

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592351

研究課題名(和文) CRPSにおけるメタロチオネイン欠損と疼痛の関連の検討

研究課題名(英文) Study on the relationship between metallothionein-deficiency and pain in CRPS

研究代表者

今井 伸一 (IMAI, Shin-ichi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20213209

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：メタロチオネイン(MT)は分子量6-7 kDaの金属結合タンパク質である。以前、我々はMT-I/IIが複合性局所疼痛症候群や有痛神経腫患者の神経で発現が著しく減少していることを見出した。本研究で我々は坐骨神経を部分結紮することにより作製した神経障害性疼痛モデルラットにおいて、結紮部周囲のMTの発現が減少することを見出した。さらに、リコンビナントヒトMT-IIAを結紮部周囲に経皮的に投与することにより、疼痛回避行動が改善された。以上の結果から、MTが神経障害性疼痛の発生にも深く関与しているタンパク質であることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Metallothioneins (MT) are low molecular weight (6-7 kDa) metal binding proteins. We previously reported that MT-I/II defected in the injured peripheral nerve from the patients with complex regional pain syndrome (CRPS)-2 and painful neuroma using a proteomics approach. CRPS is a chronic pain disorder displayed a characteristics of neuropathic pain, which is caused by nerve injury or diseases, such as cancer or diabetes. Here, we revealed that MTs were decreased in the injured nerve of neuropathic pain model rats generated by partial ligation of sciatic nerve and that administration of the recombinant human MT-IIA to the periphery of ligation site of model rats improved painful behavior. These results suggest that MT in injured peripheral nerve contributes to neuropathic pain.

研究分野：生化学

キーワード：複合性局所疼痛症候群 CRPS メタロチオネイン

1. 研究開始当初の背景

複合性局所疼痛症候群(CRPS)は骨折、組織傷害や神経損傷などを契機として発症する慢性疼痛症候群であり、灼熱痛、痛覚過敏、アロディニアのような感覚障害に加えて、血管運動障害や浮腫・発汗機能障害、運動・栄養障害の症状を呈する。しかし、CRPSの病態生理にはいまだ不明な点が多いことから、抜本的な治療法がないのが現状である。

CRPS に対する神経切除術の結果()より CRPS の疼痛と切除した損傷末梢神経の間には密接な関係があることが考えられたことから、申請者らはプロテオミクス的手法を用いて CRPS 関連タンパク質の同定を行い、その結果 CRPS 患者の神経および有痛神経腫ではコントロールの神経に比べてメタロチオネイン(MT)が著しく減少していることを見出した。興味深いことに、神経障害性疼痛モデルラットにリコンビナント MT-IIA を投与の予備検討を行ったところ、疼痛回避行動の減少が認められた。

MT は分子量 6-7 kDa の金属結合タンパク質で、フリーラジカルの除去、酸化ストレスからの防御、生体内必須金属のホメオスタシスの維持、免疫反応の制御など多岐にわたる。酸化ストレスやフリーラジカルは神経因性疼痛を引き起こすことが報告されていることから、MT は酸化ストレスからの防御やフリーラジカルの除去などを介して神経因性疼痛を抑制すると考えられる。さらに、これらの作用の他にも MT は中枢及び末梢神経において神経保護作用や神経再生作用も持つことが報告されているが、末梢神経に関する研究はほとんどなく、その役割は不明である。

以上のことから、CRPS では MT が欠損して起きる様々な作用の消失、特に酸化ストレスからの防御・フリーラジカルの除去を介した疼痛抑制作用及び神経保護・損傷神経再生作用の消失、が CRPS の強度かつ持続性の疼痛と関係していると推測された。

2. 研究の目的

本研究は、CRPS における MT 欠損と疼痛及び治療系の可能性について検討するために、CRPS の MT 欠損と疼痛の関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1)神経障害性疼痛モデルラットの作製

すべての動物実験は札幌医科大学学長の承認を受けており、国際疼痛学会の勧告に準拠して行った。イソフルラン麻酔下で、SD ラット(雌、240-280 g)の右脚坐骨神経の背側 1/3 ~ 1/2 を 8-0 ナイロン糸で強固に結紮することにより神経障害性疼痛モデル(Seltzer モデル)を作製した。

