

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791537

研究課題名(和文) 不動化によるCRPS増悪機序の解明 - 損傷神経支配域を超えたNGF発現に着目して -

研究課題名(英文) Pathological mechanism of motion disorders associated with CRPS type II. An animal study

研究代表者

山本 美知郎 (Yamamoto, Michiro)

名古屋大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90528829

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：10週齢ラットを以下の5群に分類した。正常群、シャム群、膝関節固定群、脊髄神経結紮(SNL)群、SNL+膝関節固定群。この5群において機械的アロデニアや膝拘縮の程度を比較し、ニューロペプチドや炎症性サイトカインの発現について組織学的、遺伝子学的に調査した。その結果、外科的侵襲も関節の不動化も単独ではアロデニアや関節拘縮を増悪させなかったが、神経損傷を追加すると有意にアロデニアが悪化した。NGFや他の炎症性サイトカインは脱神経筋のみならず、神経支配領域を越えて広がっていた。CRPSに伴う拘縮では膝関節周囲筋でTGF β の高発現を認めた。

研究成果の概要(英文)：Ten-week-old male Wistar rats were assigned to 5 groups: a normal group receiving no treatment; a sham operation group with exploration of the left L5 nerve root, femur, and tibia; an immobilization group with surgical exploration plus internal knee joint immobilization; a surgical neuropathy group prepared by spinal nerve ligation (SNL) of the left L5 nerve root; and a surgical neuropathy + immobilization group with simultaneous SNL and knee joint immobilization. Mechanical allodynia and knee contracture were compared between groups, and tissues were harvested for histological assessments and gene and protein expression analyses. Neither surgical procedures nor immobilization induced detectable mechanical hypersensitivity, while addition of nerve injury resulted in detectable mechanical allodynia. Nerve growth factor (NGF) and other mediators of neurogenic inflammation were highly expressed not only in denervated muscles, but also in innervated muscles in contiguous areas.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：CRPS 関節拘縮 NGF

1. 研究開始当初の背景

(1) 本邦のCRPS患者において、75.4%に関節拘縮が発生している (Sumitani et al. 2010, Pain)。

関節拘縮はCRPS患者における症状としては浮腫 (84.1%)、筋力低下 (83.1%) に次いで多く認められている。CRPS以外の疼痛性疾患における関節拘縮の発生頻度 31.5~46.6%とは大きく異なり、本邦におけるCRPSの判定指標の一つに挙げられている。

(2) 神経障害に伴う関節拘縮では、筋の異常な緊張が拘縮発生に関与している。

関節拘縮の発生機序は多種多様であるが、神経障害に伴う関節拘縮では筋の異常な緊張による短縮が先行して生ずる事が近年の研究により分かってきた。MacDonaldらは脊髄損傷患者の足関節において腓腹筋の緊張が健常者に比べて有意に亢進していることを報告している (J Biomech 2005)。また、Nikolaouらは出生直後のマウスを用いて腕神経叢損傷モデルを作成し、関節拘縮の原因を調査した結果、上腕筋と上腕2頭筋の短縮により肘屈曲拘縮がおり、肩甲下筋の短縮により肩内旋拘縮が発生したと報告している (J B J S 2011)。しかしながら、CRPSにおいては、なぜ高度かつ難治性の関節拘縮が起こるかは、まだ十分には解明されていない。

(3) 逆に、不動化によって疼痛は悪化する。

長期の不動化は筋や骨の萎縮、関節拘縮を招くだけで無く、疼痛を悪化させる。Terkesenらはヒトの前腕を固定することで、寒冷及び機械刺激に対する知覚過敏を引き起こすことを報告している (Anesthesiology 2008)。CRPSにおいて calcitonin gene-related peptide (CGRP) と substance P (SP) が高値を示すことは多々報告されているが、Nishigamiらは不動化だけでも後根神経節 (DRG) 及び脊髄後角におけるCGRPが高発現し、疼痛に関与していると報告している (Neurosci Lett 2009)。

