

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26560275

研究課題名(和文) 新たな線維筋痛症モデル動物の開発と運動療法の生物学的効果の探索

研究課題名(英文) New model animal with fibromyalgia: peripheral mechanism and effect of exercise for that.

研究代表者

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授

研究者番号：20380834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では足関節不動化により発生する筋痛の病態解明を行い、これが線維筋痛症モデルとして妥当かどうかを検証した。具体的には、ラット足関節をギブスで4週間固定し、筋痛の発生状況、脊髄後角とDRGにおける中枢性感作、骨格筋内のNGF、末梢神経線維の分布状況を検索した。結果、ラット腓腹筋において機械的刺激に対する痛覚閾値、NGF発現増加、神経C線維の神経密度増加を認めた。また、脊髄後角ではCGRPの増加、DRGでは感覚神経細胞のphenotype switchが認められ、慢性的な中枢神経感作の徴候が認められた。これらの事象は線維筋痛症の末梢病態と発生メカニズムに關与するのではないかと考える。

研究成果の概要(英文)：We examined the mechanical sensitivity, expression of nerve growth factor (NGF) and distribution of peripheral nerve fiber in skeletal muscle and central sensitization in spinal cord, after cast immobilization of rat limb. This examination was based on our hypothesis that immobilization of limb induces a muscular pain similar to fibromyalgia. At the result, mechanical hypersensitivity and increases in NGF and C nerve fibers was shown in medial gastrocnemius muscle after immobilization of ankle joint by cast. These changes lead to the increase of CGRP in dorsal horn of spinal cord and phenotype switch in DRG neuron which lead to central sensitization. We suggested that the immobilization-induced pain could be used as a model of fibromyalgia.

研究分野：リハビリテーション学

キーワード：線維筋痛症 痛み NGF 不動 中枢性感作

1. 研究開始当初の背景

運動器の慢性痛疾患として知られる線維筋痛症 (Fibromyalgia: FM) は、その発生機序がほとんど解明されておらず、そのため効果的な薬物も開発されていない。ただ、FM 患者は全身の筋肉痛、関節痛が主症状であり、Fear avoidance model を呈していることが多いことから、不活動が痛みの発生・増悪因子として関わっている可能性が高いと思われる。実際に、これまでに報告されている FM の骨格筋の所見には、関節を不動化したラットの骨格筋と共通した所見が数多く見受けられ、これは FM の骨格筋が不動または不活動に曝されていることを裏付けている。また、Terkelsen ら (2008) は健康なボランティア 30 名の前腕から手関節を 4 週間ギプスで不動化し、第 1 指と第 2 指の間の皮膚を圧迫した際の圧力値によって痛覚閾値を評価した結果、不動を解除した直後のみならず、解除 3 日後、28 日後においても痛覚閾値の低下が認められ、不活動による痛覚閾値は長期間持続すると、中枢性感作が生じ、慢性痛に発展するとされている。つまり、FM の発生機序の末梢機構に骨格筋が関わっているとすれば、それは長期間にわたる不活動に伴う痛覚閾値の低下である可能性がある。

一方、先行研究では遅発性筋痛の発生には同筋内の神経成長因子 (nerve growth factor; NGF) の発現増加が深く関与することが報告されている (Terkelsen AJ, et al, 2008)。NGF は神経栄養因子に分類され、感覚神経や交感神経の発達、機能維持に必要不可欠な因子として知られている。その一方で、NGF は痛みの内因性メディエーターでもあり、ヒトや動物において NGF の筋内投与は圧痛覚閾値の低下すなわち痛覚過敏を引き起こすことが明らかとなっている (Sekino Y, et al., 2003)。これらのことから、我々は線維筋痛症における末梢病態は不活動に起因するものであり、それには NGF が関わっていると仮定した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、不活動によって誘導される新たな FM モデルを開発し、その発生機序を解明することである。

3. 研究の方法

(1) 実験 : 不動に伴う筋内での NGF の発現変化ならびに末梢神経密度の変化

実験動物

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 30 匹を用い、一側足関節を以下の方法で不動化する不動群 (n=20) と無処置の対照群 (n=10) に無作為に振り分けた。そして、不動群に対してはペントバルビタールナトリ

