

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670286

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛の分子診断系開発の基礎的研究

研究課題名(英文) A fundamental study aiming development of molecular diagnosis for neuropathic pain

研究代表者

小海 康夫 (Kokai, Yasuo)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：20178239

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)：申請者らの見出したCRPS患者の障害末梢神経におけるメタロチオネイン(MT)の欠損は、当該分野において初めて発見された分子レベルの変化である。この発見を契機として分子レベルの理解がほとんど無いといってもいいNPの分子レベルの病態解析を可能にする入口に立つことができた。客観診断が存在しなかった神経障害性疼痛を客観診断できる可能性がある。このことは、神経障害性疼痛という難病に対する初めての分子レベルでの情報である。いまだに不明な点が多いCRPS障害神経の解析を契機としMTという分子のウィンドウからNPの疼痛に関わるタンパク質群のパスウェイを観察する分子レベルの疼痛病理学的解析が可能となった。

研究成果の概要(英文)：Although CRPS accompanied a severe uncontrollable pain on a given tissue with a syndrome on autonomic nervous system. This highlight the characteristics of CRPS as not only pain syndrome but also suggesting an involvement of systematic control mechanism in the affected individual. The identification of metallothionein deficiency in the affected peripheral nerves has opened up a new paradigm in this field. This is the first example that an evidence for molecular changes and identification of particular protein molecule in the CRPS nerve tissues. In this proposal, we took advantage of proteomics to detect more proteins changes in the peripheral nerve tissues of CRPS in comparison with intact sensory nerves obtained from fresh cadaver. Using antibody array for proteomic analysis, we found a novel involvement of NGF system in CRPS. Using these new information, we are now trying to establish objective diagnosis system for neuropathic pain including CRPS.

研究分野：病理学

キーワード：神経障害性疼痛 慢性複合性疼痛 CRPS メタロチオネイン 酸化ストレス 外傷

### 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛(NP:neuropathic pain)は、慢性持続する高度の疼痛を主徴とする難治疾患である。臨床所見からかけ離れた高度な痛みが主症状であることから客観的な診断が困難であり、診断が困難な症例では詐病との鑑別が必要など、医療者・患者双方にとって多大の困難をもたらす、患者本人、家族、社会に深刻な問題を与えている。NP は、がん性疼痛、糖尿病性神経障害に伴う痛みや複合性局所疼痛症候群(CRPS)など、多くの疾患を含むことが明らかとなりつつあり、近年その重要性が増している。NP のうち、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、異痛症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。本学整形外科では徹底的な保存治療を行ったにもかかわらず耐え難い疼痛が残存する CRPS 症例に限定して神経切除術を行いその成績を報告している(J Bone Joint Surg (Br).1998;80:499-)。その結果、疼痛と障害神経の密接な関係が示唆された。申請者らは、末梢神経のプロテオミクス解析系を確立し、手術切除された CRPS 障害末梢神経と新鮮遺体より摘出した腓腹神経をコントロール群としたプロテオミクス解析系により CRPS 障害神経でのメタロチオネイン(MT)の特異的な発現欠損を見出した。さらにプロテオミクス解析の結果から CRPS 障害末梢神経では MT の発現が欠損していることをタンパク質レベルで確認した(図参照)。本研究により MT の発現欠損は、CRPS 障害神経の客観的診断に有用な情報を提供できる可能性が示唆された(Pain. 2012;153(3):502-9commentary で高評価を受けた。)

### 2. 研究の目的

神経障害性疼痛(NP:neuropathic pain)は、慢性持続する高度の疼痛を主徴とする難治疾患である。臨床所見からかけ離れた高度な痛みが主症状であることから診断が困難であり、診断困難症例では詐病との鑑別が必要など、医療者・患者双方にとって多大の困難をもたらしている。NP は、がん性疼痛、糖尿病性神経障害に伴う痛みや複合性局所疼痛症候群(CRPS)など、多くの疾患を含み近年その重要性が増している。申請者は、CRPS 患者の障害末梢神経と新鮮遺体末梢神経を比較するプロテオミクス解析を行い、CRPS 患者障害末梢神経にメタロチオネイン(MT)が特異的に欠損している事を見出した(Pain. 2012;153(3):532-)。本研究では NP の客観的診断系の構築をめざし、MT の関わる病態および関連分子の同定および診断系への応用を目指した基礎的研究を実施する。

