

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26460698

研究課題名（和文）関節疾患におけるアシドーシス起因性疼痛と関節破壊のメカニズム

研究課題名（英文）Acidosis induced pain and mechanisms of joint destruction

研究代表者

池内 昌彦（IKEUCHI, Masahiko）

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00372730

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,800,000円

研究成果の概要（和文）： 関節疾患で見られる関節内アシドーシスに注目し、酸感知機構をターゲットにした関節疾患の新規治療法の開発を目指している。

アシドーシス起因性関節痛モデルを用いて、神経および関節組織における酸感知機構の役割を検討した。結果、本モデルでみられる長期間持続する広範囲痛覚過敏と関節破壊は、末梢神経および関節組織に分布する酸感受性イオンチャネルASIC3を介して引き起こされることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）： Our research is aimed to develop new drugs for the treatment of joint diseases, focusing on acidity in synovial fluid.

The role of pH sensors in neurons and joint tissues were evaluated in acid induced osteoarthritis model. The results showed that ASIC3, one of pH sensors, was essential for inducing widespread long-lasting hyperalgesia and joint destruction.

研究分野：運動器疼痛

キーワード：関節痛 酸感知機構 変形性関節症 関節炎

1. 研究開始当初の背景

関節機能の障害は、日常生活動作を困難なものにし生活の質の低下を招く。関節疾患で介護を要する高齢者は非常に多く、平成 22 年国民生活基礎調査では要支援者の 19.4% を占め最多である。患者の主訴の多くは関節痛であるため、疼痛管理を目的とした治療が行われているが、既存の鎮痛薬では治療効果は不十分であることが多い。その背景として、関節痛の発生機序に関する研究が驚くほど少ないことが挙げられる。現在、わが国では健康政策「健康日本 21」により健康寿命の延伸および生活の質の向上を目標としているが、その実現において関節痛の発生機序の理解に基づいた新しい治療法の開発が不可欠である。

筋骨格系の痛みの治療薬として、非ステロイド性消炎鎮痛薬が主に用いられてきたが、近年、オピオイド、イオンチャネルブロッカー、神経成長因子阻害薬、疼痛抑制系賦活薬など神経系をターゲットにした治療薬の開発が進み臨床応用もされている。これらは、従来薬にない鎮痛効果を発揮しうる点で有用な治療薬であるが、一方で筋骨格系の病変を悪化させ骨・関節破壊を来す危険性を孕んでいる。すでに、変形性膝関節症患者に対する神経成長因子阻害薬の臨床試験において、非常に優れた鎮痛効果を認めたものの、関節病変が著明に悪化する例が散見され臨床試験自体が休止している。元来、関節は運動器のひとつであり、無痛性だけでなく支持性と可動性といった重要な機能を必要とする。すなわち、神経系をターゲットにした治療薬を考える場合、疼痛改善だけでなく関節保護作用を兼ね備えた薬剤が理想的なものと考えられる。

関節疾患において炎症、低酸素状態から関節内アシドーシスが生じる。侵害受容器にはプロトンリガンドとする ASICs や TRPV1 といったイオンチャネルが存在し、アシドーシスにより侵害受容器に活動電位が発生し痛みの情報伝達が始まる。申請者は独自に、末梢神経に豊富に存在し、pH の低下に対して鋭敏に反応する ASICs のサブユニット ASIC3 に注目して、関節痛の発生機序におけるその役割を解明することを目的に基礎実験を重ねてきた。これまでに、関節炎モデルの実験により、ASIC3 が病変部位を超えて広がる疼痛の形成に重要であること (Pain 2008)、関節を支配する後根神経節細胞において ASIC3 のアップレギュレーションを伴うこと (J Pain 2009)、変形性関節症モデルにおいて ASIC3 ブロッカーが疼痛抑制に有用であること (J Biomed Sci 2012) などを報告してきた。国内外問わず同様の報告はほかになく、数多くの一流誌のレビューに引用され、ASIC3 は関節痛の治療ターゲットとして有望であると注目されている (Curr Opin Drug Discov Devel 2009, Pharmacol Ther 2010, Am J Physiol 2012, J Cell Mol Med