ウム (40mg/kg) の腹腔内投与によって麻酔を行い、右側足関節を最大底屈位の状態でギプス包帯を用いて 2 週間 (n=5)、もしくは 4 週間 (n=15) 不動化した (図 1)。なお、その際は浮腫の発生を確認するために足指を露出させ、不動期間中は浮腫の発生やギプスの緩みを防ぐ目的で 2~3 日毎にギプスの巻き替えを行った。一方、対照群は各不動期間のラットと週齢を合致させる目的で 10 週齢時 (n=5) ならびに 12 週齢時 (n=5) まで通常飼育を行った。なお、左側後肢 (非不動側) と両側前肢は無処置であり、ギプス固定後もラットはこれらによって飼育ケージ内を自由に移動することができた。加えて、ギプスの巻き替えは麻酔を行って実施したが、それによる成長不良の影響が考えられるため、対照群にも実験群と同頻度で麻酔のみを行った。すべてのラットは室温 24℃、明暗サイクル 12 時間の飼育室で飼育し、飼料および水は自由に摂取させた。

本実験は長崎大学動物実験委員会に実験計画書を提出し、承認を受けた後に (承認番号: 1107040938)、長崎大学先端生命科学センター動物実験施設を利用して行った。



図 1 足関節不動モデル

筋痛の発生状況の評価方法

筋痛の発生状況の評価は圧刺激鎮痛効果測定装置 (Randall-Selitto, Ugo Basile, Model37215) を用いて行った。具体的には、ラットの上半身を布で拘束し、静寂な環境下を保った状態で、先端直径が 8mm のプローブで皮膚上から腓腹筋外側頭を 48g/秒の条件で漸増加圧し、後肢の逃避反応が出現する圧力値を測定した。測定は 5 回行い、最大値と最小値を除外した 3 回の測定値の平均値を筋圧痛覚閾値のデータとして採用した。

材料採取

各不動期間終了後は、すべてのラットの腹腔内にペントバルビタールナトリウム (40mg/kg) を投与し、麻酔を行った後、腓腹筋外側頭を採取し、生化学的解析と組織学的検索に供した。また、一部のラット (対照群, n=5; 実験群, 4 週, n=10) は生理食塩水を心臓より灌流し脱血を行った後、4% PFA で灌流し固定を行い、第 4・5 腰髄とその後根神経節 (Dorsal Root Ganglion; DRG) を採取し、10・20% スクロースを含む PBS に浸漬・置換した上で免疫組織化学的解析に供した。

生化学的解析

細切りした筋試料はホモジネートし、その後、4℃, 12,000rpm で遠心分離を行い、その上清液を回収した。そして、上清液内の NGF 含有量を Rat NGF/NGF β ELISA kit (Bosterbio, EK0471) を用いて測定し、BCA Protein Assay Kit (Thermo, 23227) を用いて測定した総タンパク量で除し、データとして採用した。

免疫組織化学的解析

筋試料をトラガントガムに包埋後、液体窒素で -80℃ に冷却したイソペンタン液内で急速凍結し、クライオスタット (Leica 社, CM1950) を用いて 40 μ m 厚の連続横断切片を作製した。そして、一次抗体として mouse anti-NF200 (1:1000; Sigma, N0142), rabbit anti-peripherin (1:1000; Assay Biotechnology, C0301) を用い免疫染色を行った。染色像は全視野をパーソナルコンピューターに取り込み、NF200 (A 線維) ならびに Peripherin (C 線維) の陽性線維の総数を計測した。また、一部の凍結包埋はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、切片上に確認できる筋線維の総数を計測した。そして、筋線維 1000 本当たりの各陽性線維数を算出し、これらのデータを A 線維ならびに C 線維の密度とした。一方、脊髄および DRG 試料に関してはトラガントガムに包埋後、液体窒素で冷却したイソペンタン液内で急速凍結し、その後、厚さ 20 μ m の凍結切片を作製し、一次抗体として抗カルシトニン遺伝子関連ペプチド (calcitonin gene-related peptide: CGRP) 抗体 (1:5,000; rabbit polyclonal antibody; Santa Cruz Biotechnology) を用いた。そして両側の脊髄後角における浅層 (L1-L6 層) と深層 (L7-S2 層) の CGRP 分布状況を画像解析ソフト NIS Elements (Nikon 社製) を用いて解析した。また、DRG に関しては CGRP 陽性神経細胞数をカウントして単位面積あたりの細胞数を算出し、さらに個々の陽性神経細胞の面積を測定してヒストグラムを作成した。