(4) CGRPの発現はNGFによっても regulate されている。

RuizらはNGFをラット坐骨神経内に直接投与すると、行動学的には温度覚の知覚過敏を認め (2004 Brain Res)、後根神経節内において大径のCGRP陽性細胞の割合が増加すること報告している (2005 Brain Res)。NGFは成人において侵害受容や炎症の感作において重要な仲介役を担っている。

(5) NGFは損傷神経だけでなく、損傷組織周辺の皮膚、皮下、筋膜及び筋にも高発現する。

神経内においては軸索や fibroblasts 又は Schwann細胞にはNGF receptorの発現を認めているが、神経以外でも皮膚や筋及び筋膜を切開した場合に、行動学的に疼痛反応を示すと共に、切開周辺組織においてNGFタンパク及びNGFmRNAが高発現している。

(6) ラットCRPSモデルに関節固定を追加すると、アロデニアと拘縮の悪化を認める。

我々の先行研究において、片側L5神経根を結紮の後に切離する修正Chungモデルを作成し、膝関節固定を追加した群と修正Chungモデル単独群における疼痛行動を von Frey filament test で比較した結果、膝関節固定を追加した場合に疼痛閾値が有意に低下した。

(7) 修正Chungモデルに膝関節固定の追加により固定除去後も関節拘縮が悪化する。

修正Chungモデル単独群と膝関節固定を追加した群に分けて、膝関節の可動域を重錘法を用いて測定した。Chungモデル単独時よりも、膝関節固定を追加した場合に有意に拘縮が強い結果を得た。

(8) 膝関節周囲の筋内にNGFが高発現している

修正Chungモデル単独でも大腿四頭筋内にNGFの発現を認めたが、膝関節固定を追加した群ではL5神経支配ではない大腿四頭筋内にNGFの高発現を認めた。正常コントロールではNGFの発現は僅かにしか認めなかった。

(9) NGFmRNAは関節固定の追加により患側・健側共に坐骨神経内で発現レベルが亢進している

NGFmRNAの発現は、Chungモデルに膝関節固定を追加した群では、坐骨神経内では健側・患側共に亢進していた。L5神経根結紮切離に不動化を加えることで、L5支配領域を超えて、脊髄・脳の反応を介し、筋由来のNGFが疼痛及び拘縮の増悪に関与している可能性が示唆された。更に、神経損傷部、後根神経節いずれのレベルでも筋内のNGF発現レベルの変動と連動してテトロドトキシン (TTX) 感受性ナトリウムチャンネルやATP受容体チャンネルの発現亢進やTTX抵抗性ナトリウムチャンネルの発現低下など神経障害性疼痛関連遺伝子の発現変動が生じていた。

2. 研究の目的

これまでの解析より、ラットCRPSモデルに膝関節固定を同時に行うことで、高度な拘縮、知覚過敏そして大腿四頭筋内にNGFの高発現がみられた。

CRPSモデルに不動化を追加することで筋の過緊張と中枢神経系の関与を明らかにする。

更に、NGF 中和抗体による効果を解析することで CRPS と不動過モデルにおいて疼痛および関節拘縮の増悪機序における NGF の役割を解明することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

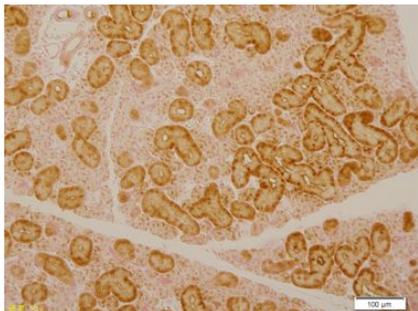
健常ラット normal group としての N 群、神経障害性疼痛 model として、SNL を行った S 群、SNL と膝関節屈曲位内固定を併施した、S+I 群の 3 群を作成した。

