

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2011～2015

課題番号：23592169

研究課題名(和文) ラット髄核留置モデルにおける全身または局所ストレス負荷が及ぼす疼痛関連行動

研究課題名(英文) The effect of non-noxious stimulation and repeated restraint stress on pain-related behavior in a nucleus pulposus applied rat model.

研究代表者

関口 美穂 (Sekiguchi, Miho)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00381400

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：髄核留置モデルにおける疼痛閾値の低下は、ストレス負荷により閾値低下が持続した。局所刺激負荷では、ストレスの指標の変化は認められなかった。全身拘束負荷により、後神経根内のサイトカインの発現ピークが遅延し、組織学的に神経へも影響した。閾値低下の持続と神経回復の遅延との関連が示唆された。難治性疼痛の要因の一つであるストレスの神経への影響は、治療方策のさらなる検討の必要性を示唆する結果である。

研究成果の概要(英文)：Both non-noxious stimulation and repeated restrain stress effect to last the reduction of mechanical withdrawal threshold in the nucleus pulposus applied rats model. The stress markers did not change according to the non-noxious stimulation, while the repeated restrain stress influence the delayed cytokain expression and histological nerve tissue changes. These results might suggest that the relationship between the pain-related behavior and nerve recovery. Stress is one of the triggers for chronicity of pain and furthermore studies are needed to investigate an influence on nerve tissue and it's an important proof for treatment strategy.

研究分野：脊髄脊髄病

キーワード：慢性疼痛 疼痛関連行動 ストレス 腰椎疾患

1. 研究開始当初の背景

腰椎椎間板ヘルニアは、腰椎の代表的な疾患の一つである。ヘルニア塊の大きさと症状の程度は一致しないことと、MRI画像で椎間板の膨腫が認められるにも関わらず、無症状の症例が約30%に認められることが報告されるようになった(Boden S, et al JBJS 72, 1990)。以上のことから、ヘルニア塊による神経の圧迫(=機械的因子)のみならず、炎症性サイトカインなどの化学的因子が症状発現に関与していると考えられている。手術によるヘルニア塊の除去が必ずしも必要ではないことと、保存療法が有効な症例が多く、予後の良好な腰椎疾患である。しかし、中には疼痛が慢性化し、治療難航例が認められる。慢性化の機序は、複雑であり、原因病態の他に、心理・社会的因子の関与がリスク因子の1つとして知られている。痛みは「情動的体験」でもあり、脳における情動的な認知の違いによって、個人の感じる疼痛に違いが生じることが知られている。また、慢性腰痛患者が抱える心理的・社会的問題が、その疼痛の認知を歪めている可能性も考えられる。我々は、慢性腰痛患者と正常ボランティアにおける脳活動の変化を、機能的脳画像のfunctional-MRI (fMRI)を用いて解析を行った。その結果、慢性腰痛患者では、同等のVASを感じる圧痛の強さが、正常者よりも低く、疼痛閾値の低下が認められることが判明した。さらに、腰部の圧痛刺激に対して、正常者では認められない不快を感じる脳領域に、脳活動がみとめられることが明らかとなった(Kobayashi Y, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al Spine in press 2009)。以上の事実は、慢性化した疼痛は、正常の疼痛刺激に対する反応経路が異なるということを示唆している。

我々は、基礎研究において、機械的圧迫因子を反映したモデルとして、ロットを用いて神経を圧迫する神経圧迫モデルと、化学的因

子を反映したモデルとして、神経に髓核を留置する髓核留置モデルを用いて検討を行っている。実験的検討で、疼痛閾値の低下が惹起される神経根圧迫モデルでは、絵筆の刺激によって脊髄後角での c-fos の発現が増強することということを報告した(Watanabe K, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al Spine 32, 2007)。これは、正常では疼痛を感じない刺激で、神経圧迫群では疼痛を引き起こすということを示唆している。さらに、片側の神経損傷により、反対側(正常側)の疼痛関連行動が誘発され、正常側の脊髄レベルでのミクログリア細胞の増加や正常側の後根神経節での tumor necrosis factor -alpha(TNF)が増加することを報告した(Hatashita S, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al Spine 33, 1344-1351, 2008)。