(2) 実験 : NGF 受容体の阻害剤投与実験

実験動物

実験動物には 8 週齢の Wistar 系雄性ラット 18 匹を用い、この内、12 匹のラットに関しては、実験と同様の方法で右側足関節を 4 週間不動化した。そして、NGF 受容体の阻害剤である K252a を腓腹筋外側頭に投与する K252a 群 (n=6) と、その疑似処置を行う vehicle 群 (n=6) に振り分けた。また、残りの 6 匹のラットに関しては上記の 2 群のラットと週齢を合致させるため 12 週齢時まで通常飼育し (以下、対照群)、以下の実験に供した。なお、ラットの飼育環境などは実験と同様である。

NGF 受容体の阻害剤投与の方法

NGF 受容体の阻害剤としては、K252a (Sigma, K1639) を選択した。この薬剤は、NGF がその受容体である TrkA と結合後、TrkA のリン酸化の過程において ATP との結合を遮断することで TrkA のリン酸化を阻害することが知られている (Hefti Ffm et al., 2006)。

K252a 群に対しては K252a (30 μ g/kg) を 10% DMSO/PBS に溶解し、腓腹筋外側頭に 50 μ l 投与した。一方、疑似処置を行う vehicle 群には 10% DMSO/PBS のみを腓腹筋外側頭に 50 μ l 投与した。なお、K252a の投与量に関しては Hayashi ら (2011) の報告を参考に決定した。

筋痛の発生状況の評価方法

筋痛の発生状況の評価は圧刺激鎮痛効果測定装置 (Randall-Selitto, Ugo Basile, Model37215) を用い、K252a の投与前ならびに投与後 10 分、20 分、30 分、60 分に経時的に行った。測定はそれぞれのタイムポイントにおいて 5 回行い、最大値と最小値を除外した 3 回の測定値の平均値を筋圧痛覚閾値のデータとして採用した。

4. 研究成果

(1) 実験

足関節不動に伴う筋痛の出現とその推移
不動群の不動側 (右側) において、圧痛覚閾値の低下は不動 2 週目から対照群に比べ有意に低下し、その状態が不動期間終了まで持続した (図 2A)。一方、非不動側においては両群ともに有意な変化は認められなかった (図 2B)。

不動に伴う筋組織の変化

腓腹筋外側頭の HE 染色像を鏡検した結果、不動群において廃用性筋萎縮の所見が観察されたが、筋線維損傷や筋浮腫などの病理所見は認められなかった (図 3)。

不動に伴う筋内 NGF 含有量の変化

NGF 含有量は、不動 2 週では対照群が 26.9 \pm 7.2 pg/mg、不動群が 42.2 \pm 9.8 pg/mg、不動 4 週では対照群が 20.9 \pm 8.7 pg/mg、不動群が 46.5 \pm 16.8 pg/mg であり、いずれの不動期間とも不動群は対照群より有意に高値を示した。しかし、不動期間で比較すると対照群、不動群ともに有意差は認められなかった (図 4)。

末梢神経密度の変化

A 線維の密度 (筋線維 1000 本当たりの NF200 陽性線維数) は、不動 2 週では対照群が 10.1 \pm 1.8 本、不動群が 11.1 \pm 1.4 本、不動 4 週では対照群が 11.3 \pm 1.5 本、不動群が 13.3 \pm 2.2 本であり、いずれの不動期間とも不動群は対照群より高値を示すものの、有意差は認められなかった。また、不動期間で比較しても対

照群, 不動群ともに有意差は認められなかった(図5, 6).

