解除するために、早期からの十分な除痛が必要とされるが、この疼痛には NSAIDs が奏効しない。

一方で、オピオイド系の鎮痛薬は除痛に有効であるが、oddi 筋を収縮させることにより、膵臓での膵液滞留から膵炎の悪化を招く危険性があり、治療上の大きな課題となっている。これまでの急性膵炎に関する研究では、患者にとって強い苦痛であり全身状態を悪化させる要因であるにもかかわらず、「疼痛」に注目した検討は非常に少ない。

2. 研究の目的

今回の研究では、急性膵炎モデル動物を作製し、疼痛治療のターゲット分子を明らかにし、末梢ならびに中枢神経系における疼痛関連分子の変化を多角的に検討し、最終的には疼痛治療のための方法論の確立および新たな薬物の開発をめざすことを目的とした。

3. 研究の方法

C57BL/6J 系雄性マウス（20-25 g）を使用し、caerulein 50 μ g/kg を1時間ごとに6回腹腔内投与することにより急性膵炎モデルを作製する。なお、caerulein はカエル皮膚由来の生理活性ペプチドであり、胆嚢を刺激するコレシストキニンのアナログであり、caerulein 処置により、膵組織の傷害をきたすことは既に確認している。

今回の研究では、この caerulein を使用し、以下の検討を行った。

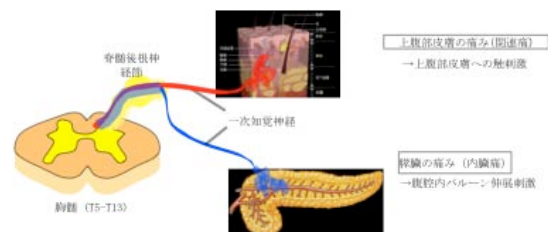
1) Caerulein 処置による急性膵炎モデルの

確立

このモデルにおいて、RT-PCR 法に従い膵臓での各種サイトカイン・ケモカインの発現レベルを測定することにより膵臓での炎症を示し、caerulein 誘発急性膵炎モデルを信頼度のより高いモデル動物として確立する。

2) Caerulein 誘発急性膵炎モデルにおける疼痛の評価

Caerulein 誘発急性膵炎モデルにおいて、疼痛閾値の変化を検討する。内臓痛の評価には腹腔内に挿入したバルーンに空気を注入することによるバルーン伸展刺激、関連痛の評価には腹部皮膚に対する von frey filament 刺激を用いる。これらにより、このモデルが同疾患に伴う疼痛（内臓痛・関連痛）を再現するモデルであることを明らかにする。



3) 急性膵炎における疼痛発現機序の検討

中枢神経（胸髄）、末梢神経（DRG）において、RT-PCR 法ならびに免疫染色法に従い、各種サイトカイン・ケモカイン・疼痛関連分子等の m-RNA 発現量、ならびに免疫活性を検討する。これにより、急性膵炎における疼痛発現の機序を詳細に検討する。

4. 研究成果

1) RT-PCR 法に従い、膵臓内での炎症性ケモカインならびにサイトカイン遺伝子発現

の変化について検討を行った。その結果、IL-1 β やMCP-1のmRNAの発現亢進を認め、本モデルにおける膝での炎症をより詳細に明らかにした。

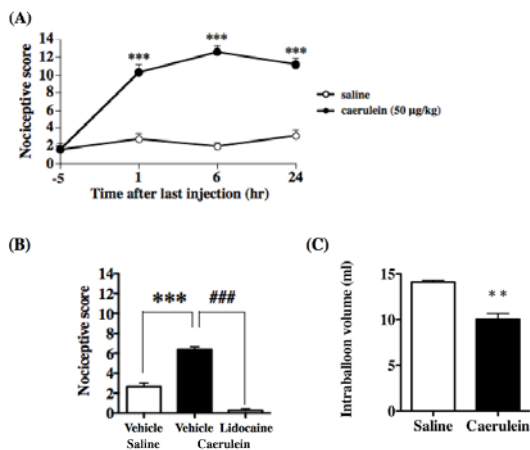
2) Caerulein 誘発急性膝炎モデルにおける疼痛の評価

von Frey フィラメントを用いて上腹部領域を触刺激した際のマウスの逃避行動をスコア化して評価した結果、caerulein 処置したマウスにおいては触刺激に対する過敏反応を示し (図1 (A))、それはリドカインの刺激部位への皮内投与により抑制されたため (図1 (B))、caerulein の繰り返し投与により関連痛を生じると考えられた。

また caerulein を処置したマウスは、saline 処置マウスよりも少量の空気を腹腔内に挿入したバルーンに注入することで逃避行動を示した (図1 (C))。このことより、caerulein は膝臓での知覚/痛覚過敏を引き起こすと考えられた。

以上より、本モデルマウスは急性膝炎の疼痛面をも再現することが明らかとなった。

[図1]



