

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：34417

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893308

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛の情動的側面に対する新規診断法の開発

研究課題名(英文) Exploration for the biomarker about the emotional aspect of neuropathic pain

研究代表者

首藤 由江 (SHUDO, Yoshie)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60509496

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：痛み感覚は体にある痛みの原因からの刺激だけでなく、痛みによる辛い気持ちも「痛い」という感覚を生み出す。このため、体だけに治療をしても痛みが良くならないことがある。今回痛み感覚の中でも「心の痛み」を測定する方法の開発を目的に、神経障害性疼痛マウスに心理的ストレスを与える研究を行った。その結果、心理的ストレスによって体内の遺伝子に変化が生じることが血液から明らかになった。この結果は「心の痛み」を血液検査で測定するという新たな方法の一助になり得る。

研究成果の概要(英文)：Feeling of pain is constructed by the stimulations from the damage of body and mind. It is necessary to distinguish the two stimulation because each correspondence for them is different. We tried to explore the biomarker which show the feeling of pain caused by the damage of mind. We found the change of gene expressions in blood serum by the psychological stress to the neuropathic pain and it may be the key to develop the new tool to access the feeling of pain caused by the damage of mind.

研究分野：心療内科

キーワード：神経障害性疼痛 情動的側面 NMDA受容体 miRNA 拘束ストレス

1. 研究開始当初の背景

痛みは生体における警告信号としての意義をもち、なんらかの疾患の存在を示唆するものとして存在する。痛みはその原因によって主に侵害受容性疼痛と神経障害性疼痛に分類され、これらに対する治療法についてはすでに多くの報告がある。一方で原因に応じた治療を行っているにも関わらず、治療抵抗性の疼痛患者が臨床では多く見られており、また器質的疾患の程度に見合わない痛みを訴える患者も少なくない。

痛みという感覚には知覚的側面と情動的側面があり、昨今では fMRI での研究において、痛み刺激によるシグナルは痛覚に関わる体性感覚野のみならず、前部帯状回や島皮質といった大脳辺縁系にも認めることが多く報告されている。しかし実際の臨床では痛みに関する2つの要素がどの程度関わっているかを鑑別することが困難であることから、情動的側面の関与が大きい疼痛に対しても知覚的側面への治療として漫然と鎮痛薬を投与するなど、情動的側面に対する治療が十分に行われていないのが現状である。その結果、鎮痛薬の大量投与による副作用や依存性の問題、医療経済上の問題、また情動的側面に対する治療の遅れから二次的うつ状態を呈するなどの問題も認めている。痛みに伴ううつ状態については、うつ状態が明らかになった時点で情動的側面への治療が開始されるが、治療効果を待たずに不幸にも自殺に至るケースもある。

心療内科での臨床に従事する中で、各科から紹介されてくる原因不明の痛みの患者に対する診療を行っているが、その多くは情動的側面の関与が大きな病態であり、この点に対して治療を行うことで難治化した病態が改善に向かう症例も少なくない。

情動的側面の関与の評価については患者の心理社会的側面も含めた問診を行い、また身体診察や検査から自律神経機能異常の有無を評価して判断を行っている。こうした診察を各科でも行うことができれば、痛みの情動的側面への治療が速やかに導入されることが期待できる。しかしながら、このような診察については一定の経験が必要であることや診察に時間がかかることなどから、全ての科において行われるということは現実的に難しく、簡易な診断法の開発が望まれる。

昨今、診断法の開発としては、マイクロ RNA を用いたバイオマーカーに関する報告が多くみられるが、血液から診断にいたるこうした手法は、非常に簡便で患者への負担も少なく理想的な方法の1つである。痛みについても情動的側面の関与を定量化できれば、早い段階化から情動的側面への治療を開始することが可能となり、患者のみならず判断に難渋している医療者の負担、また医療経済上の恩恵は大きいものと思われる。

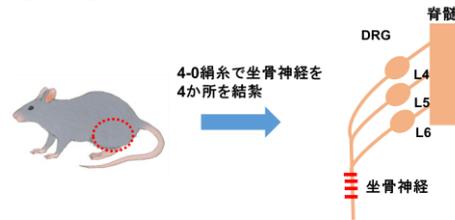
2. 研究の目的

本研究では神経障害性疼痛モデルマウスを用い、これに情動ストレスを与えることにより発現が変化するマイクロ RNA を探索することによって、神経障害疼痛の情動的側面の新規診断法となるバイオマーカーの開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作成