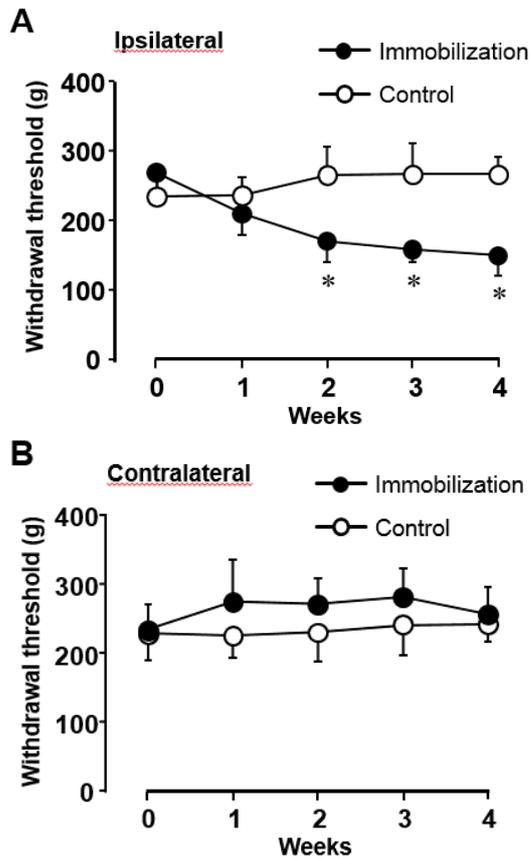


図2 足関節不動による腓腹筋の痛覚閾値の変化
A: 不動側(右側), B: 非不動側(左側).
Mean±SD. *p<0.05 vs Control.

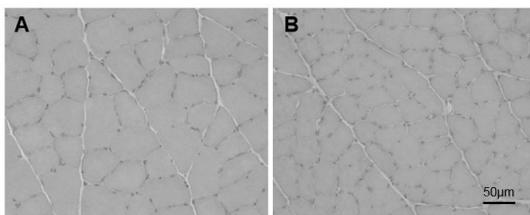


図3 腓腹筋(不動側)の組織像
A: 対照群, B: 不動, Bar=50µm.

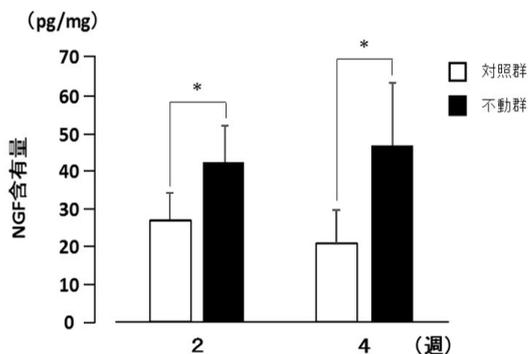


図4 足関節不動による筋内 NGF の変化(不動側)
Mean±SD. *p<0.05 vs Control.

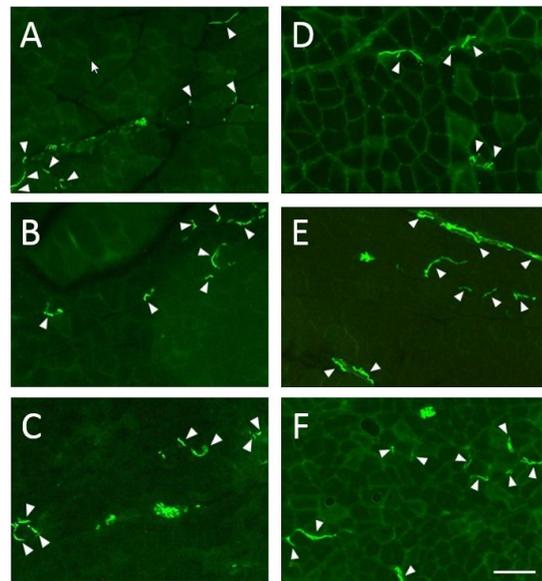


図5 腓腹筋内(不動側)の末梢神経分布
A: 対照群(A線維), B: 不動群2週目(A線維), C: 不動群4週目(A線維), D: 対照群(C線維), E: 不動群2週目(C線維), F: 不動群4週目(C線維). 矢頭はその陽性線維を示す. Bar=100µm