2013, etc.)。当初 ASICs は神経細胞に存在するものとして報告されたが、現在では軟骨細胞や滑膜細胞においても発現が確認されており、pH センサーとして関節ホメオスタシスに関与していると考えられる。著者らの変形性関節症モデルを用いた実験では、ASIC3 ブロッカーの関節内投与が軟骨変性を抑制することを確認しており (J Biomed Sci 2012)、関節組織に存在する酸感知機構の調節により関節保護作用も期待できることが明らかになった。今回、これまでの研究成果を踏まえて、アシドーシス起因性の疼痛と関節破壊の発生機序における ASICs および TRPV1 などの酸感知機構の役割について調査する着想に至った。

2. 研究の目的

関節疾患モデル動物におけるアシドーシス起因性疼痛と関節破壊の発生機序における酸感知機構の役割を明らかにすることである。

3. 研究の方法

慢性関節痛モデルにおける末梢神経および脊髄レベルでの酸感知機構の機能

pH4 の酸を 5 日間間隔で関節内に繰り返し投与すると、関節内組織の障害を伴わない持続性でかつ広範囲に広がる痛覚過敏が発生する。この慢性関節痛モデルを用いてアシドーシスに伴う神経系の変化を研究するのに適している。

【行動学的疼痛評価】

酸の繰り返し注射後 35 日目まで定期的に (3, 7, 14, 21, 28, 35 日目) 行動学的疼痛評価を行う。評価項目は、足底の痛覚過敏および荷重分布である。足底の痛覚過敏は、von Frey フィラメントの刺激でみられる足引っ込み動作を指標に疼痛閾値を測定する。荷重分布は、incapacitance meter (Linton Instruments) を用いて計測し、患健比で表す。

【脊髄後根神経節細胞における酸感知機構の発現率】

組織切り出しの 1 週間前にあらかじめ逆行性トレーサー Fast Blue 100 μ l を膝関節内に投与しておく。ラットを還流固定後、両側 L3-5 後根神経節細胞を摘出する。摘出標本は 10 μ m 厚の凍結切片にする。免疫蛍光染色は、ASIC3、TRPV1 に対する抗体を用いて行う。蛍光顕微鏡で逆行性トレーサーにて標識される後根神経節細胞中の各酸感知機構陽性細胞数を数える。

【脊髄後角における転写因子 CREB 発現率】

L4 髄節の 10 μ m 厚の凍結切片を作製し、転写因子 CREB の蛍光免疫染色を行う。

）関節痛モデルにおける酸感知機構アンタゴニストの疼痛抑制効果

ASIC1, ASIC3, TRPV1 に対するアンタゴニストである PcTx1, APETx2, BCTC を 2 回目の酸投与直前に関節内投与する。その後行動学的疼痛評価を行い、それぞれの酸感知機構アンタゴニストの疼痛抑制効果を明らかにする。

）関節破壊モデルにおける酸感知機構アンタゴニストの疼痛抑制および関節破壊抑制効果

軟骨の解糖系を阻害し関節破壊を進行させる MIA モデルを用いて実験を行う。本モデルは、MIA 投与後 28 日目まで行動学的疼痛評価を行い、その後膝関節を切り出し、組織学的検討とマイクロ CT 評価を行う。次に ASIC1, ASIC3, TRPV1 に対するアンタゴニストである PcTx1, APETx2, BCTC を関節内に連日投与し疼痛抑制効果および関節破壊抑制効果を検討する。

4. 研究成果

）慢性関節痛モデルにおける末梢神経および脊髄レベルでの酸感知機構の機能

【疼痛行動】

繰り返し酸投与群は、注射後 35 日目まで続く足底の痛覚過敏および荷重分布不均衡がみられた(図1)。一方、単回酸投与群では、一時的な疼痛行動がみられたが持続しなかった。

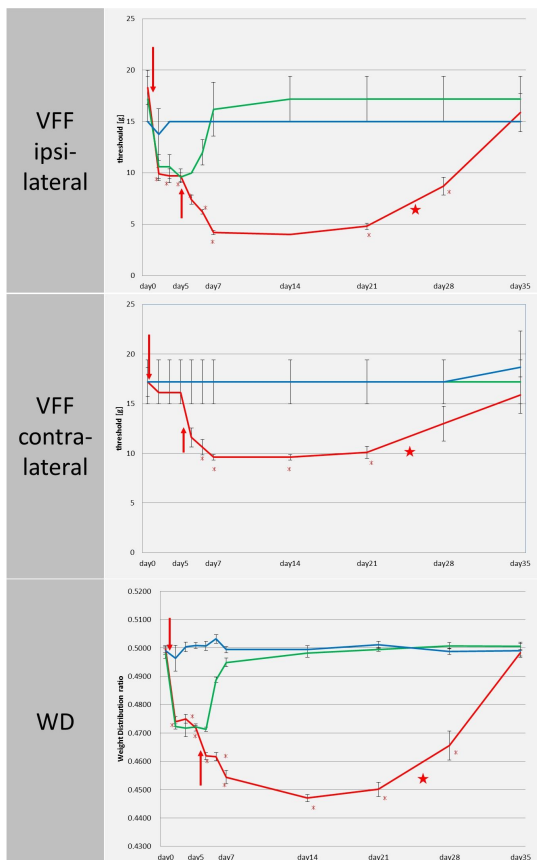


図1 慢性関節痛モデルにおける疼痛行動

赤：繰り返し酸投与群、緑：単回酸投与群、青：コントロール群

VFF：von Frey filament、WD：weight distribution

【脊髄後根神経節細胞】

脊髄後根神経節に ASIC3 陽性細胞が存在し、ASIC3 陽性細胞はコントロール群 $28.2 \pm 7.2\%$ 、繰り返し酸投与群 $39.2 \pm 9.3\%$ と有意に増加していた。一方、TRPV1 陽性細胞に発現率の増加を認めなかった。

【脊髄後角における転写因子 CREB 発現率】

繰り返し酸投与モデルにおいて両側性に pCREB 陽性細胞数が有意に増加した。特にラミナ I-III の浅層において増加率が高かった(図2)。

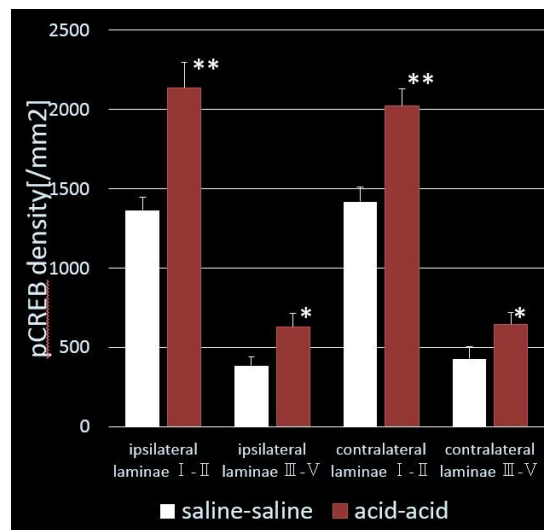


図2 脊髄後角 pCREB

繰り返し酸投与モデルにおいて両側性に pCREB 陽性細胞数が有意に増加した。

）関節痛モデルにおける酸感知機構アンタゴニストの疼痛抑制効果

PcTx1, BCTC に明らかな鎮痛効果はなかった。一方、APETx2 は 2 回目酸投与直前に投与すると強い鎮痛効果を認めた。14 日目に APEX ” を投与しても鎮痛効果は得られなかった(図3)。