(2)行動評価

モデルラットの行動評価では von Frey テスト(触覚性アロディニア)と Hargreaves

テスト(温熱性痛覚過敏)を行った。どちらのテストも一匹のラットで手術をした右脚と手術をしていない左脚の疼痛回避行動の差を比較した。von Frey テストは径の異なる 3 種類のフィラメント(1.26, 4.35, 8.75 g)を用いて後肢の足底へ 10 回ずつ左右交互に刺激を与え、疼痛回避行動の回数を計測した。それを 3 セット行い、計 30 回の刺激における疼痛回避行動の回数を左右差で比較した。Hargreaves テストはプレキシガラスの下から一定の熱源を後肢の足底へ照射し、疼痛回避行動までの時間を左右交互に計測し、5 回の平均値の左右差を算出した。いずれの行動評価も 0(手術前)、1、3、5、7 日(MT 投与半日後)に行った。

(3)免疫染色

手術後、3、7、14、28 日後にラットをイソフルラン麻酔下で 4%パラホルムアルデヒド溶液の経心還流を行った後、結紮部位を含む坐骨神経(約 2 cm)を摘出した。凍結切片を作製した後、HE 染色及び抗 MT 抗体(E9, Dako)を用いた免疫染色を行った。

(4)リコンビナントヒト MT-IIA (rhMT-IIA) の作製と投与

ヒト腓腹神経から単離した RNA を用いて PCR により増幅した MT-IIA cDNA を pGEX 発現ベクターに組み込んだ。rhMT-IIA を GST との融合タンパク質として大腸菌に大量発現させた後、グルタチオンセファロース 4B に吸着させ、PreScission プロテアーゼで切断することにより、rhMT-IIA を精製した。

ラットへの精製 rhMT-IIA の投与は、結紮手術後すぐに(0 日)20 µg を結紮部の神経内に直接注入した。1 日目から 6 日目までは毎日 10 µg を結紮部の神経周囲に経皮的注入を行った。コントロールには PBS を用いた。

4. 研究成果

(1) 我々は以前の研究で、CRPS 患者の神経や有痛神経腫では MT の発現が大きく減少している事を報告した()。そこで、初めに神経障害性疼痛モデル動物における MT の発現を検討した(図 1)。

術後 3 日目では結紮部近位で断端神経腫様変化、遠位で Waller 変性などの構造変化を軽度で認めた。MT の染色強度は結紮部近位で軽度の低下を認めた。術後 7 日目では構造変化をさらに強く認めた。結紮部近位での MT 染色強度はより強い現象を認めた。術後 14 日目では、結紮部遠位でも染色強度の低下を認めた。術後 28 日目では結紮部遠位での染色強度低下に加え、損傷部近位にも染色強度の低下を認め、神経全体での低下を認めた。この際、von Frey テストでは術後 5 日目以降で、Hargreaves テストでは術後 7 日目に疼痛行動の有意な減少を認めた。これらのことから、神経障害性モデルラットにおいても、障害部位周囲における MT の発現が減少していることが確認された。

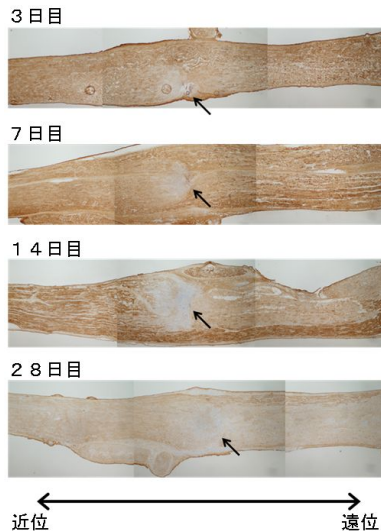


図1 MT発現の経時変化
(矢印は結紮部位)

(2) 近年、MTの投与が中枢神経における神経変性疾患を改善するという報告がなされていることから、神経障害性疼痛モデルラットへの精製rhMT-IIAの投与が疼痛を改善するのかを検討した(図2)。