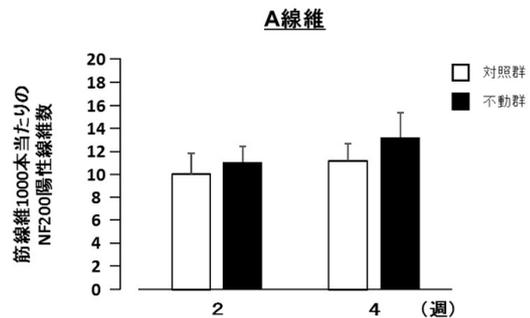


図6 A線維の神経密度
A: 不動側(右側), B: 非不動側(左側).
Mean±SD. *p<0.05 vs Control.

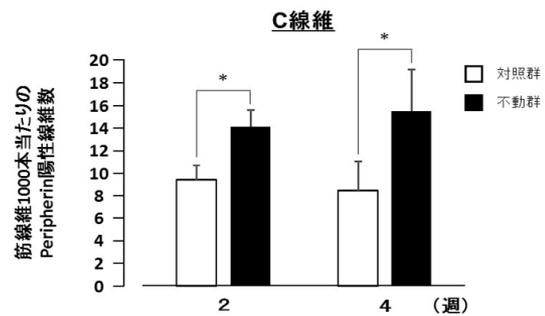


図7 C線維の神経密度
A: 不動側(右側), B: 非不動側(左側).
Mean±SD. *p<0.05 vs Control.

一方, C線維の密度(筋線維1000本当たりのPeripherin陽性線維数)は, 不動2週では対照群が 9.4 ± 1.3 本, 不動群が 14.1 ± 1.5 本, 不動4週では対照群が 8.5 ± 2.6 本, 不動群が 15.5 ± 3.7 本であり, いずれの不動期間とも不動群は対照群より有意に高値を示した. しかし, 不動期間で比較すると対照群, 不動群と

もに有意差は認められなかった(図5,7)。

脊髄後角の CGRP 分布状況

脊髄後角では浅層に強い発光を認め、深層では若干の陽性神経線維が認められた。その発光強度を定量化して対照群と不動群(4週)を比較すると、浅層においては対照群に比べ不動群(4週)が有意に高値を示した(図8,9)。

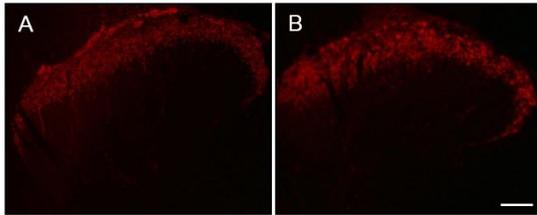


図8 脊髄後角の CGRP 染色像。
A:対照群, B:不動群(4週), Bar=100μm

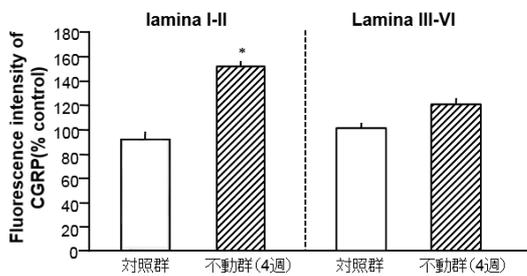


図9 脊髄後角 CGRP の染色強度
Mean±SE. *p<0.05 vs Control.

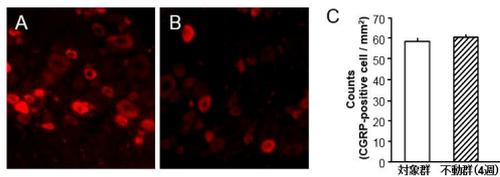


図10 DRG の CGRP 陽性神経細胞
A:対照群, B:不動側(4週). C:陽性細胞数の比較. Mean±SE.