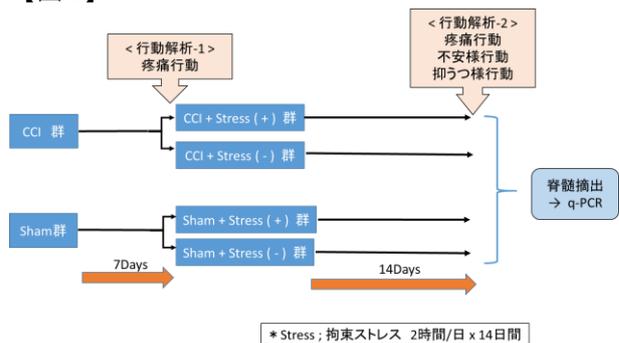
【図1】



神経障害性疼痛を抱えたマウスを用いて実験を行うために、神経障害性疼痛モデルマウス（坐骨神経結紮モデルマウス：Chronic constriction injury model、以下 CCI モデル）を作製した（図1）。具体的には、マウスに麻酔を投与して鎮静したのちに、左大腿部を切開。坐骨神経を露出して、絹糸で4か所を結紮する。最後にこの部分を縫合して完成となるが、結紮した絹糸が坐骨神経にダメージを与え続けることとなり、術後7日目で痛みはピークに達することが報告されている。

(2) 研究プロトコール

【図2】



今回の研究プロトコールを図2に示す。この研究では上述のような CCI モデルに加えて、コントロールとして Sham 群（偽手術群。左大腿部は切開するが、神経は結紮せずに患部を縫合する）の2群を用いた。各群を作製後7日目に、まず痛みの程度について行動解析を行った。その後各群をさらに2群に分け、一方には心理的ストレスとして拘束ストレス(2時間/日を14日間)を与えることとし、もう一方にはストレスを与えない群とした。つまり、①CCI+ストレス(+)群、②CCI群、③Sham+ストレス(+)群、④Sham群の4群

での比較検討を行う形をとった。これら4群はストレス負荷開始後14日目に再度痛みの程度の評価を行った。またストレスによる不安や抑うつ程度を評価するための行動解析も行った。各解析が終了したのちに、全血採血と脊髄(L4-L6領域)の摘出を行い、それぞれ解析を行った。

(3) 行動解析

① 疼痛行動； von Frey test

種々の条件によるマウスの痛み程度を評価するために、疼痛行動解析として von Frey test を行った。具体的には、機械刺激による痛みをマウスの患側後足に段階的に与えていき、疼痛行動(足をふる、足をなめる)を認めたところ疼痛閾値として、アロディニアを評価する。

② 不安様行動； Hole-board test

拘束ストレスによる心理面の変化(不安)を評価するために、Hole-board test による行動解析を行った。具体的には、床に直径2.2cmの穴が16個開いてある、26cm x 26cmの正方形の箱を使用する。マウスを箱に置き、マウスの新奇性を表す行動である nose-poking (穴をのぞき込む)と rearing (立ち上がる)回数を5分間記録する。これらの回数が少ないほど、不安が強い状態であると評価する。

③ 抑うつ様行動； 強制水泳テスト

拘束ストレスによる心理面の変化(抑うつ)を評価するために、強制水泳テストによる行動解析を行った。具体的には、直径10cm、深さ25cmの水槽に、深さ6cmの水(水温23-25度)をいれたものを用いる。マウスを水槽に入れると水槽から出ようとして泳ぎ始めるが、意欲が低下すると泳ぐことを止めて浮かんだ状態になる(=無動状態)。テストでは、始めに2分間水に馴化させた後に、4分間における無動時間を測定する。無動時間が長いほど、抑うつが強い状態であると評価する。

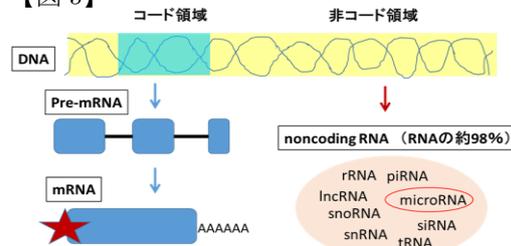
(4) 遺伝子発現の解析

各種条件を与えたマウスにおいて、何らかの遺伝子発現に変化を見出すことができれば、これらをコントロールする性質を持つ miRNA にも変化が生じている可能性がある。このことから、行動解析まで行った段階のマウスから脊髄(L4-L6)を摘出し、q-PCR による遺伝子解析を行った。摘出した脊髄からは RNA の抽出を行った。今回の研究では神経障害性疼痛を構成する主要な分子である NMDA 受容体のサブユニットである NR2A および NR2B の遺伝子を解析のターゲットとして選択し、各種遺伝子に特異的なプライマーを用いた q-PCR による解析を行った。コントロールには β actin を用いた。