3) 急性膝炎における疼痛発現機序の検討

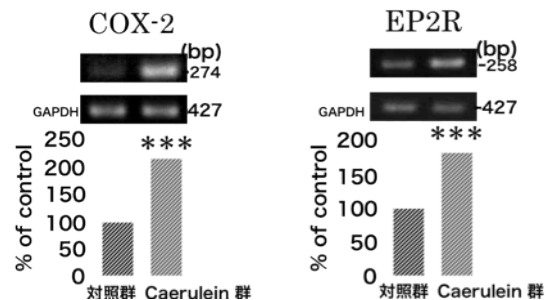
中枢神経 (胸髄)、末梢神経 (DRG) において、RT-PCR 法ならびに免疫染色法に従い、各種サイトカイン・ケモカイン・疼痛関連分子

等の m-RNA 発現量、ならびに免疫活性を検討した。

まず、胸髄における各種 m-RNA 発現レベルの変化を検討した。その結果、炎症性サイトカイン・ケモカインに関して IL-1 β , MCP-1, MCP-2 の発現は変化を認めなかった。

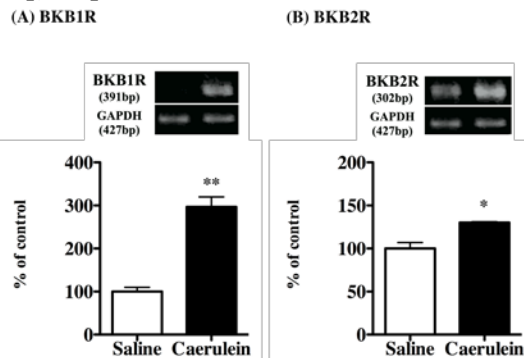
一方、cox 関連因子について検討を行ったところ、cox-1 の発現には変化を認めなかったものの、caerulein 群において cox-2, EP2R m-RNA 発現レベルの有意な増加を認めた (図2)。また、cox-2 を選択的に阻害する celecoxib 投与による疼痛の変化を検討した。その結果、celecoxib の髄腔内投与は、用量依存性に caerulein により誘発される関連痛を抑制した。この結果から、中枢神経系における cox-2 が本モデルにおける痛みに関与する可能性が示唆された。

[図2]



また、脊髄後根神経節において検討を行ったところ、末梢組織の炎症時に誘導されるブラジキニン (BK) の受容体である bradykinin B1 receptor (BKB1R) と bradykinin B2 receptor (BKB2R) に関して、BKB1R ならびに BKB2R の m RNA 発現は本モデルにおいてともに著明な増加を認めた (図3)。

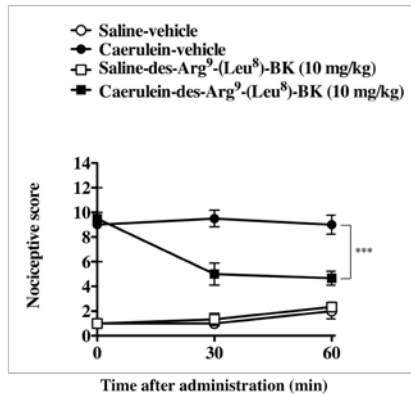
[図3]



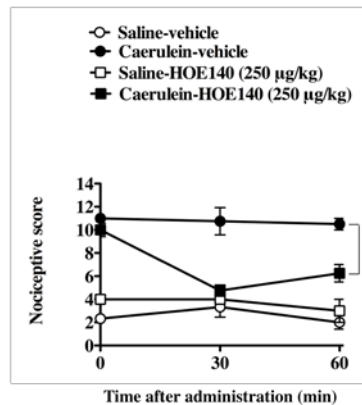
一方、caerulein 反復投与 6 時間後に des-Arg⁹-(Leu⁸)-bradykinin (BKB1R 拮抗薬)、HOE-140 (BKB2R 拮抗薬)の腹腔内単回投与を行った。その結果、caerulein を処置したマウスで見られていた内臓感覚過敏ならびに上腹部のアロディニア反応はいずれの薬物においても有意に抑制された(図4)。

[図4]

(A) BKB1R antagonist (des-Arg⁹-(Leu⁸)-BK)



(B) BKB2R antagonist (HOE-140)



さらに、BK により活性化することが知られている TRPV1 に関して検討を行ったところ、TRPV1 拮抗薬である BCTC 投与により caerulein 投与に伴う内臓痛ならびに関連痛は抑制された。

また whole-cell patch clamp 法に従い、本モデルの脊髄後根神経節神経細胞において検討を行ったところ、活動電位発生頻度の増加および活動電位発生閾値の低下を認めた。この変化は、BCTC 投与により抑制されることを明らかにした。

これらの結果より、末梢神経系における BK-TRPV1 経路が本モデルでの痛みに関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

竹村佳記、大石美緒子 他
慢性疼痛モデルと比較したセルレイン誘発急性膝炎モデルでの疼痛発現機構の検討
日本臨床麻酔学会
平成 23 年 11 月 4 日 (沖縄)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 美緒子 (OISHI MIOKO)
富山大学・大学病院・助教
研究者番号：10536733

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：