

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463056

研究課題名(和文) 疼痛伝達増幅機序の解明と難治性疼痛克服戦略

研究課題名(英文) Elucidation of amplification mechanisms in nociceptive signals and therapeutic strategy of intractable pain.

研究代表者

正木 英二 (Eiji, Masaki)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40221577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：手術切開による組織神経損傷が1次、2次求心性知覚神経修飾に与える影響を、術後痛モデルを用いて確認した。

術後痛モデルとして後足、眼窩下神経を切開し、逃避反応並びに病的行動を評価した。末梢神経活動は皮膚一腓骨神経標本にて活動電位を測定した。

1) 脊髄後角における手術侵襲によるBDNF過剰発現はマイクログリア活性抑制薬により抑制されなかった。2) D2受容体は脊髄レベルにおいて、手術侵襲により障害・修飾を受けなかった。3) 末梢神経においてPAR-2受容体の活性化が術後痛の発生に関連していることが明らかとなった。4) 術後痛に対する電離還元水素水の影響は一定の結果を得られていない。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of tissue-neural damage with surgical incision on the modification of primary and secondary afferent neurons in the postoperative pain model. The postoperative pain was established by plantar and infra-orbital nerve incision and the withdrawal responses along with sickness behavior were evaluated. Using the rat glabrous in vitro skin-tibial nerve preparation, afferent activities from single mechanosensitive nociceptors were recorded. 1) The microglial activation inhibitor had no effect on dorsal horn BDNF overexpression during the early post-incision period. 2) The impairment and/or modification of D2-like receptors in the spinal cord is not involved in the postoperative decrease in nociceptive threshold. 3) PAR-2-mediated excitation and sensitization of peripheral primary nociceptors was involved in the neuropathic component of postoperative pain. 4) The confidential results of hydrogen water on the postoperative pain status have not been elucidated yet.

研究分野：麻酔疼痛管理学

キーワード：術後痛 BDNF ドパミン受容体 神経障害性疼痛 抗酸化 末梢神経記録

1. 研究開始当初の背景

術後痛は現在においても、患者にとって最大の不安・恐怖であり、医学・社会的な問題の1つとなっている。その特徴として、a) 神経障害性成分を含んでいる複雑な疼痛状態である。 b) 未だに十分な鎮痛方法がない。 c) 神経成長因子・サイトカインなどが神経障害性疼痛成分を惹起する。 d) アルファ2作用薬、抗うつ薬など、いわゆる鎮痛剤とは異なった新たなクラスの薬剤により術後疼痛反応が緩和され、通常の疼痛状態とは異なることが示唆されている。

申請者らもラット脳幹スライスにて、超短時間性ベーター遮断薬であるエスモロールは選択的に侵害受容2次求心性ニューロンへの抑制性神経伝達物質の放出を増加させること、また、エスモロールの脊髄腔内投与は抗侵害作用を有することを明らかとした。さらに、臨床研究において、2作用薬であるデクスメトミジンの術中高容量の使用は術後鎮痛作用を現し、いわゆる、鎮痛剤とは異なったクラスの薬剤による術後鎮痛効果を証明し、新たな治療戦略の可能性を示した。

手術侵襲による神経・組織損傷、また、それに伴う炎症反応により、切開部位ではNGF(nerve growth factor)が角化、線維芽細胞にて産生され(Wu et al, Anesthesiology 2009)、このNGFにより1次求心性神経が修飾を受け疼痛過敏状態を作り出すのと同時に、様々な神経調節物質を産生するようになる。NGFの産生、神経過敏状態は皮膚に加え深部組織である筋膜、筋肉を切開した際にはより増強することが報告され(Xu et al, Anesthesiology 2010) 深部切開(筋肉)がより術後痛発生に重要な影響を与える因子であることが明らかとなってきた。申請者らは上記2論文を発表したBrennanらとの共同研究で、傷害された筋肉にフォーカスを当てた。そして、あらたに開発した足底筋-脛骨