我々は、腰椎椎間板ヘルニアを模した髓核留置(NP)モデルを用いて、拘束の有無による疼痛関連行動を比較した。拘束あり(RS)群は、拘束を6時間/日を6週間施行した。拘束負荷ありの髓核留置モデル(NP+RS)群では、拘束負荷のない髓核留置モデル(NP)群と比較して有意に疼痛閾値の低下が持続することが判明した(Uesugi K, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al ISSLS 2008)。以上のことから、疼痛閾値の低下している状況でのストレス負荷により、脳、脊髄、および後根神経節(DRG)において、疼痛に対する反応が惹起され、疼痛慢性化の一機序となっている可能性がある。

2. 研究の目的

慢性疼痛は、ストレスを含む心理・社会的因子が関与している。腰椎疾患においても、難治性の疼痛を有する症例が存在する。また、疾患や障害の程度に関わらず、慢性疼痛を呈する症例が存在する。このような病態のメカニズムを解明するために、腰椎疾患モデルに対し、全身または局所のストレスの有無により、局所における疼痛関連行動と、末梢およ

び中枢神経障害の程度に相違が認められるか否かについて検討することである。

3. 研究の方法

SD 雌系ラットを使用し、実験系として、髄核留置(NP)群と sham 群を設定し、ストレスの有無により4群に分類した。全身麻酔下に、第4・5腰椎椎間関節を切除し、第5腰神経(L5)と後根神経節(DRG)を展開した。NP 群のラットには尾椎より椎間板髄核を採取し、DRG に留置した。Sham 群のラットは、NP 群と同様の手術手技で髄核を留置しないモデルとした。

ストレス負荷は、非侵害刺激方法 (Sti) と拘束負荷(Chronic restraint stress : RS)の2種類を設定した。

A. シリーズ1

Sti は、絵筆を用いて(Watanabe K, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al Spine 32, 2007)、左足底に5分間連続で刺激をした。モデル作製1日目より連日2週間の負荷を実践した。

行動学的検討として、von Frey test を用いて、両下肢足底の疼痛の閾値を術前から術後42日目まで測定した。ストレス負荷14日目に、採血し、血清コルチコステロン値とナチュラルキラー細胞(NK 細)を測定した。行動学的検討時の42日目に、DRG を採取し、組織薄切を作製し、神経損傷マーカー(GAP43)を染色し、陽性細胞数を計測し比較した。

B. シリーズ2

RS は、金網性の拘束器具を用いて、6時間/日を連日6週間行った(Uesugi K, Sekiguchi M, Konno S, Kikuchi S, et al ISSLS 2008)。モデル作製1日目より連日2週間の負荷を実践した。行動学的検討時の42日目に、DRG を採取し、組織薄切を作製し、神経損傷マーカー(GAP43)を染色し、陽性細胞数を計測し比較した。

ウエスタンブロット法で、DRG 内の

TNF-alpha(サイトカイン)の発現を、術後7日目から7日ごとに28日目まで計測した。

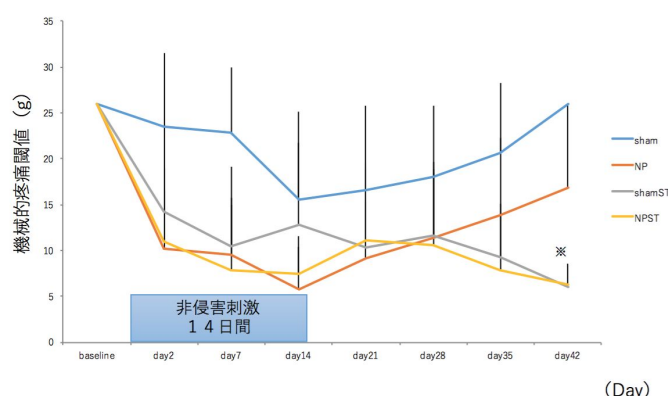
C. ストレス負荷なし群での検討

ストレス負荷のない髄核留置(NP)群と sham 群を用いた。備品で購入した機器を用いて real time PCR 法にて、経時的に神経損傷のマーカー(ATF3)、虚血のマーカー(HIF-1alpha)、TNF-alpha(サイトカイン)の mRNA の発現を比較した。

4. 研究成果

A. シリーズ1

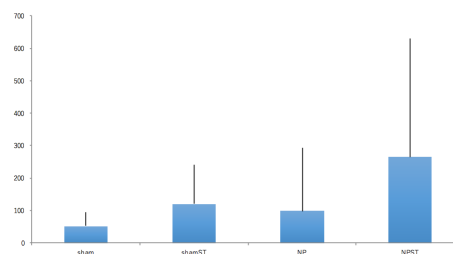
1) 行動学的検討



Sit 負荷のない NP 群(赤線)は、術後28日目まで sham 群と比較して優位に疼痛閾値が低下し、術後35日目から疼痛閾値の低下が改善した。Sit 負荷をかけた NP(NPST)群は、術後42日目まで疼痛閾値の低下が持続した。Sit 負荷をかけた sham(sham ST)群は、疼痛閾値が低下した。

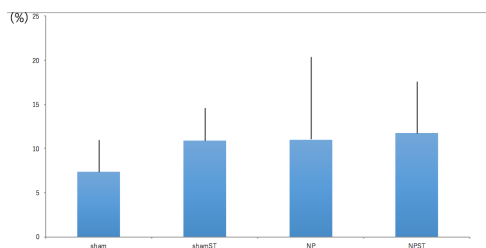
2) ストレス指標

血清コルチコステロン(ng/ml)



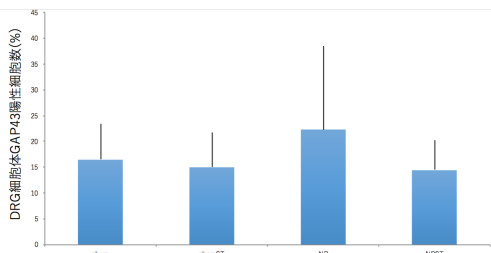
Sti 負荷の有無にかかわらず、4群間で統計学的に有意な差はなかった。

NK 細胞活性 (%)



Sti 負荷の有無にかかわらず、4 群間で統計学的に有意な差はなかった。

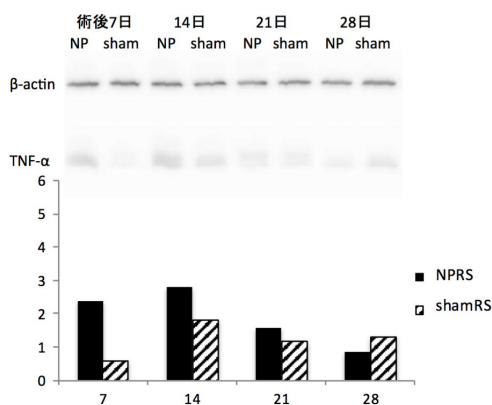
3) 免疫組織学的検討：神経再生



神経再生マーカーである GAP43 は、Sti 負荷による 4 群間での統計学的に有意な差は認められなかった。

B. シリーズ 2

1) RS 負荷あり群での TNF-alpha の発現変化



我々の先行研究では、RS ストレス負荷のない NP 群では、DRG 内での TNF 発現量は、術後 7 日まで有意に増加する (Kobayashi H, et al Spine 36, 210-8, 2011)。本研究では、RS ストレスのある NP(NPRS)群では、sham 群と比較して術後 14 日目まで TNF の発現量が有意に増加した。

2) 免疫組織学的検討：神経再生

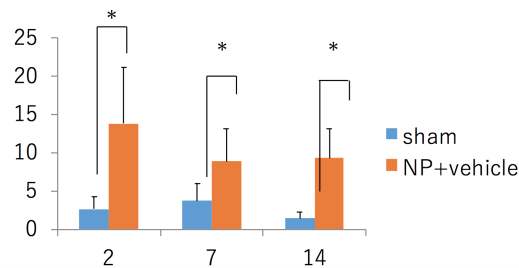
我々の先行研究では、神経再生マーカーである GAP43 陽性細胞数は、ストレス負荷のない NP 群では、術後 14 日から 28 日まで sham 群と比較して有意に増加する (Miyoshi S, et al Spine 2010)。全身拘束負荷の有無では、42 日目に NP(+拘束)群で有意に陽性細胞数が増加した。神経の回復時期に相違があることが示唆される。

い NP 群では、術後 14 日から 28 日まで sham 群と比較して有意に増加する (Miyoshi S, et al Spine 2010)。全身拘束負荷の有無では、42 日目に NP(+拘束)群で有意に陽性細胞数が増加した。神経の回復時期に相違があることが示唆される。