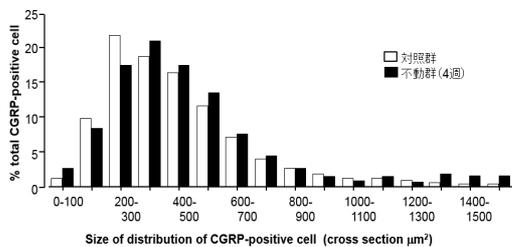


図11 CGRP 陽性神経細胞面積のヒストグラム

DRG の CGRP 陽性細胞数と面積

CGRP 陽性細胞数に各群間に有意な差はみられなかった(図10)。一方、対照群の CGRP 陽性神経細胞面積の分布を見ると(図11), 200-300μm² にピークがあり, CGRP を発現する神経細胞は小型が多いことを意味する。そして不動群(4週)ではピークが右方向にずれているのが認められる。これは CGRP を発

現する大型の神経細胞が増加したことを意味する。

(2) 実験

K252a の投与前における筋圧痛覚閾値は、対照群に比べ4週間の不動を行った K252a 群, vehicle 群ともに有意に低値を示し、この2群間には有意差を認めなかった。しかし、K252a 群の筋圧痛覚閾値は投与後10分から vehicle 群より有意に高値を示し、この状況は投与後60分まで持続した。ただ、対照群と比較すると投与後のすべてのタイムポイントにおいて K252a 群, vehicle 群はともに有意に低値を示した(図12)。

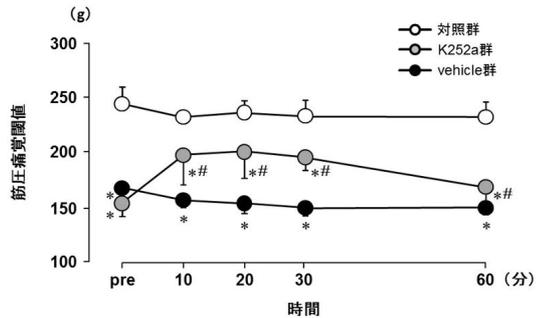


図12 NGF 受容体の阻害剤投与による筋痛の変化
Mean±SD. *p<0.05 vs Control. #p<0.05 vs K252a

(3) 考察

本研究の実験の結果、不動化した骨格筋の圧痛覚閾値の推移を検討したところ、不動2週後から有意な低下が認められた。不動により筋痛が発生する報告はこれまでにされておらず、新たな知見といえる。次に、筋内における NGF 含有量は不動2,4週後とも不動群は対照群より有意に高値を示したことから、不動に伴う筋痛の発生メカニズムに NGF の発現増加が関与している可能性が推測される。NGF は痛みの内因性メディエーターとしての作用を有することが知られており、その発現自体が筋痛の発生に関与している可能性がある。さらに、NGF は軸索内に取り込まれて逆行性に後根神経節(dorsal root ganglion; DRG)まで輸送され、様々な神経細胞内シグナルを活性化することにより、CGRP などの神経ペプチドを増加させ(Mantyh PW, et al., 2011), DRG で発現増加した神経ペプチドは脊髄後角にも放出されて、中枢性感作を惹起することで痛みの発生・増強を引き起こすといわれている。この現象は、本研究の結果でも認められた。特に、DRG 内で CGRP を発現する神経細胞が大型化したことは、感覚神経細胞の Phenotype Switch (Nishigami T, 2009)を示唆し、線維筋痛症を含む中枢神経感作による慢性痛の発生メカニズムに深く関与しているとされている。