評価としてフォンフライヘアテスト、病理組織の鏡検を行い、免疫染色による NGF の発現局在評価、ELISA による炎症性サイトカインの発現量測定を行った。

マッソントリクローム染色

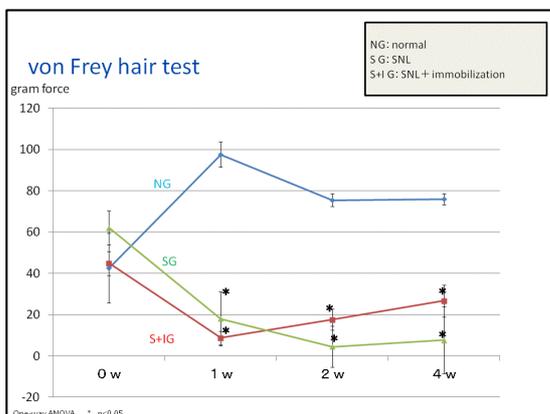


免疫染色 (NGF; DAB 法)

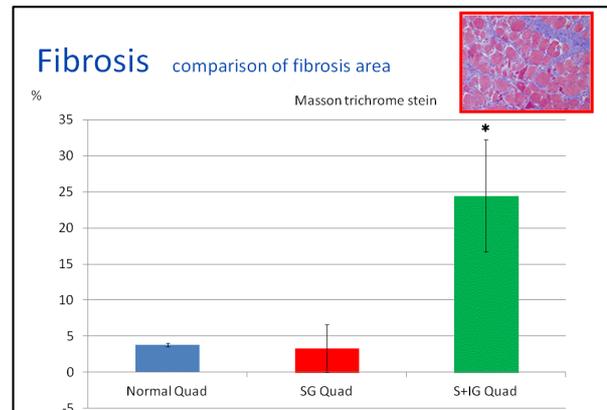


4. 研究成果

von Frey test では、S 群と S+I 群は 2 週目以降疼痛閾値が有意に低かった。S+I 群では、2 週目以降も疼痛閾値の低下が遷延していた。



マッソントリクローム染色を行ったラット大腿部の病理標本で画像解析を行い、筋組織と線維組織の面積を測定した。S+I 群で、線維組織面積は有意に増加していた。



これらの結果から、不動化が関節拘縮の発生要因であり、筋性拘縮の原因は筋線維間や、筋膜組織の線維化が招く筋の弾性低下であると考えられた。

次に、免疫染色で NGF 発現の局在を確認した。

膝関節周囲組織において N 群では、NGF 発現が確認できる筋組織はほとんど存在しなかったが S 群では皮下に近い部位、骨に近い部位や筋萎縮のある部位で NGF 発現を認めた。S+I 群でも同様に発現を認めたが、全体的に発現が強い印象で、また、大腿部に強い発現がみられる傾向にあった。