(5) miRNA の網羅的解析

miRNA とは、non-coding RNA という、DNA 上にコードされているものの蛋白質へは翻訳されない RNA の中でも、21~25 塩基程度からなる一本鎖 RNA である(図3)。その働きは、ターゲットとなる mRNA の分解、または翻訳阻害することによって、遺伝子の発現を抑制することである。

【図3】



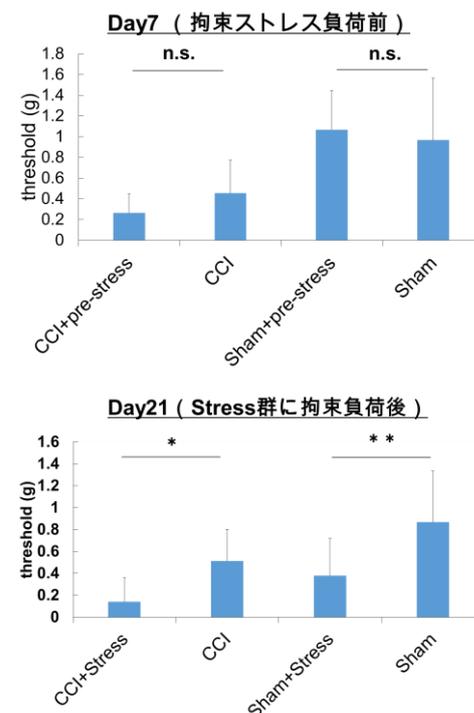
つまり、何らかの条件により miRNA が上昇するとターゲットとなる RNA は減少し、反対に miRNA が低下するとターゲットとなる RNA の発現が増加することになる。今回の研究では、神経障害性疼痛に拘束ストレスが加わることによって生じる miRNA の発現の変化を調べるために、CCI 群と CCI+Stress 群マウスの血清を採取し、これらにおける miRNA の発現について次世代シーケンスを用いた網羅解析を行った。

4. 研究成果

(1) 行動解析

① 疼痛行動

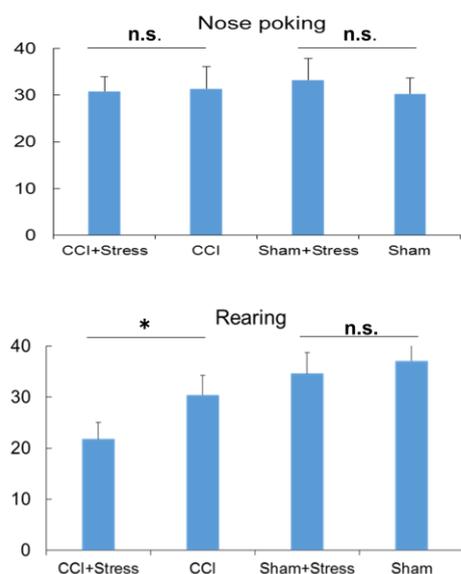
【図4】



マウスの患側後足に与えた機械刺激に対するアロディニアを評価したところ、CCI 群と Sham 群のいずれも繰り返す拘束ストレスによって疼痛閾値の低下を認めた (図 4)。このことから、慢性的な心理的ストレスがマウスの疼痛閾値を低下させることが示唆された (n=9, *p < 0.05, **p < 0.01)。

②不安様行動

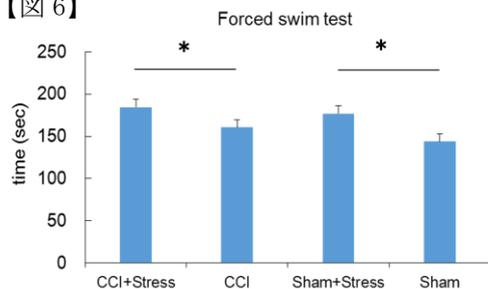
【図 5】



マウスの不安様行動を Hole-board test で解析した (図 5)。「Nose-poking」と「Rearing」の数の少なさは、マウスの不安が強い状態であることを意味する。「Nose-poking」については、CCI 群と Sham 群ではストレスの有無に関わらず有意差はなかった。一方で「Rearing」については CCI 群と CCI+Stress 群にて有意差を認めたことから、慢性的な心理的ストレスが神経障害性疼痛マウスの不安を増大させることが示唆された。(n=9, *p < 0.05)。