次に、本研究の実験の結果、NGF 受容体の阻害剤である K252a を筋内投与した K252a

群の筋圧痛覚閾値は、投与後 10 分という極めて短時間から筋圧痛覚閾値の有意な上昇を認めた。これは、上記した NGF の発現増加が内因性メディエーターとして作用し、筋痛を引き起こしていることを裏付けている。ただ、K252a 群の筋圧痛覚閾値は、対照群のそれと同程度までの上昇は認められなかった。つまり、不動に伴う筋痛の発生メカニズムには NGF の発現増加だけではなく、他の因子が関与している可能性がある。先行研究では、不動に伴う表在性の痛みの発生メカニズムには皮膚における NGF の発現増加と末梢神経密度の増加が関与することを明らかにされている(Sekino Y, et al., 2014)。そして、実験において骨格筋内における末梢神経密度の変化を検索した結果、いずれの不動期間とも A 線維の密度には変化は認めないものの、C 線維においては対照群に比べ密度の増加が認められた。NGF が末梢神経の側枝発芽などを誘導し、神経密度を増加させることが広く知られている(Albers S, et al., 1994)。また、末梢組織内の C 線維数の増加が痛覚閾値の低下に関与することは示されている(Tague SE, et al., 2010)。したがって、本モデルの筋痛には NGF 自体の疼痛誘発作用だけでなく、それに続く C 線維数の増加も痛覚閾値の低下に寄与し、それが、実験の K252a 群の筋圧痛覚閾値が完全には正常化しなかったと推測できる。

(4) 結論

本研究では、足関節不動モデルラットを用いて新たな FM モデルを開発し、その発生機序を解明することを目的とし、2 つの実験を通して検討した。すなわち、実験では不動に伴う筋痛の発生に関与する因子として NGF と末梢神経密度に着目し、筋内におけるそれらの変化を検索した。その結果、NGF の発現増加と神経 C 線維の密度増加、加えて脊髄後角における中枢性感作の発生および DRG 神経細胞においては Phenotype Switch による筋痛の慢性化の徴候が認められた。これが FM の末梢病態ではないかと推測する。また、足関節不動モデルラットは不動期間を 4 週間以上にするにより線維筋痛症モデルラットとして用いることができると考える。しかしながら、今回の結果のみでは線維筋痛症筋痛の発生メカニズムの全貌は明らかではなく、また、運動療法の効果の検証には至らなかったため、今後検討を加える必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 11 件)

中野治郎, 川内春奈, 坂本淳哉, 沼田 悟, 岩寄徹治, 沖田 実: アジュバント誘発炎症モデルラットの皮膚アロディニアに対するリモイス R コートの効果. 日本運動器疼痛学会誌 8: 12-19, 2016 (査読有り).

有り).

Chuganji S, Nakano J, Sekino Y, Hamaue Y, Sakamoto J, Okita M: Hyperalgesia in an immobilized rat hindlimb: Effect of treadmill exercise using non-immobilized limbs. Neuroscience Letters 584: 66-70, 2015 (査読有り).

大賀智史, 関野有紀, 片岡英樹, 中野治郎, 沖田 実: ラット足関節不動モデルの骨格筋における痛覚過敏と神経成長因子の変化. 日本運動器疼痛学会誌 6(2): 107-113, 2014 (査読有り).

Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, Chuganji S, Sakamoto J, Yoshimura T, Origuchi T, Okita M: Immobilization-induced hypersensitivity associated with spinal cord sensitization during cast immobilization and after cast removal in rats. Physiol Sci 63(6): 401-408, 2013 (査読有り).

〔学会発表〕(計 17 件)

Oga S, Sekino Y, Hamaue Y, Nakano J, Okita M: Immobilization-induced muscle pain is associated with the upregulation of nerve growth factor and increased peripheral nerve density in rat skeletal muscle. 16th World Congress on Pain, 2016 年 9 月 26-30 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

Hamaue Y, Nakano J, Sekino Y, Sakamoto J, Okita M: The role of NGF in immobilization-induced hyperalgesia in rats. 16th World Congress on Pain, 2016 年 9 月 26-30 日, パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中野 治郎 (NAKANO, Jiro)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授

研究者番号: 20380834

(2) 研究分担者

沖田 実 (OKITA, Minoru)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・教授

研究者番号: 50244091

坂本 淳哉 (SAKAMOTO, Junya)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(保健学科)・准教授

研究者番号: 20584080

(3) 研究協力者

大賀 智史 (OGA, Satoshi)