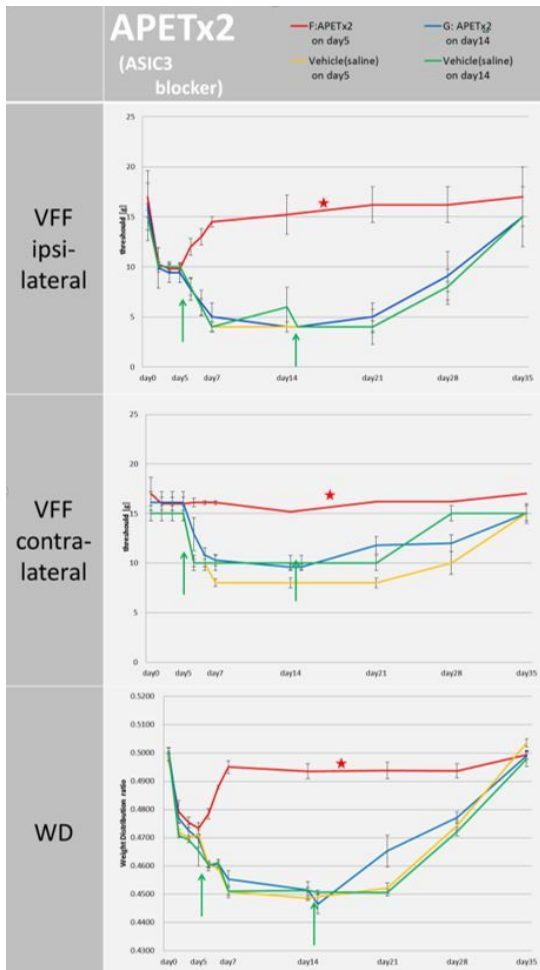


図3 APETx2 (ASIC3 ブロッカー) による鎮痛効果

赤：5日目 APETx2 投与群、青 14 日目 APETx2 等群、黄：5 日目生食投与群、緑：14 日目生食投与群

VFF：von Frey filament、WD：weight distribution

関節破壊モデルにおける酸感知機構アンタゴニストの疼痛抑制および関節破壊抑制効果

MIA モデルでは慢性関節痛モデルと同様の疼痛行動を示し、かつ関節破壊を伴っていた。APETx2 を連日投与すると関節軟骨の変性は抑制され、マイクロ CT では軟骨下骨の破壊像が軽減する結果も得られた (図4)。

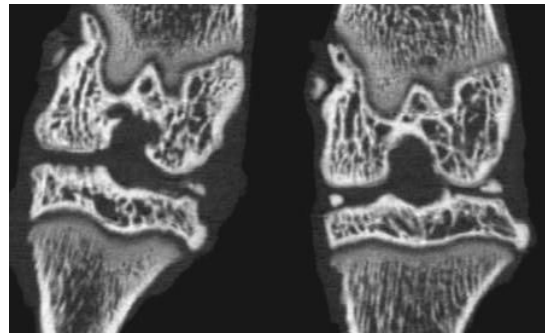
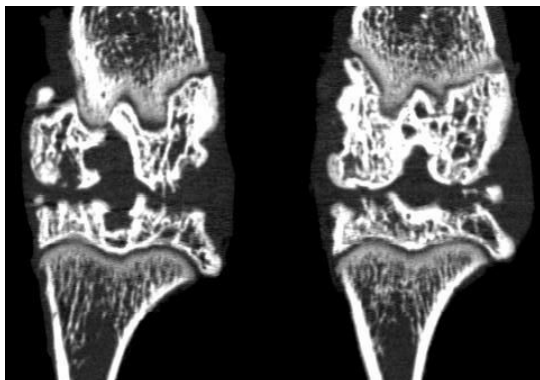


図4 マイクロ CT

上段：MIA モデル、下段：APETx2 投与群

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 3 件)

Sugimura N, Ikeuchi M, Izumi M, Kawano T, Aso K, Kato T, Ushida T, Yokoyama M, Tani T: Repeated intra-articular injections of acidic saline produce long-lasting joint pain and widespread hyperalgesia. Eur J Pain 19: 629-38, 2015 (査読有)

杉村 夏樹, 泉 仁, 阿漕 孝治, 池内 昌彦: 関節内酸投与による慢性広範囲痛覚過敏の中枢性機序 Journal of Musculoskeletal Pain Research 7 巻 2 号 Page153-158, 2015 (査読有)

阿漕 孝治, 池内 昌彦: 実験的関節炎モデルからみた関節痛の機序と治療 ペインクリニック 35 巻 8 号 Page1018-1025, 2014 (査読有)

[学会発表](計 2 件)

関節痛と神経機能変化 池内 昌彦 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会 2016 年 10 月 13 - 14 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

変形性膝関節症の病態と痛み 池内 昌彦 第 127 回中部日本整形外科災害外科学会・学術集会 2016 年 9 月 30 日-10 月 1 日、まつもと市民芸術館 (長野県松本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池内 昌彦 (IKEUCHI, Masahiko)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00372730

(4) 研究協力者

Kathleen Sluka (KATHLEEN, Sluka)

アイオワ大学・理学療法科・教授

泉 仁 (IZUMI, Masashi)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教