

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590728

研究課題名(和文) 神経障害痛に対する間欠的高周波照射の作用メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Effect of pulsed radiofrequency current on expression of substance P, CGRP, and BDNF in the DRG neurons of neuropathic pain model rats induced by resiniferatoxin

研究代表者

田中 信彦 (Tanaka, nobuhiko)

宮崎大学・医学部・講師

研究者番号：30264394

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)： レシニフェラトキシン(RTX)による神経障害痛モデルラットを用いて間欠的高周波照射(PRF)の後根神経節(DRG)ニューロンでの蛋白発現への影響を調べた。

RTXによりDRGニューロンでのサブスタンスP、カルシトニン遺伝子関連ペプチドおよび脳由来神経栄養因子の発現レベルは減少したが、PRFによってこれらの蛋白発現は回復した。神経障害痛の対するPRFの作用メカニズムの1つとして、PRFがDRGニューロンでの神経伝達物質や神経栄養因子の発現レベルに影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)： We examined the Pulsed Radiofrequency (PRF) mechanism by evaluating the protein expression level in the dorsal root ganglion (DRG) of neuropathic pain model rats induced by resiniferatoxin.

We demonstrated that expression levels of Substance P, calcitonin gene-related peptide, and the brain-derived neurotrophic factor in the DRG neurons were decreased by RTX, and that PRF current restored these proteins' expression levels. We propose that one of mechanisms of PRF current to neuropathic pain may be the modulatory effect of neurotransmitter and neurotrophic factor expression in the DRG neurons.

研究分野：疼痛学

キーワード：パルス高周波法

1. 研究開始当初の背景

神経障害痛は、末梢あるいは中枢神経系の損傷や機能異常によって起こる。通常では痛みを引き起こさない弱い刺激により痛みを生じるアロディニアは、神経障害痛の一般的特徴の1つである。神経障害痛はしばしば慢性化し、消炎鎮痛薬には反応せずに抗てんかん薬や抗うつ薬に反応する傾向にある。平成19年に世界疼痛学会より出された神経障害痛に対する薬物療法の指針では、第1選択薬として三環系抗うつ薬や2-カルシウムチャネルリガンドなどが挙げられている (Pain 132: 237-251, 2007)。しかし、神経障害痛の治療に関するメタ解析 (Pain 118: 289-305, 2005) によると、三環系抗うつ薬は2~3人に1人、2-カルシウムチャネルリガンドのギャバペンチンは5人に1人しか有効でない。

これらの薬物療法と併用して、研究代表者らは神経ブロックを鎮痛手段として用いてきた。硬膜外ブロック、神経根ブロックや交感神経ブロックなどである。さらにアルコールや熱凝固による神経破壊を行うこともあったが、運動麻痺などの合併症もあり、有効性に限界がある。

研究代表者らは8年前より、帯状疱疹後神経痛 (PHN) などの神経障害痛に対する新しい治療法として間欠的高周波照射 (pulsed radiofrequency: PRF) を行っている。

PRF は、罹患神経に高周波をパルス状にかけ、高電圧下に針先端温度を42以下に保つ、電場による治療法である。電場による作用が主であり熱による組織障害が少なく、長期の疼痛軽減効果があるとされている。

平成15年4月から平成18年3月までに帯状疱疹関連痛痛に対して行ったPRFの有効性について検討した結果 (日本ペインクリニック学会誌 13: 299, 2006)、帯状疱疹発症から6ヵ月以内であれば、長期間の鎮痛効果が期待できる有用な治療法であると考えられた。また、変形性脊椎症による頸肩腕部痛患者や坐骨神経痛患者にPRFを施行し良好な結果を得ている (日本ペインクリニック学会誌 15: 169, 2008)。

PRFの有効性や作用機序に関する基礎的研究は少ない。研究代表者らはTRPV1受容体の強力なアゴニストであるレシニフェラトキシン (RTX) を用いてラットの神経障害痛モデルを作成し、機械的アロディニアに対するPRFの有効性について研究を行った。その結果、PRFは機械的アロディニアの早期 (1週間以内) に行えば、より効果的であることが明らかになった (図1)。また、PRFの照射時間を2分間から6分間に延長すると運動機能を障害することなく抗アロディニア作用が有意に増強することが明らかになった (図2)。本研究により得られた知見は、6分間のPRFが早期の神経障害痛の有効な治療法となることを強く示唆するものである (Anesth Analg 111: 784-90, 2010)。このように研究

代表者らは臨床と基礎的実験の両方でPRFの有効性を証明している。

しかしながら、なぜPRFが神経障害痛に有効であるのか、PRFの作用メカニズムについては十分に解明されていない。Hamannらの研究では、ラットの後根神経節 (DRG) 近傍に間欠的高周波を照射すると、DRGの小型ニューロンに活性化転写因子3 (ATF3) が発現することがわかっている (Eur J Pain 10: 171-76, 2005)。末梢神経へのPRFがDRGニューロンに何らかの影響を及ぼしていることが推測できる。

神経障害痛で認められる機械的アロディニアのメカニズムの1つとして、正常時には侵害求心線維 (CおよびA線維) が終わる脊髄後角の第1層に、触覚を伝えるA線維の側芽が伸びて新たなシナプスを形成することが明らかになっている。このA線維の側芽によるシナプス形成にはDRGで産生される脳由来神経栄養因子 (BDNF) が関与していると考えられている。また、神経障害痛ではDRGの中型および大型ニューロンに、正常では発現しないサブスタンスPやカルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) が発現することがわかっている (J Neurosci Res 37: 596-603, 1994)。これも神経障害痛の痛覚過敏の原因の1つと考えられている。

このように神経障害痛では、DRGニューロンにおける遺伝子発現の変化が痛覚過敏やアロディニアの重要なメカニズムである。PRFのDRGニューロンでの遺伝子発現への影響を調べることで、神経障害痛に対するPRFの作用メカニズムが明らかになると考えた。

2. 研究の目的

RTXによる神経障害痛モデルラットを用いて、PRFのDRGニューロンでの遺伝子発現への影響を調べることで、神経障害痛に対するPRFの作用メカニズムを検討する。

3. 研究の方法

(1) SD系雄性ラット (体重250~400g) に致死量のペントバルビタール (300mg/kg, i.p.) を投与した後、DRGを取り出す。顕微鏡下に摘出されたDRGニューロンをRTX (100nM) を含んだDMEM (ダルベッコ改変イーグル培地) とRTXを含まないDMEMでそれぞれ培養する。2日後、すべての培養をRTXを含まない培地に変更する。PRF群 (n=5) とRTX群 (n=5) の2群に分け、PRF照射群では高周波熱凝固装置 (ニューロサーモJK3) を用いて、培養したDRGニューロンにPRFを360秒間照射する。RTX群ではPRFを照射しない。PRF7日後に、免疫組織化学的にサブスタンスP、CGRPおよびBDNFを評価する。

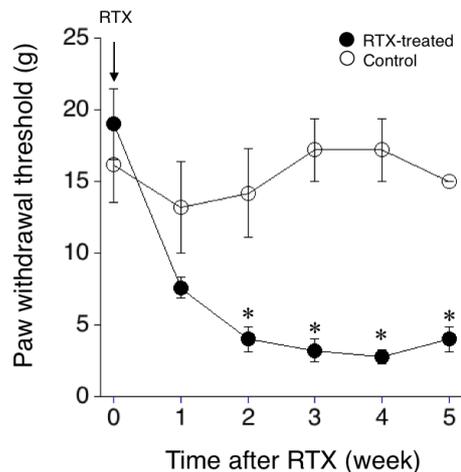
(2) SD系雄性ラット (体重250~400g) にRTX (200 µg/kg) を腹腔内投与する。1週間後、PRF照射群とPRF非照射群の2群に分け、PRF照射群では、右坐骨神経の坐骨結節部でPRFを360秒間照射する。PRF4週間後に、DRG (L4、L5)

を抽出し、ウエスタンブロット法で BDNF と CGRP の発現レベルを評価する。また、痛み行動試験として後脚足底への機械刺激 (von Frey test) に対する逃避閾値を RTX 投与前と RTX 投与 1 週間後、PRF 照射 1, 2, 3, 4 週間後に測定する。

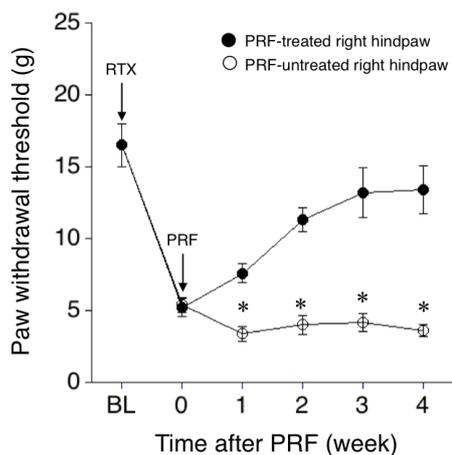
4. 研究成果

(1) RTX 処理後、培養した DRG ニューロンのサブスタンス P, CGRP および BDNF の発現レベルは、PRF 群と RTX 群ともに減少した。PRF 群では、PRF 7 日後にサブスタンス P, CGRP および BDNF の発現レベルは増加した。