### 3. 研究の方法

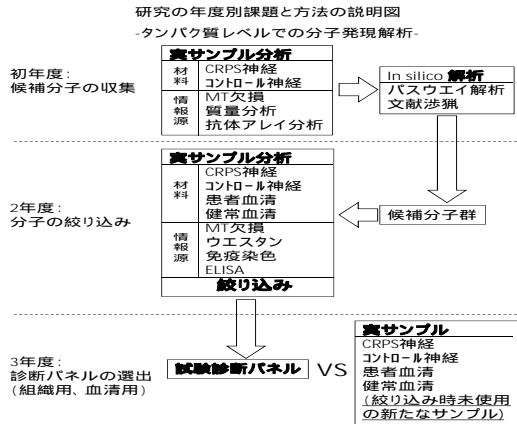
本研究は流れ図の作業を実行するために

初年度：候補分子の収集

質量分析、抗体アレイなどを用いた実サンプル分析から変動タンパク質を検出し、in silico (パスウェイ解析、文献検索など)により候補分子を抽出 MT 以外の CRPS で特異的に増減する分子の質量分析によるさらなる検出 抗体アレイを用いた増減分子の同定 および MT を用いた関連分子のパスウェイ解析などによる抽出

2 年度：分子の絞込み

初年度にて得られた候補分子群、すなわち実サンプルより得られた候補分子群と in silico 解析によって得られた候補分子群の実サンプルによる発現解析と候補分子群の絞込み

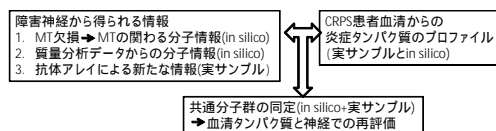


CRPS 障害神経 (3 例) およびコントロール神経 (3 例) における候補分子群のウエスタンブロットングおよび免疫染色による検討で実際に発現変化している分子の絞り込みを行う。

CRPS 患者 (5 名) および健常人血清 (5 名) を用いて にて絞り込まれた候補分子の発現を検討し、血清での発現様式を分析し、血清において CRPS 特異的に発現変化する分子を絞り込む。

3 年度：診断パネルの選出

2 年度に絞り込まれ、かつ発現変化を確認した分子について診断システムを作るため、試験用診断パネル (診断に有用と思われるタンパク質の組み合わせ) を用いて、2 年度までに用いたもの以外の CRPS 神経 (4 例既存) コントロール (4 例予定) CRPS 患者血清 (20 例予定) と健常人および整形外科的に疼痛を来す他の疾患の患者血清 (各 10 例) にて診断テストを行い、最良の組み合わせの組織用および血清用診断パネルを選定し、次年度以降の臨床研究の準備をする。



#### 4 . 研究成果

神経障害性疼痛(NP:neuropathic pain)は、慢性持続する高度の疼痛を主徴とする難治疾患である。臨床所見からかけ離れた高度な痛みが主症状であることから客観的な診断が困難であり、診断が困難な症例では詐病との鑑別が必要など、医療者・患者双方にとって多大の困難をもたらし、患者本人、家族、社会に深刻な問題を与えている。NPは、がん性疼痛、糖尿病性神経障害に伴う痛みや複合性局所疼痛症候群(CRPS)など、多くの疾患を含むことが明らかとなりつつあり、近年その重要性が増している。申請者らの見出したCRPS患者の障害末梢神経におけるメタロチオネイン (MT) の欠損は、当該分野において初めて発見された分子レベルの変化である。この発見を契機として分子レベルの理解がほとんど無いといってもいいNPの分子レベルの病態解析を可能にする入口に立つことができた。現在まで、まったく客観診断の方法が存在しなかった神経障害性疼痛を客観診断できる可能性がある。このことは、神経障害性疼痛という難病に対する初めての分子レベルでの情報である。いまだに不明な点が多いCRPS障害神経の解析を契機としMTという分子のウインドウからNPの疼痛に関わるタンパク質群のパスウェイを観察する分子レベルの疼痛病理学的解析が可能となった。本研究により、単に診断体系の確立の可能性が示されたばかりでなく、NPの疾病概念のなかに酸化ストレスとスクベンジャーとしてのMTの関わりが分子レベルで示された。さらに、直接MTおよびCRPS抹消神経および正常新鮮遺体神経のタンパク質アレイの同時解析により重要な分子パスウェイの同定および診断治療標的候補分子を複数同定することができた。この結果は、網羅的な抗体アレイとin silicoの情報科学的アプローチの融合が極めて効果的な

分子標的選択の戦略であることを実証した点でも興味深い。今後は本研究の成果を進展させ、がん性疼痛、糖尿病性神経障害に伴う痛みなどの多くの機序不明の神経障害性疼痛の分子レベルでの理解に取り組むことを可能とする分子基盤を活用による大きな発展が期待される。

