

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592166

研究課題名(和文) 視床痛モデルマウスの確立と視床痛発症メカニズムの基礎的検討

研究課題名(英文) Development and pharmacological verification of a new mouse model of central post-stroke pain

研究代表者

有田 和徳 (Arita, Kazunori)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：90212646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：視床痛は視床の血管障害後の亜急性期に、患側の上下肢や顔面に発生する耐え難い持続的、発作性疼痛で、難治性中枢性疼痛の代表である。日常生活障害度は非常に大きく、経験的な薬物療法及び電気刺激鎮痛法がなされるが、大半は若干の軽減に留まる。視床痛出現には視床感覚中継核病変、病変周囲構造の機能異常、大脳皮質中心溝付近構造の機能変化などの要因が示唆されているが、詳しい発症機序は明らかにされておらず、有効な治療法が存在しない。その理由の1つに、適切な動物モデルが存在しないことが挙げられる。我々は、右側視床後外側腹側核に脳定位的にコラゲナーゼを微量注入する(出血病変作出)ことで、視床痛モデルマウス確立を試みた。

研究成果の概要(英文)：Central post-stroke pain (CPSP) including thalamic pain is one of the most troublesome sequelae that can occur after a cerebrovascular accident. CPSP is often treatment-refractory, painful sensations can be a major problem. To better understand of the pathophysiological basis of CPSP, we developed and characterized a new mouse model of thalamic it. This model is based on a hemorrhagic stroke lesion with collagenase in the ventral posterolateral nucleus of the thalamus. Histopathological analysis indicated that the thalamic hemorrhage produced a relatively confined lesion that destroys the tissue within the initial bleed, and also showed the presence of activated microglia adjacent to the core of hemorrhagic lesions. Behavioral analysis demonstrated using several drugs which effects were recognized clinically. These results suggest that this model might be proved as a useful animal model for studying the neuropathology of thalamic syndrome, and developing improved therapeutics for CPSP.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：アロディニア 慢性疼痛 痛覚過敏 脳内出血 ミクログリア ミノサイクリン 視床痛

1. 研究開始当初の背景

視床痛は視床の血管障害(梗塞あるいは出血)の後の亜急性期に、病変とは反対側の上下肢や顔面に発生する耐え難い持続的・発作性の疼痛であり、**難治性中枢性疼痛の代表**である。日常生活の障害度は非常に大きく、経験的な薬物療法および電気刺激鎮痛法がなされるが、申請者らも臨床報告しているように、有効例でも痛みが消失する例は稀であり、大半の例では若干の軽減に留まる(Migita et al., *Neurosurgery* 36, 1037-1040, 1995; 有田和徳、栗栖薫、*医学のあゆみ* 189, 757-762, 1999.)。視床痛の出現には視床感覚中継核病変、病変周囲構造の機能異常、大脳皮質中心溝付近構造の機能変化が大きな要因となっていることが現在まで示唆されているが、**未だ視床痛発症の詳しいメカニズムは明らかにされておらず**、従って有効な治療法が存在しない。

2. 研究の目的

視床痛発症メカニズムが未だ不明な理由の1つに、**適切な動物モデルが存在しない**ことが挙げられる。これまでの視床痛研究は、患者を対象に電気生理学的手法・機能画像的手法を用いた臨床病態解析が主であり、分子レベルで病態解析を行うには不十分であった。最近 Wasserman と Koeberle は、ラットの視床後外側腹側核にコラゲナーゼを微量注入することで出血を誘発し、その7日後に反対側に機械性あるいは熱性痛覚過敏を検出することに成功した(*Neuroscience* 161, 173-183, 2009)。申請者らは本報告を参考に、また将来的には様々な遺伝子改変マウスの利用を念頭に置いているため、**マウス視床痛モデル**作製を検討した。

3. 研究の方法

臨床的には劣位半球である右視床障害例(す

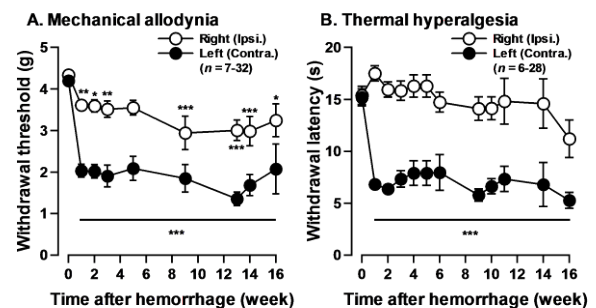
なわち左半身の視床痛)が多く、また血管障害の小さい視床病変を持つ患者に視床痛発症例が多いことから、マウスにおいても右視床後外側腹側核に脳定位的にコラゲナーゼを微量注入(0.05 μ l)した結果、注入後7日頃から左後肢に機械的アロディニア現象および熱性痛覚過敏現象を検出することに成功した。

4. 研究成果

(1)経時的な疼痛行動学的観察の結果、術後1週目より左後肢(病変の反対側)の有意な機械的アロディニア及び熱性痛覚過敏を認め、両症状は術後16週においても観察された。この際、術後1-2週の急性期をPhase 1、3-4週の亜急性期をPhase 2、10週以降の慢性期をPhase 3と区分して薬理的な検討を行った。(図1,2)

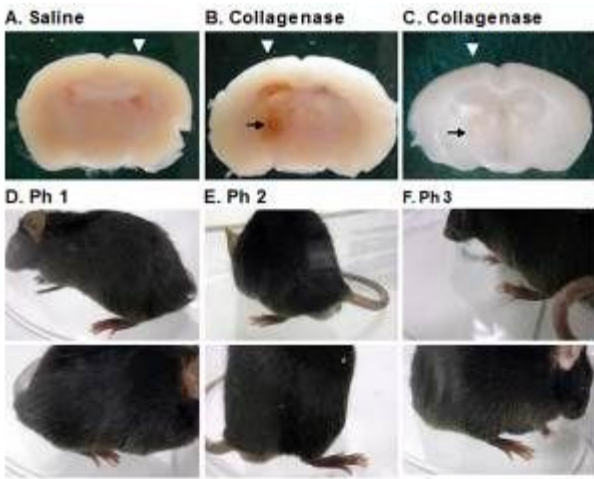
図1. 視床出血誘発疼痛様行動 時系列での検討

(A. 機械的アロディニア、B. 熱性痛覚過敏)



右後肢が健側 (Ipsi.)、左後肢が患側 (contra.) コラゲナーゼ注入後左後肢に A. 機械的アロディニア現象、あるいは、B. 熱性痛覚過敏現象等を検出することができるか否かを検討した。機械的アロディニアの検出では、術後1週目から健側(右後肢)にも疼痛様行動が出現し、患側(左後肢)に、より優位に出現した。熱性痛覚過敏については、患側(左後肢)に術後1週目から、疼痛様行動が検出された。熱性痛覚過敏現象の検出では、機械的アロディニアの検出で認められたような健側の疼痛様行動はつきりしなかった。

図 2. 視床出血作成術後のマウス脳



A. 生理食塩水を定量的に注入(コントロール)術後 7 日目

B. コラゲナーゼを微量注入 術後 7 日目

C. コラゲナーゼ微量注入後 16 週目 4% パラホルムアルデヒドで灌流固定後

A.: 明らかな出血を認めない

B., C.: 出血は VPL 核に比較的限局

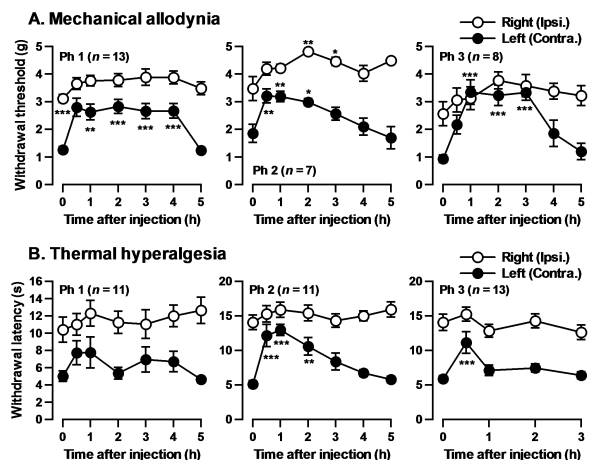
D.-F.: Ph1-Ph3 のマウスの後肢 マウスに明らかな麻痺は認めず、足の形の異常や指の異常は認めず、一見正常であった。

(2)検討した薬物群の中で有効であったものは、アミトリプチリン、ラモトリギン、およびミノサイクリンであった。ジクロフェナク、モルヒネ、プレガバリンはいずれも無効であった。

投与量は神経障害性疼痛モデルの先行実験を参考に、アミトリプチリン: 10mg/kg、ラモトリギン: 10mg/kg、ミノサイクリン: 50mg/kg、ジクロフェナク: 30mg/kg、モルヒネ 3mg/kg、プレガバリン 10mg/kg いずれも腹腔内投与とした。