(2) 痛み行動試験では、RTX を投与していない対照群 ($n=6$) に比べ、PRF 非照射群では RTX 投与 2 週間後から逃避閾値が有意に低下した (図 1)。PRF 照射群では、照射 1 週間後から非照射側 (左後脚) に対して PRF 照射側 (右後脚) で有意な逃避閾値の回復を認めた (図 2)。

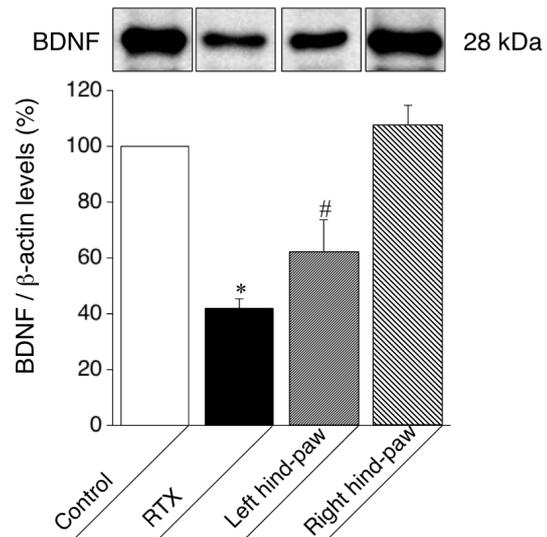


(図 1) RTX 投与による逃避閾値の変化

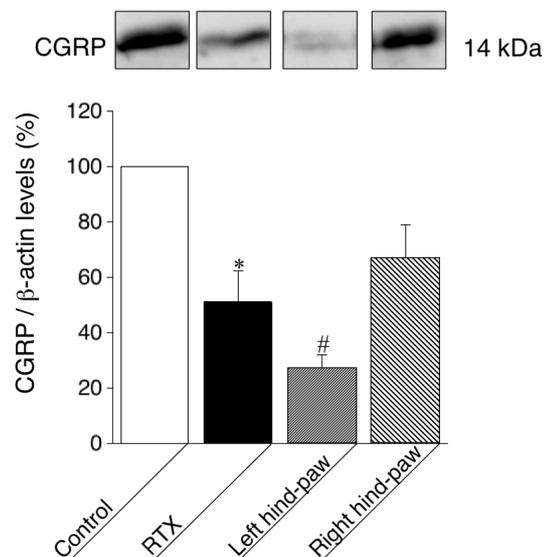


(図 2) PRF 照射による逃避閾値の変化

ウエスタンブロット法では、対照群に比べ PRF 非照射群で BDNF と CGRP の発現レベルが有意に減少していた。また PRF 照射群では、PRF 照射側が非照射側に比べ BDNF と CGRP の発現レベルが有意に増加していた (図 3, 4)。



(図 3) PRF 照射による BDNF 発現レベルの変化



(図 4) PRF 照射による CGRP 発現レベルの変化

RTX によりラット DRG ニューロンでの BDNF と CGRP の発現レベルが低下し、PRF 照射により、これらの蛋白発現レベルが回復することが示された。

神経障害痛に対する PRF の作用メカニズムの 1 つとして、PRF が DRG ニューロンでの神経伝達物質や神経栄養因子の発現レベルに影響を与えている可能性が示唆された。

<引用文献>

N Tanaka, et al.: The effect of pulsed radiofrequency current on mechanical allodynia induced with resiniferatoxin in rats. *Anesthesia and Analgesia* 111: 784-90, 2010.

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)

[学会発表](計2件)

T.Koshida, N.tanaka, T.Nemoto, T.maruta, T.Yano, T.Yonaha, M.Yamaga, K.Ishiyama, R.Takeya, I.Tsuneyoshi: Effect of pulsed radiofrequency current on expression of substance P, CGRP, and BDNF in the DRG neurons of neuropathic pain model rats induced by resiniferatoxin. ASRA 13th Annual Pain Medicine Meeting, 2014.11.13, San Francisco.

越田智広, 田中信彦, 根本隆行, 丸田豊明, 武谷立, 恒吉勇男: 神経障害痛に対する間欠的高周波照射の作用メカニズムの検討-DRGニューロンでの CGRP, BDNF の発現への影響-. 日本麻酔科学会第62回学術集会, 2015.5.29, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 信彦 (TANAKA, Nobuhiko)
宮崎大学・医学部・講師
研究者番号: 30264394

(2) 研究分担者

越田 智広 (KOSHIDA, Tomohiro)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 20441842

与那覇 哲 (YONAHA, Tetsu)
宮崎大学・医学部・助教
研究者番号: 70468023