③抑うつ様行動

【図 6】

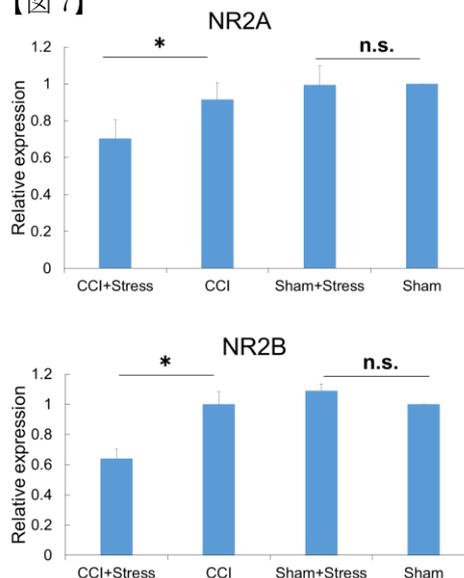


拘束ストレスによるマウスの抑うつの程度を、強制水泳テストで解析した (図 6)。その結果、CCI+Stress 群は CCI 群より無動時間が有意に長く、また Sham+Stress 群もまた

Sham 群より無動時間が長かった。このことから、慢性的な心理的ストレスがマウスに抑うつ状態をもたらすことが示唆された。(n=9, *p < 0.05)

(2) 遺伝子発現の解析

【図 7】



各群における脊髄 (L4-L6) での NR2A/NR2B 遺伝子の発現を qRT-PCR を用いて解析した (図 7)。その結果、CCI+Stress 群でのみ NR2A と NR2B 遺伝子発現が低下していた。この結果から、神経障害性疼痛に慢性的な心理的ストレスを与えることにより、脊髄における NMDA 受容体の発現が低下することが示唆された。(n=6, *p < 0.05)

(3) miRNA の解析

【表 1】

変化したmiRNA(%) = Reads (CCI+Stress)/(CCI) (%)		
NR2A	Sequence	(%)
miR-200a-3p	uaacacugucugguaacgaugu	452.2
miR-141-3p	uaacacugucugguaaagaugg	288.2
NR2B		
miR-195a-5p	uagcagcacagaaaauuggc	128.6
miR-16-5p	uagcagcacgaaaaauuggcg	128.6
miR-205-5p	uccuucauuccaccggagucug	537.0
miR-211-5p	uuccuuugucauccuuuggcu	496.1
miR-204-5p	uuccuuugucauccuauggcu	496.1
miR-328-3p	cuggccucucugcccuuccgu	173.3

CCI 群と CCI+Stress 群マウスの血清を採取し、これらにおける miRNA の発現について次世代シーケンスを用いた網羅解析を行った。次世代シーケンスによる解析後、リードデータの集計、および miRBase の配列データを用いた BLAST 検索によるアノテーションを行っ

た。各群のトータルリード数を以下に示す。

- CCI 群 ; 33, 554, 326
- CCI+Stress 群 ; 33, 173, 590

次に、miRNA に関するデータベースである miRDB を用いて、NR2A または NR2B 遺伝子の発現に影響すると推測される miRNA をリストアップし、今回の解析結果と比較検討したところ、繰り返す拘束ストレスにより発現が大きく変化している miRNA が検出された(表 1)。

(4) 考察

①NR2A/NR2B 遺伝子発現の変化について

脊髄後角の NMDA 受容体は神経障害性疼痛の中樞性感作において重要な役割を果たす受容体であり、末梢からの繰り返す痛み刺激により NMDA 受容体は活性化され、これが痛みの増強に繋がる。今回の研究では神経障害性疼痛に対し、更に慢性的な心理的ストレスとして拘束ストレスを繰り返し負荷したところ、痛みの悪化と共に NMDA 受容体のサブユニットである NR2A/NR2B 遺伝子の発現の低下を認めた。そのメカニズムについては詳細な解析が必要であるが、心理的ストレスにより脳内の pain matrix が活性化された結果、脊髄後角の NMDA 受容体に対する down regulation が生じ、末梢からの痛み刺激を制御しているのかもしれない。

②miRNA の変化について

CCI 群と CCI+Stress 群のマウス血清中の miRNA に関して、次世代シーケンスにおける網羅的解析を行った。解析データの中から NR2A または NR2B の発現に影響すると推測されている miRNA に着目して解析を行った結果、ストレスを与えた場合に著しく上昇している miRNA を検出することができた。脊髄での mRNA と血清中の miRNA の関係に関しては大変興味深く、詳細な解析を進める予定であるが、これらの上昇した miRNA は、神経障害性疼痛の痛み感覚における情動的側面を反映するバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

① 首藤由江, 福永幹彦, Psychological stress affected NR2A and NR2B expression in spinal cord of neuropathic pain model mice, 日本分子生物学会, 2015. 12. 1, 神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)

② 首藤由江, 福永幹彦 Study of the expression of neuropeptide pituitary adenylate-cyclase activating polypeptide (PACAP) in neuropathic pain mice by psychological stress, Society for neuroscience 2015,

2015. 10. 21, Chicago (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

首藤 由江 (SHUDO, Yoshie)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：60509496