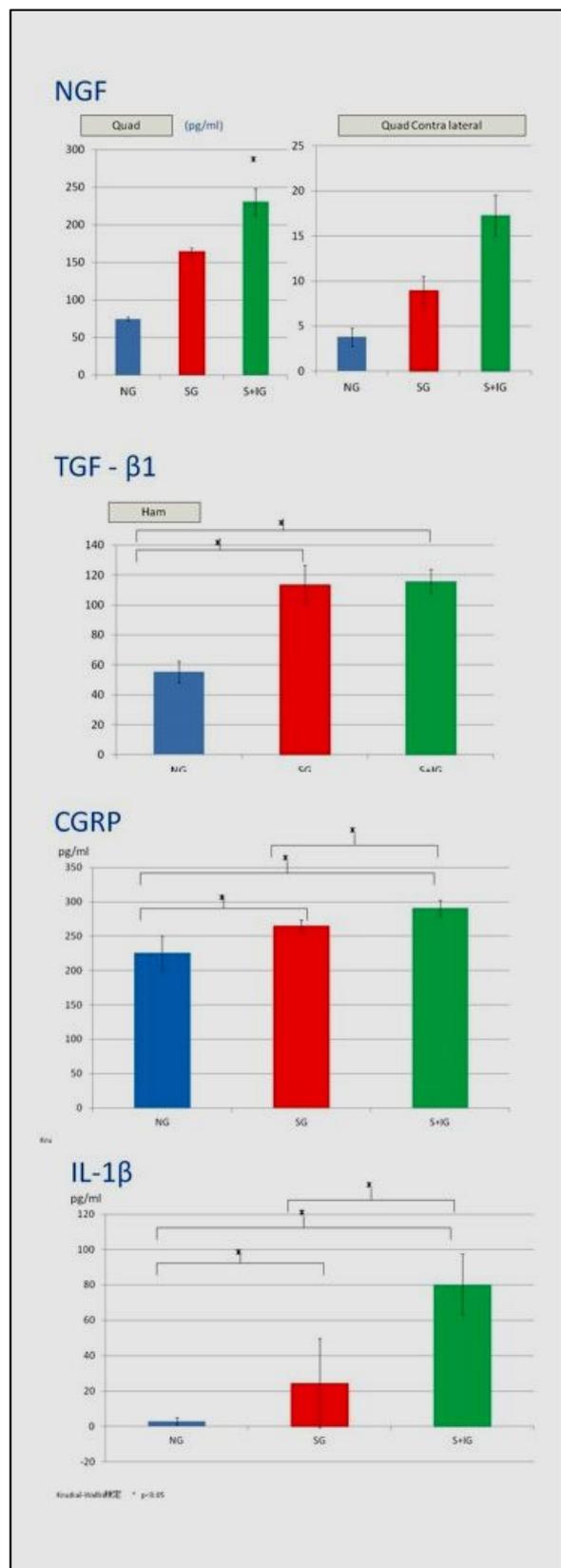
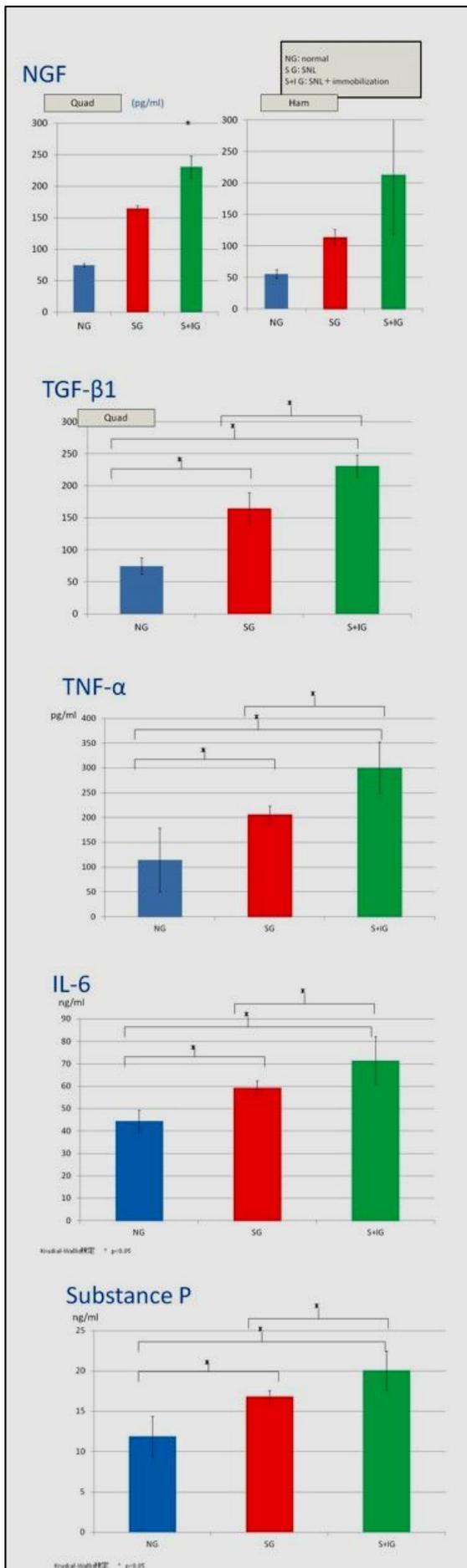
ELISA では NGF においては、N 群、S 群、S+I 群の順に発現量の増加を認めた。特筆すべき点として、L5 神経根の支配領域外である、大腿四頭筋でも発現量の増加を認めた。また、健側の大腿四頭筋においても発現量の増加を認めた。