神経標本を用いて、どのように痛覚過敏を生じるのか、その性状と程度を研究してきた。この手技手法はその困難さからも世界的に例が無く、術後痛発生メカニズムを解明する上で非常に有用な実験手技である。この手技を用いて、切開された筋肉における侵害受容器が、術後創部で産生される乳酸の酸性度によりどのように感作され、痛みを生じるかを検討し、わずかなpHの変化でも、術後痛を生じることを明らかにした。一方、近年、酸に対する痛覚神経の反応に数種の酸感受性イオンチャネル Acid-sensing ion channels ASICs が密接な関わりを持つことが分かり、注目を浴びている。すなわち、神経・組織損傷により放出されるNGF、また、乳酸による酸性度変化が1次求心性神経の修飾に大きな役割を果たしていることが示唆される。

1次神経損傷・修飾により放出される様々な因子が神経・グリア細胞に作用し、複雑な術後疼痛の発生を引き起こすことが明らかとなっている(Hayashida K et al, Pain 2008)。脊髄後角ではミクログリアから放出されるBDNF (brain-derived neurotrophic factor) により、2次求心性神経細胞への抑制性入力が増強性に変えられることが明らかとなり(Coull JAM et al, Nature 2005)、神経障害性疼痛発症機序として注目されている。しかしながら、我々の行ってきた術後痛モデルを用いた研究では、もっとも強く痛みを訴える術後2日間ではミクログリア活性化は生じず、脊髄後角でのBDNFの産生、その増加に伴う疼痛反応には1次求心性神経の活動が大きく関与していることが示唆された。さらに、深部組織まで切開を加えた術後痛モデルにおいて、自発的活動電位は1次神経に比べ2次神経でより多く観察され、1次神経の修飾が2次神経で増幅している可能性が示された(Xu J et al, Eur J Pain 2009)。

我々、さらに研究協力者のBrennanの研究結果より、手術後早期に起こる神経障害性疼

痛は脊髄レベルにおけるミクログリアの関与がないこと、1次神経の修飾が2次神経に強く影響を与えていること、すなわち、これまで考えられていた機序とは別の機序が術後痛を起こすことが示唆された。そこで、1次神経が修飾される機構を明らかとし、2次神経に与える影響を排除し、痛みの伝わる初期段階での疼痛増幅制御は、より高位で起こる修飾を効率的に防ぐことができるのではないかと推測した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、手術侵襲の痛覚伝導路、特に末梢神経から脊髄後角での疼痛制御、神経修飾機構へ与える影響を明らかとし、早い段階での神経修飾をなくすことで、未だ制御しきれない複雑な疼痛状態である術後痛をはじめとする難治性疼痛に対する新たな治療薬、治療法の可能性を探ることである。

3. 研究の方法

1) 手術侵襲による脊髄後角BDNF過剰産生に対するミクログリア活性抑制薬の効果。術後痛ラットモデルにおいてミクログリア活性抑制剤のミノサイクリンを脊髄内に投与し、機械、熱刺激逃避反応時間を測定した。また、行動評価の後に脊髄を摘出しBDNF産生ならびにミクログリア活性を免疫組織学的に評価した。

(a) ラット脊髄カテーテルの挿入: ヤクシュらの方法により脊髄カテーテル挿入ラットを作成。

(b) 術後痛モデルラットの作成: 術後痛モデルはブレンナンらの方法でラット後足切開により作成。

(c) 薬剤投与: 脊髄カテーテルよりマイクロシリンジを用い薬剤を注入。

(d) 鎮痛効果の測定: Von Frey filamentによる機械刺激、赤外線熱刺激試験により、経時的に評価した。

(e) 抗BDNF抗体を用い、脊髄後角での

BDNF産生を、ミクログリア活性マーカーであるOX-42でミクログリア活性を評価した。

2) 手術侵襲による脊髄D2受容体障害・修飾作用。1)と同様の実験モデル、疼痛評価方法を用いD2レセプター作動薬、遮断薬のキンピロール、スルピリドの効果を検討した。