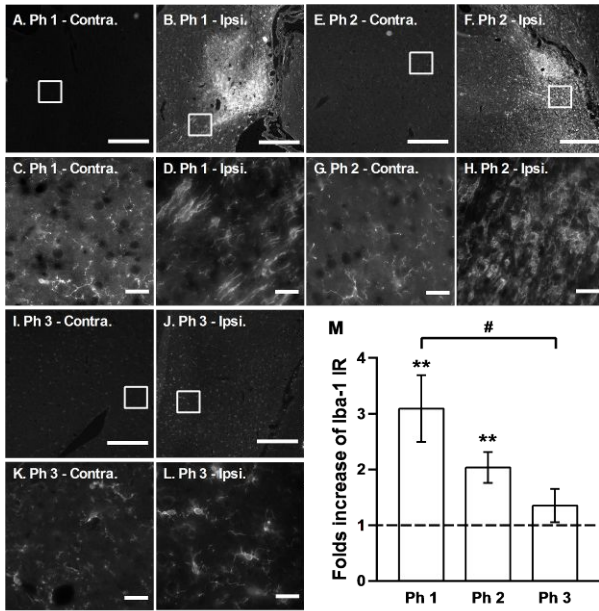
(3)ミノサイクリンは近年そのミクログリア活性化阻害作用が注目され、末梢神経モデルにおいて脊髄後角のミクログリア活性を抑制することで神経障害性疼痛発症を抑制することが多く報告されているが、中枢性モデルに対する検討はこれまで行われていない。本モデルにおける機械的アロディニアに対しては、全ての Phase において投与後 2-4 時間の間、主に健側に対して抑制効果が観察された。熱性痛覚過敏に関しては、Phase 1 では効果は認められなかったが、Phase 2 および 3 においては投与後 0.5-2 時間の間、抑制効果が認められた。(図 3)

図 3. ミノサイクリン 50mg/kg の効果



(4) Iba-1 免疫染色を行うことで、健側に対する患側のミクログリア活性化の程度を比較検討した。患側の Iba-1 免疫活性は健側に比し、Phase 1 および 2 の間は有意に発現上昇していたが、Phase 3 においては健側との有意差は認められなかった。しかしミクログリアの形態変化は残存しており、何らかのミクログリア活性化が Phase 3 においても持続しているものと考えられた。(図 4)

図 4. VPL 近傍の経時的な Iba-1 活性の変化



以上の結果より、本中枢性疼痛モデルにおいても、ジクロフェナク (NSAIDs) およびモルヒネ非感受性の疼痛が長期にわたって持続するが、三環系抗うつ薬に感受性を示すなど、ヒト脳卒中後疼痛 (CPSP) と薬物感受性が極めて類似した疼痛行動学的特徴を呈することが示された。ミクログリア活性化阻害薬ミノサイクリンは、機械的アロディニア、熱性痛覚過敏の両者に有効であった。疼痛行動が長期に持続するのに比し、患側の Iba-1 免疫活性は徐々に低下していくことが観察されており、ミクログリア活性と Iba-1 免疫活性の相関性については更なる検討を要する。また、ミノサイクリンが疼痛行動を抑制する機序は、ミクログリア活性化抑制に加え、それとは独立した機序による抗炎症作用の関与も考えられる。今回の研究で確立したマウス視床痛モデルは、脳卒中後疼痛 (CPSP) 発症の病態メカニズムの検討に妥当なモデルであることが示された。また、ミクログリア活性化メカニズムを標的とした CPSP 新規治療薬開発の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 1 件)

花田朋子、栗原崇、徳留舞、時村洋、有田和徳、宮田篤郎

Development and pharmacological verification of a new mouse model of central post-stroke pain. *Neuroscience Research*, 査読あり, 78 巻, 2014 年, p78-80, doi: 10.1016/j.neures.2013.09.005. Epub 2013 Sep 19.

〔学会発表〕(計 2 件)

花田朋子、栗原崇、時村洋、宮田篤郎、有田和徳

Development and pharmacological validation a new mouse model of central post-stroke pain. *STROKE* 2014, 2014/3/13, 大阪

Hanada T、Kurihara T、Tokudome M、Tokimura H、Arita K、Miyata A

Development and pharmacological characterization of a new mouse model of central post-stroke pain caused by thalamic hemorrhage. *Neuroscience*, 2013/11/10, サンディエゴ (アメリカ合衆国)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ns/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 和徳 (Arita Kazunori)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 90212646

(2)研究分担者

時村 洋 (Tokimura Hiroshi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：50227568

宮田 篤郎 (Miyata Atsuro)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：60183969

栗原 崇 (Kurihara Takashi)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60282745

(3)研究協力者

花田 朋子 (Hanada Tomoko)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・医員