NGF のほか、pro-inflammatory cytokine の調査も行った。TNF- α においても同様に、発現量の増加を認めたが、健側での上昇は認めなかった。

CGRP、サブスタンス P、IL-1、IL-6 においても TNF- α と同様の結果であった。組織形態学評価において、組織の線維化が進んでいたことから、TGF- β 1 の発現量も調査した。これも、他のサイトカインと同様の発現量増加を認めた。

NGF の影響を確認するために、中和抗体を使用後疼痛閾値の評価を行った。中和抗体を投与すると、投与後 1 週間程度は、疼痛が軽減することが判明した。mRNA 測定においても、中和抗体を用いると、NGF の発現量が低下していた。

術後2週目の同側ハムストリングスにおける各種ニューロペプチドと炎症性サイトカインのタンパクレベル(ERISA)



考察

近年 CRPS の発症、維持に不動化の関与が示唆されており、今回の結果からも、神経障害後の疼痛は不動化によってさらに助長されると考えられた。
 拘縮の原因は様々だが、今回の結果から

CRPS 初期の関節拘縮の主たる要因は筋膜組織や結合織だと思われる。

Chung らは、関節の屈曲位固定を行った場合、屈筋間の線維組織量は有意に多いことを示しており、CRPS に限らず関節の不動化が組織の線維化亢進を招くことを示している。

炎症性サイトカイン以外に、TGF- β 1 の発現も S+I 群が有意差をもって上昇していることから、不動化の影響は、痛覚過敏の加速や、異常痛の拡散のみならず、線維化の亢進ももたらすことが判明した。

拘縮の発生は筋性要因によるところが大きいことに加え、S 群に関節拘縮は存在せず、S+I 群も疼痛反応が有意に強いことから、神経損傷と拘縮は個々に発生したうえで疼痛反応に関与していると考えられた。

高橋らはニューロトレーサーを用いて綿密にラット神経根の支配領域を調査し、L5 神経根の支配領域に大腿四頭筋は含まれていないことを示している。我々は今回、NGF をはじめとする、neuro-peptide や炎症性サイトカインが神経支配領域外の骨格筋に過剰発現していることを突き止めることができた。また、既存の報告と同様に、NGF 中和抗体を用いると痛覚過敏が抑制されることから、痛みの広がりにおいて、NGF は他のサイトカインよりやや大きい役割を持っていると考えられた。

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0件)

[学会発表](計3件)

(1) 第60回米国整形外科基礎学会
2014/3/15-18 (Hyatt Regency New Orleans,
New Orleans USA)

The factor of persistent pain and movement disorder in the complex regional pain syndrome.

Hideyuki Ohta, Syuichi Kato, Tetsuya Arai,
Katsuyuki Iwatsuki, Michiro Yamamoto,
Hitoshi Hirata

(2) 第6回日本運動器疼痛学会 2013/12/7-8
(神戸国際会議場、神戸)

複合性局所疼痛症候群(CRPS)における運動機能障害・拘縮についての検討

太田英之、新井哲也、浦野秀樹、倉橋俊和、加藤宗一、岩月克之、山本美知郎、平田仁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 美知郎 (Yamamoto Michiro)

名古屋大学医学部附属病院講師

研究者番号：90528829

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者なし