3) 末梢神経レベルにおけるPAR-2受容体の活性化と術後痛発生の関連性。

術後痛モデルを用い疼痛行動評価を行うとともに末梢神経標本でPAR-2刺激薬による神経活動に与える影響を調べた。

(a) 足底を切開する術後痛モデルを作成し、自発痛、機械・熱刺激に対する反応を経時的に評価し、基礎的データを収集。

(b) PAR-2を阻害するantagonist ENMD1068を足底に前投与し、その後切開、行動評価を行い、術後痛の軽減を確認。

(c) PAR-2活性化を促すトリプターゼおよびPAR-2 agonist SLIGRL-NH₂を投与し、PAR-2単独の活性化がどのような痛みを誘発するかを確認。

(d) 足底筋-後脛骨神経標本を用いて一次求心性線維がagonistによりどのように感作されるかを検索。

4) 術後痛に対する抗酸化作用を有する電離還元水素水の影響。

強い抗酸化作用を有する電離還元水素水の術後病的行動に与える影響を検討し、術後痛に対する効果を調べた。

(a) 術後痛モデルラットの作成: 術後痛モデルは眼窩下神経を切断することにより作成した。

(b) 鎮痛効果の測定: Von Frey filamentによる機械刺激より経時的に評価した。

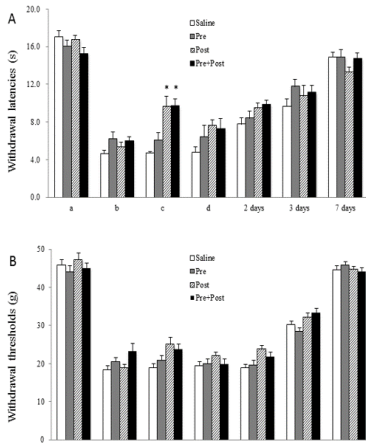
(c) 病的行動は疼痛行動評価後72時間、TraffiCage systemを用い、自発的運動量を測定することにより評価した。

4. 研究成果

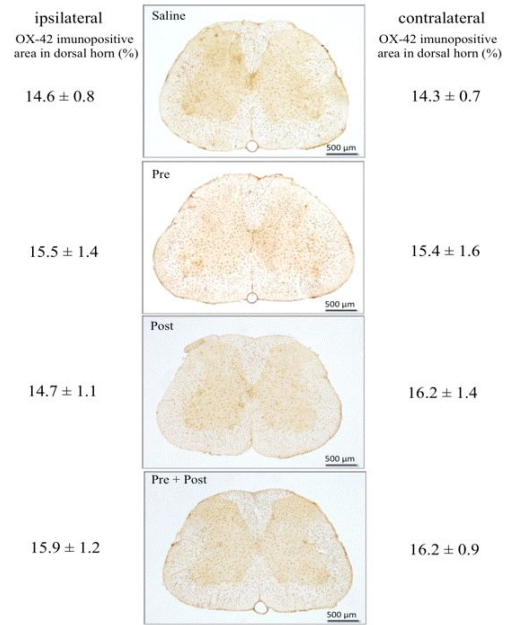
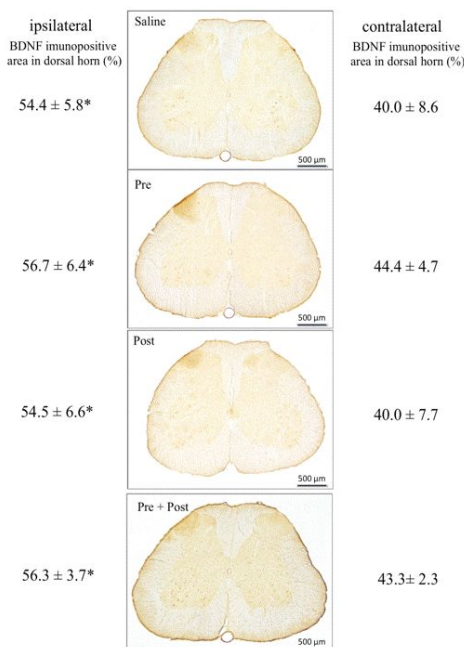
1) 手術侵襲による脊髄後角 BDNF 過剰産生に対するマイクログリア活性抑制薬の効果。

(a) マイクログリア活性抑制薬の術後痛に与える影響

マイクログリア活性抑制薬であるミノサイクリンは術後早期に熱刺激に対する鎮痛効果を示したが、その効果は一時的であり、また、機械刺激に対する効果は認められなかった。

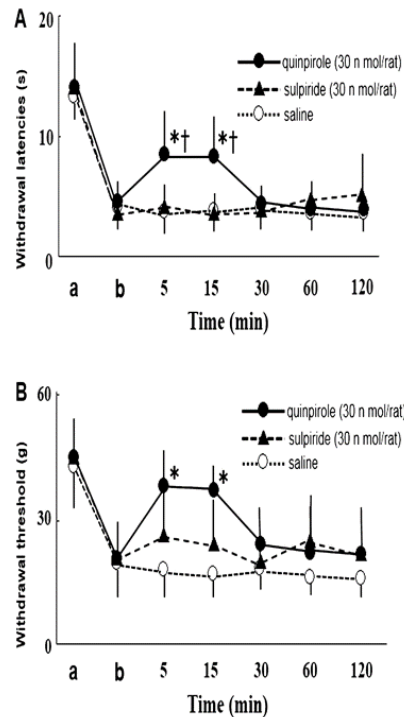


(b) ミノサイクリンのマイクログリア活性ならびに BDNF 過剰産生に対する効果
ミノサイクリンは術後早期の BDNF 過剰産生にならびにマイクログリア活性影響を与えなかった。



2) 手術侵襲による脊髄 D2 受容体障害・修飾作用。

D 2 作動薬のキンピロールにより足底切開により生じた、熱・機械刺激による疼痛過敏は抑制されたが、D 2 作動薬のスルピリドは疼痛過敏反応には影響を及ぼさなかった。

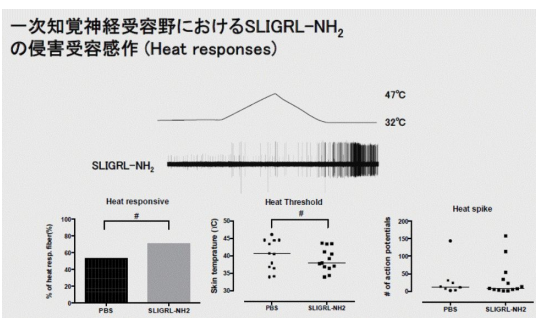
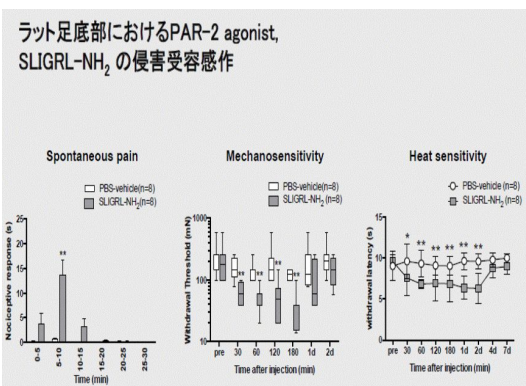
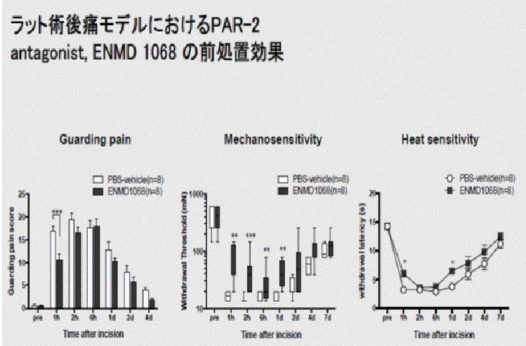


3) 末梢神経レベルにおける PAR-2 受容体の活性化と術後痛発生の関連性。

PAR-2 受容体拮抗薬により術後痛抑制され、

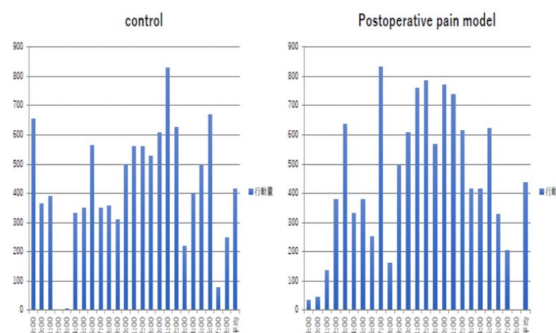
また、刺激薬により惹起された。

末梢神経標本による自発的活動電位は PAR-2 受容体刺激薬によりその発射頻度が増加した。



4) 術後痛に対する抗酸化作用を有する電離還元水素水の影響。

術後痛モデルでの疼痛反応評価ができず、術後の疼痛過敏状態ができていないか否かが判断できていない。また、病的行動も術後痛モデルとコントロールでの差がはっきりとしてなく、一定の見解が得られていない。したがって、電離還元水素水の効果もこれまでのところ判断ができない。