その結果、von Freyテスト(A; 1.26g, B; 4.35g, C; 8.75g)ではいずれのフィラメントでも術後5日目より疼痛行動の有意な減少を認めました。また、Hargreavesテスト(D)では7日目において有意な改善となった。これらの行動評価からメタロチオネインの投与は触覚性アロディニア、温熱性疼痛過敏の双方に効果をもたらすことが示された。また、7日目の行動評価後に坐骨神経を摘出し、MTの免疫染色を行った。コントロール群に比べて、MT投与群では断端神経腫様変化やWaller変性などの構造変化が軽度であることが認められた。さらに、コントロール群に比べて、炎症反応が軽度であることやMTの発現の減少が抑制されていることが観察された。

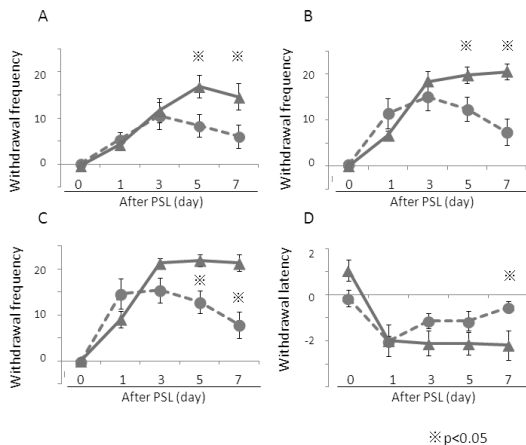


図2 rhMT-IIA投与による疼痛行動の改善

(3) MTは中枢神経系の変性疾患、神経損傷などの分野で、その神経修復能力、強力な抗酸化作用などが生体内で重要な役割を果たすことが報告されている。今回の我々の結果からMTが神経障害性疼痛の発生にも深く関与しているタンパク質であると推察される。

<引用文献>

- Yamashita T, Ishii S and Usui M. Pain relief after nerve resection for post-traumatic neuralgia. *J Bone Joint Surg (Br)* **80** (1998) 499-503.
 Oki G, Wada T, Iba K, Aiki H, Sasaki K, Imai S, Sohma H, Matsumoto K, Yamaguchi M, Fujimiya M, Yamashita T and Kokai Y. Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics. *Pain* **153** (2012) 532-539.

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)

- Sasaki K, Ozasa Y, Iba K, Wada T, Imai S, Matsumoto K, Sohma H, Aoshima M, Yamashita T and Kokai Y. Significant increase of plasma tetranectin in ovx mice as defined by proteomics analysis. *J. Orthop. Sci.* **19** (2014) 809-819, 査読有.
 DOI: 10.1007/s00776-014-0586-3
 Sohma H, Imai S, Takei N, Honda H, Matsumoto K, Utsumi K, Matsuki K, Hashimoto E, Saito T and Kokai Y. Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and dementia with lewy bodies. *Front. Aging Neurosci.* **5** (2013) 15, 査読有.
 DOI: 10.3389/fnagi.2013.00015

[学会発表](計7件)

- 藤田安詞「坐骨神経部分結紮モデルにおけるメタロチオネイン発現の揭示的变化とメタロチオネイン投与による神経障害性疼痛の抑制効果」第126回北海道整形災害外科学会, 2014年2月2日, 北海道大学(札幌).
 藤田安詞「メタロチオネイン投与による神経障害性疼痛の抑制効果」第28回日本整形外科学会基礎学術集会, 2013年10月17日, 幕張メッセ(千葉).
Imai S. "Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics" 4th International Congress on Neuropathic Pain, 24 May 2013, Toronto, CANADA.

Fujita Y. "Neuropathic pain can be suppressed by the recombinant metallothionein" 4th International Congress on Neuropathic Pain, 24 May 2013, Toronto, CANADA.

藤田安詞「リコンビナントメタロチオネインによる神経障害性疼痛の抑制」第27回日本整形外科学会基礎学術集会, 2012年10月26日, 名古屋国際会議場(名古屋).
今井伸一「CRPSにおけるメタロチオネイン欠損と疼痛の関連」第45回北海道病理談話会, 2012年10月13日, 札幌医科大学(札幌).

Oki G. "Metallothionein deficiency in the injured peripheral nerves of complex regional pain syndrome as revealed by proteomics" 67th Annual Meeting of The American Society for Surgery of The Hand, 6-8 Sep 2012, Chicago, U.S.A.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 伸一 (IMAI, Shin-ichi)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：20213209