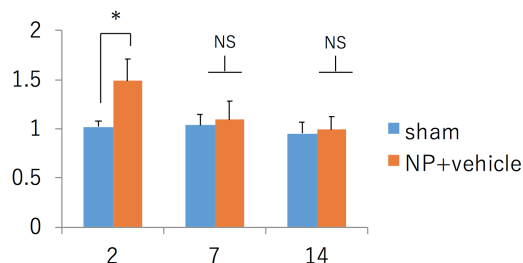
C. ストレス負荷なし群での検討

1) real time PCR を用いての mRNA の発現

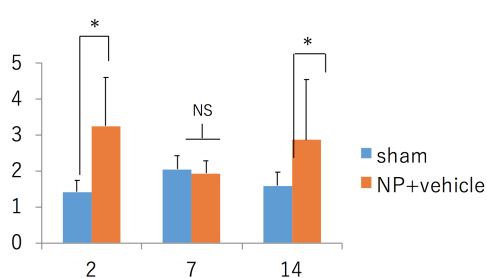
神経損傷マーカー:ATF3



虚血マーカー:HIF1-alpha



サイトカイン:TNF-alpha



NP 群では、神経損傷と虚血のマーカー-mRNA の発現が sham 群と比較し、有意に増加した。TNF では、術後 2 日目と 14 日目に有意な差を認めたが術後 7 日目に差はなかった。我々の RS 負荷に対する先行論文(Uesugi K, et al Eur Spine J 2011)と、本研究での Sti 負荷による行動学的検討では、ストレスの種類にかかわらず疼痛閾値の低下が負荷のない群と比較し持続することがあきらかとな

った。しかしながら、ストレス負荷の指標では、Sti 負荷で差がなかったことから、RS 負荷とは別な機序で疼痛閾値の低下が持続することが示唆される。神経再生は、ストレス負荷の有無により疼痛閾値の相違が認められた 42 日目の評価であったが、RS 負荷と Sti 負荷での神経再生状況が異なることが示唆された。神経損傷の持続との関連が示唆される。後根神経節の組織を用いての RNA 調整が手技的に安定しなかったことから、第1段階として、ストレス負荷無し群での検討にて、神経損傷と虚血の状態を mRNA とタンパク発現量の結果出すことができた。第2段階としてストレス負荷あり群での mRNA とタンパク発現の測定を実施中であるが、研究期間内に結果を得ることができなかつたため、今後も継続する予定である。また、臨床においては慢性疼痛の症例では脳体積の減少が認められることが報告されている。予備検討として、慢性疼痛での脳萎縮を検討したが、ストレス負荷の有無による相違が認められなかった（揭示データなし）。本モデルは臨床に即した病態を再現していることから、疼痛閾値の低下が自然回復することで、神経損傷が弱いことにより脳変化を捉えにくい可能性がある。そこで、当講座の臨床研究の機能的脳画像検査で着目している慢性疼痛に關与する脳部位（側坐核:NAc, 中脳水道:PAG）での組織学的検討ができるかについて予備検討を行い、脳部位別でのミクログリアの発現、オピオイド受容体の発現を、ストレス負荷無し群で検討後に、ストレス負荷の有無で今後比較を予定している。先行論文にて、ストレス負荷のない本モデルに対する抗うつ薬の投与効果を評価している（Saito H, et al. Eur Spine J 23: 2401-9, 2014, Handa J, et al. Eur Spine J 25: 877-87, 2016）。当該論文と過去の報告論文から、本来の抗うつ薬の作用経路とは別の作用機序により鎮痛効果がみとめられる。ストレス負荷のに伴う疼痛関連行動への影響

を評価するためには、RS 負荷が適切であり、今後の投薬による検討には、RS 負荷の有無による比較評価が必要である。

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 2 件)

1. Sekiguchi M, Kikuchi S, Konno S. The effect of non-noxious stimulation in pain-related behavior induced by nucleus pulposus applied on the nerve root in rats. ISSLS Amsterdam, May 28-Jun1, 2012

2. Sekiguchi M, Kikuchi S, Konno S: The effect of non-noxious stimulation in pain-related behavior compared with repeated restraint stress in an experimental nucleus pulposus applied rat model. The 44 th NIPS international symposium and the 5th Asian Pain Symposium. (Dec. 18-20, Okazaki, Aichi, Japan), P21, 2013.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

関口 美穂 (SEKIGUCHI Miho)

公立大学法人福島県立医科大学医学部・准教授

研究者番号：00381400

(2)研究分担者

菊地 臣一 (KIKUCHI Shinichi)
公立大学法人福島県立医科大学医学部・理
事長兼学長

研究者番号：80045773

紺野 慎一 (KONNO Shinichi)

公立大学法人福島県立医科大学医学部・教
授

研究者番号：70254018

(3)連携研究者

()

研究者番号：