5) 考察

手術切開により、疼痛過敏状態が引き起こされ、さらにBDNFが過剰産生された。このことは手術侵襲により産生されたBDNFにより疼痛制御機構が何らかの障害・修飾を受けていることを示唆している。しかしながら、ミクログリア活性抑制剤のミノサイクリンによりBDNF過剰産生が抑制されず、また、ミクログリア活性にも影響を及ぼさなかったことから、術後早期に見られる疼痛過敏状態を作り出すBDNFはミクログリアでは産生されず、1次求心神経などの他の細胞から放出されている可能性が示された。

D2作動薬により術後痛は抑制され、遮断薬が何の効果を示さなかったこと、また、健常側との比較で、作動薬・遮断薬ともに奇異的な効果を示さなかったことから、下向性抑制性伝導路のドーパミン抗侵害神経は手術切開により修飾(抑制性の伝達が興奮性になるような)を受けない可能性が高いことが示された。

ラット術後痛モデルにおいて、PAR-2の活性化は自発痛、痛覚過敏および熱覚過敏を誘発し、一次神経線維において、自発活動を増加した。肥満細胞の脱顆粒に伴うトリプターゼの放出はPAR-2を介して、初期の手術後痛の発生に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

電離還元水の術後痛、病的行動に対する効果は、その疼痛ならびに行動評価ができていないことから、一定の結論を出すに至っていない。

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)

1) Ohtani N, Masaki E. D2-like receptors in the descending dopaminergic pathway are not involved in the decreased postoperative nociceptive threshold induced by plantar incision in adult rats. J Pain Res 2016;9:865-869.

doi: 10.2147/JPR.S120470 査読あり

2) Masaki E, Mizuta K, Ohtani N, Kido K. Early Postoperative Nociceptive Threshold and Production of Brain-Derived Neurotrophic Factor Induced by Plantar Incision Are Not Influenced with Minocycline in a Rat: Role of Spinal Microglia. Neurosignals. 2016;24:15-24.

doi: 10.1159/000442608 査読あり

[学会発表](計 4件)

1) Mizuta K, Matoba A, Matsuyama N, Mizuta F, Masaki E, Emala CW Sr. The short chain free fatty acid receptor FFAR3 is expressed and sensitizes cAMP accumulation in human airway smooth muscle. The annual meeting of American society of Anesthesiologist. A2220, Chicago, Illinois, Oct 18, 2016.

2) Kido K, Masaki E. Osmolarity changes contribute to nociceptive sensitization induced by activation of Protease-Activated Receptor 2 (PAR-2) in the rat. Neuroscience 2015. 703.04/P37, Chicago, Illinois, Oct 18, 2015.

3) Mizuta K, Matoba A, Hori A, Yamamoto N, Masaki E, Emala CW. The free fatty acid receptor 1 promotes human airway smooth muscle cell proliferation through PI3K/Akt and MEK/ERK activation. The annual meeting of American society of Anesthesiologist. A2273, San Diego, California, Oct 25, 2015.

4) Kido K, Masaki E. Nociceptive sensitization by activation of Protease-Activated Receptor 2

(PAR-2) in rats. Neuroscience 2014. 534/HH24, Washington DC, Nov 18, 2014.

[図書](計 0件)

[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

正木英二(MASAKI EIJI)
東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：40221577

(2)研究分担者

城戸幹太(KIDO KANTA)
東北大学・大学病院・助教
研究者番号：40343032

水田健太郎(MIZUTA KENTARO)
東北大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：40455796

(3)連携研究者

()
研究者番号：

(4)研究協力者

()