神経障害性疼痛(NP)の客観的診断方法を開発することを目指し、CRPS 障害神経における炎症、疼痛関連分子の詳細な検討と患者血清での発現検討を行い、NP の分子プロファイルを分析し、客観的な診断系の確立を目指したタンパク質レベルの基礎的情報を得る。本研究が成功した場合、単に診断体系の確立が可能となるばかりでなく、NP の疾病概念の整理にも大いに貢献することが可能となる。さらに、直接 MT をまたは重要な分子パスウェイ中の標的を同定する道にもつながり、新たな分子標的診断および治療系への発展も期待される。これらの成果は、がん性疼痛、糖尿病性神経障害に伴う痛みなどの多くの機序不明の神経障害性疼痛の分子レベルでの理解を可能にする大きな発展が期待される。たとえば癌の末期患者にとって疼痛の管理は、もっとも重要な医療であり、QOL の観点からの最重要課題である。現在も続く多くの患者そして医療者の努力をさらに有効な治療体系へ結びつけるために、分子レベルの理解を推進することが何よりも重要であることに異論はない。本研究により、新たに神経障害性疼痛の臨床に新規の原理が加わり、画期的な成果へとつながることが期待される。各種神経サンプルを用いて、実サンプルおよび *in silico* で得られた情報を繰り返し実サンプルの神経および患者血清で検討して発現タンパク質を選定し、客観的診断のためのタンパク質発現プロファイルを得る。具体的には、(1)CRPS で欠損している MT が関わる分子情報を *in silico* (パスウェイ

解析、文献など)で収集、(2)質量分析および抗体アレイなどで得た実サンプル情報から出発し *in silico* 解析で情報収集、(3)を合わせた CRPS のタンパク質プロファイルに基づいた、末梢神経および患者血清の発現タンパク質の再評価を繰り返し、CRPS タンパク質プロファイルを構築し診断系を目指す。

#### 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 7 件)

Kamekura R, Shigehara K, Miyajima S, Jitsukawa S, Kawata K, Yamashita K, Nagaya T, Kumagai A, Sato A, Matsumiya H, Ogasawara N, Seki N, Takano K, Kokai Y, Takahashi H, Himi T, Ichimiya S  
Alteration of circulating type 2 follicular helper T cells and regulatory B cells underlies the comorbid association of allergic rhinitis with bronchial asthma. *Clin Immunol* 2015 Jun;158(2):204-11. PMID: 25829231(査読あり)

Kochin V, Kanaseki T, Morooka D, Takaya A, Hirohashi Y, Kokai Y, Torigoe T, Sato N.  
*Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi*. 2014;37(4):348b. PMID: 25297248(査読あり)

Sasaki K, Iba K, Ohki G, Kokai Y, Wada T, Yamashita T.  
Significant increase of plasma tetranectin in ovx mice as defined by proteomics analysis  
*J.OrthopaedicSci*. 2014Sep;19(5):809-19. doi: 10.1007/s00776-014-0586-3. Epub 2014 May 24. PMID: 4859177(査読あり)

Iwata K, Ikami K, Matsuno K, Yamashita T, Shiba D, Ibi M, Matsumoto M, Katsuyama M, Cui W-H, Zhang J, Zhu K, Kokai Y, Takei N, Ohneda O, Yokoyama T, Yabe C-NY.  
Deficiency of NOX1/NADPH oxidase leads to pulmonary vascular remodeling.  
*Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2014 Jan;34(1):110-9. (査読あり)

Sasaki K, Ohki G, Iba K, Kokai Y, Yamashita T, Wada T.

Innervation pattern at the undersurface of the extensor carpi radialis brevis tendon in recalcitrant tennis elbow.

J Orthop Sci. 2013 May 15. [Epub ahead of print] PMID: 23674348(査読あり)

Sohma H, Imai S, Takei N, Honda H, Matsumoto K, Utsumi K, Matsuki K, Hashimoto E, Saito T, Kokai Y.

Evaluation of annexin A5 as a biomarker for Alzheimer's disease and Dementia with Lewy bodies

Frontiers in Aging Neuroscience. 2013;5:15-23. (査読あり)

Maeda N, Kokai Y, Hada T, Yoshida H, Mizushima Y.

Oral administration of monogalactosyl diacylglycerol from spinach inhibits colon tumor growth in mice.

Exp Ther Med. 2013 Jan;5(1):17-22. (査読あり)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 1 件)

佐々木浩一、相木比古乃、山下敏彦、小海康夫

整形外科疾患の診断と治療に向けたプロテオミクスの可能性

整・災外 51 : 1461 1465 , 2008

〔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

小海康夫 (Kokai, Yasuo)

札幌医科大学医学部

教授

研究者番号 : 20178239

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :