

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 5 月 16 日現在

機関番号：24303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890159

研究課題名（和文） 痛覚過敏におけるトロンボモジュリンの細胞内シグナリングのメカニズム解明

研究課題名（英文） Advances in the understanding of mechanisms of intracellular signaling by thrombomodulin in the hypersensitivity state

研究代表者

柴崎 雅志 (SHIBASAKI MASAYUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20405319

研究成果の概要（和文）：

神経障害性疼痛モデルである SNL モデルラットの一次知覚神経において HMGB-1 の発現量増加が認められた。SNL モデルラットに HMGB-1 中和作用のあるトロンボモジュリンを投与し、痛覚閾値の変化を検討した結果、トロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果を認めた。SNL モデルラットに投与されたトロンボモジュリンは熱刺激、機械刺激両方の痛覚閾値の低下を抑制したものの、その細胞内シグナリングまでは解明できなかった。またトロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果には用量依存性が認められた。

研究成果の概要（英文）：

We found out an increase in HMGB-1 protein expression in the primary sensory neurons after spinal nerve ligation (SNL). We examined the thresholds to painful stimuli after thrombomodulin, which could neutralize the efficacy of HMGB-1, was injected into the sciatic nerve of SNL model rats. We found out that thrombomodulin alleviated pain hypersensitivity. Although thrombomodulin, which was injected to SNL model rats, could alleviate the thresholds both heat and mechanical stimuli, we failed to figure out mechanisms of intracellular signaling. Moreover we found out the dose dependency of the efficacy of thrombomodulin to the pain hypersensitivity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,150,000	345,000	1,495,000
2011 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,200,000	660,000	2,860,000

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：痛覚過敏、トロンボモジュリン、細胞内シグナリング

1. 研究開始当初の背景

全身炎症や神経損傷による痛覚過敏発症のメカニズムは解明されつつあるが、未だ不明な点も多い。炎症性サイトカインである HMGB-1 (High Mobility Group Box Protein-1)は敗血症における臓器障害に重要な役割を果たしていることが報告されており、また HMGB-1 が痛覚過敏を引き起こすことも報告されている。過去の報告によると HMGB-1 は RAGE (Receptor for Advanced Glycation End-products)や TLR (Toll-Like Receptor)-2,4 の発現を増大させ、これらの受容体を介し、p38MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase)のリン酸化や NF- κ B を活性化させる。更に我々は HMGB-1 中和抗体に痛覚過敏抑制効果があることを既に報告している。

近年、トロンボモジュリンが敗血症ラットの臓器障害を改善することが報告されており、そのメカニズムに HMGB-1 が関与している。このように HMGB-1 が痛覚過敏に関与していること、またトロンボモジュリンが HMGB-1 産生抑制効果があることによりトロンボモジュリンが痛覚過敏を抑制する可能性がある。

2. 研究の目的

敗血症モデルにおけるトロンボモジュリンの治療効果は HMGB-1 産生抑制であることが報告されているが、痛覚過敏におけるトロンボモジュリンの治療効果を見た報告はない。HMGB-1 が痛覚過敏を惹起すること、HMGB-1 の中和抗体が痛覚過敏を抑制することより、トロンボモジュリンが痛覚過敏を抑制することが予想される。

神経障害性疼痛モデルにおけるトロンボ

モジュリンの痛覚過敏抑制効果を行動解析法とともに HMGB-1,RAGE の発現変化を解析し、それらの機能を調査する。

3. 研究の方法

雄性 SD (Sprague Dawley)ラットを 2%のイソフルランで全身麻酔後、脊髄神経 L4,L5 を露出し、L5 脊髄神経を結紮することで神経障害性疼痛モデル (Spinal Nerve Ligation model; SNL model)を作成した。

痛覚閾値の評価は行動解析法として、熱刺激に対する逃避時間、機械刺激に対する反応閾値を測定することで行った。熱刺激に対する閾値の定量化は 50°C に熱した Hot Plate に対する反応潜時を測定することで行い、機械刺激に対する閾値の定量化は von Frey Filament を用いて行った。

SNL モデルラットを作成し、神経結紮部位にトロンボモジュリンを投与し、行動解析法により痛覚閾値を測定した。痛覚閾値の測定は SNL モデル作成前、作成後 3,5,7 日目に実施した。

トロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果に対する用量依存性を検証するため、トロンボモジュリンの投与量を変化させた際の SNL モデルにおける痛覚閾値を測定した。痛覚閾値の測定は SNL モデル落成後 7 日目に実施した。

熱刺激に対するトロンボモジュリンの治療効果を免疫組織化学的に検証するため、TRPV1 陽性細胞数の割合を調査した。

一次知覚神経における HMGB-1 タンパク質の定量には Real-Time (RT)-PCR 法及び ELISA 法を用いた。

また HMGB-1 の発現を免疫組織化学法により調査した。

4. 研究成果

神経障害性疼痛モデルにおけるトロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果を HMGB-1 に焦点をあて調査した。

トロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果

トロンボモジュリンは SNL モデルラットにおける機械刺激に対する痛覚過敏を SNL モデル作成後 5 日目より有意に抑制した。

一方、熱刺激に対する痛覚過敏は SNL モデル作成後 3 日目より有意に抑制した。

以上のことより、SNL モデルラットにおいてトロンボモジュリンは機械刺激及び熱刺激に対する痛覚過敏を抑制することが示唆された。

トロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果に対する用量依存性

トロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果は用量依存性に増強することが分かった。

熱刺激に対するトロンボモジュリンの痛覚過敏抑制効果の免疫組織化学的検討

TRPV-1 陽性細胞の割合は SNL 群でコントロール群及び SNL モデル+トロンボモジュリン投与群と比較し、有意に高かった。

トロンボモジュリンの HMGB-1 及び RAGE 抑制効果の免疫組織化学的検討

コントロール群、SNL モデル群及び SNL モデル+トロンボモジュリン投与群の全てで一次知覚神経における HMGB-1 及び RAGE 発現が認められた。コントロール群と比較し、SNL モデル群及び SNL モデル+トロンボモジュリン投与群において HMGB-1 及び RAGE の発現量増加が認められた。

一次知覚神経における HMGB-1 タンパク質量の定量的検討

L4 一次知覚神経では HMGB-1 タンパク質量は SNL モデル作成後 1 日目で増加し、その後次第に減少した。一方、L5 一次知覚神経では SNL モデル作成後 3 日目まで増加し、その後次第に減少した。

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 2 件)

- ① Shibasaki M, Sasaki M, Miura M, Mizukoshi K, Ueno H, Hashimoto S, Tanaka Y, Amaya F. Induction of high mobility group box-1 in dorsal root ganglion contributes to pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. Pain 2010;113(4):819-24.
- ② Miura M, Sasaki M, Mizukoshi K, Shibasaki M, Izumi Y, Shimosato G, Amaya F. Peripheral sensitization caused by insulin-like growth factor 1 contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. Pain 2011;152(4):888-95.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Izumi Y, Miura M, Sasaki M, Mizukoshi K, Shibasaki M, Shimosato G, Amaya F. Peripheral sensitization caused by insulin-like growth factor 1 contributes to pain hypersensitivity after tissue injury. International Association for the Study of Pain 13 World Congress of Pain, Montreal, Canada, 2010.

② Mizukoshi K, Sasaki M, Izumi Y, Miura M, Shibasaki M, Amaya F. Activation of p38 MAP kinase in the DRG contributes to pain hypersensitivity after plantar incision. International Association for the Study of Pain 13 World Congress of Pain, Montreal, Canada, 2010.

③ 水越圭子、和泉勇太、佐々木美香、三浦真由美、柴崎雅志、天谷文昌。ラット術後痛モデルの一次知覚神経における p38MAPキナーゼのリン酸化。日本麻酔科学会第 57 回学術集会,福岡,2010.

④ 三浦真由美、佐々木美佳、水越圭子、柴崎雅志、下里豪俊、天谷文昌。インスリン様成長因子 IGF-1 による痛覚過敏の発現。日本麻酔科学会第 57 回学術集会,福岡,2010.

⑤ 水越圭子、和泉勇太、佐々木美香、三浦真由美、柴崎雅志、天谷文昌。ラット術後痛モデルの一次知覚神経における p38MAPキナーゼのリン酸化。日本ペインクリニック学会第 44 回大会,京都,2010.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴崎 雅志 (SHIBASAKI MASAYUKI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：20405319