

主論文の要旨

Repeated cold stress, an animal model for fibromyalgia, elicits proprioceptor-induced chronic pain with microglial activation in mice

繰り返し寒冷ストレスによる線維筋痛症モデルマウスでは、固有感覚誘発性のミクログリア活性化による慢性疼痛を発症する

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
機能形態学講座 機能組織学分野

(指導：桐生 寿美子 准教授)

若月 康次

【緒言】

機能性身体症候群は、器質的原因のみでは説明がつかない症状、苦痛、障害があり、それにより日常生活に支障をきたす病態を1つの疾患としてとらえたものである。代表的なものとして線維筋痛症が報告されている。線維筋痛症は全身の激しい疼痛、過度な疲労、睡眠障害や精神症状等、多彩な症状を呈する慢性難治性疾患である。種々のストレスにより発症、増悪するとされているが、詳細な神経機構は不明である。本研究では線維筋痛症の動物モデルとして用いられている、繰り返し寒冷ストレス(repeated cold stress: RCS)モデルを使い、疼痛の発症メカニズムの一端を明らかにすることを目的とした。

【対象および方法】

実験動物

実験動物にはC57BL/6マウスと、過活動した神経細胞のミトコンドリアをGFP(green fluorescent protein)で特異的に標識する *Atf3*:BAC トランスジェニック(Tg)マウスを用いた。この Tg マウスは ATF3 のプロモーター下でミトコンドリアを標識する GFP を発現する。GFP で標識されたミトコンドリアは樹状突起の先端から軸索の先端までニューロン全体に輸送されるため、活性化した神経回路の軌跡を明瞭に観察することが可能である。

RCS モデル

動物に凍傷や浮腫が起きない温度として7°Cと22°Cを30分間隔で交互に変化させ、それを7日間負荷する方法でモデルを作製した。

疼痛行動実験

RCS 前後で電子式フォンフライ装置を用いて後肢足底に圧刺激を行い、覚醒下にて最小機械逃避閾値を測定することで痛覚過敏を定量化した。

蛍光免疫染色

RCS モデルマウスを灌流固定し、脊髄及び後根神経節(DRG)を取り出しクリオスタットにて凍結切片を作製し免疫染色を行った。使用した抗体はミクログリアのマーカーである Iba1 抗体、神経細胞の過活動マーカーとして ATF3 抗体、過活動神経回路のマーカーとして GFP 抗体を用いた。また、侵害受容ニューロンのマーカーには TrkA 抗体、CGRP 抗体、IB4 を使用し、触圧覚ニューロンのマーカーには TrkB 抗体、固有感覚ニューロンのマーカーには TrkC 抗体、VGluT1 抗体、運動ニューロンのマーカーに ChAT 抗体を用いた。

逆行性神経トレーサー実験

Alexa647 標識されたコレラ毒素 B サブユニット(cholera toxin b subunit: CTXb) 溶液を RCS 後の Tg マウス後肢の様々な筋肉に注射した。灌流固定後作成した脊髄切片を用いて、逆行性に蛍光標識される運動ニューロンを同定した。

薬理実験

RCS 後の痛覚過敏が活性化ミクログリアの増加によるものかを調べるため、コロニ

一刺激因子 1 受容体の選択的阻害薬である PLX3397(Pexidartinib)を経口投与した。PLX3397 は RCS 開始 3 日前から投与し、RCS 期間中も継続投与、RCS 前後での機械逃避閾値を Vehicle 投与群と比較した。

【結果】

RCS 負荷したマウスは 17 日間持続する疼痛行動を誘発することが明らかになった。RCS 後の脊髄を組織学的に検討したところ、活性化ミクログリアが後角内側深層、中間帯、前角においてストレス期間依存的に増加していた。一方、DRG ではストレス期間依存的に神経過活動マーカーである ATF3 の発現が増加しており、さらに脊髄前角では一部の運動ニューロンに ATF3 が発現していた。ATF3 陽性運動ニューロンの周囲にはミクログリアが集積していた。そこで RCS によって過活動する神経回路を可視化するため *Atf3*:BAC Tg マウスを用いて RCS モデルを作製した。*Atf3*:BAC Tg マウスの DRG で発現する GFP 陽性ニューロンの多くは固有感覚ニューロンであり、他の感覚ニューロンのマーカーと比較して有意に多かった。さらに *Atf3*:BAC Tg マウスの脊髄前角および後角内側深層部に強く GFP が発現し、その 2 領域をつなぐ線維も GFP で標識されていた。逆行性トレーサー実験を行った結果、GFP 陽性運動ニューロンは後肢の足底筋に投射していることが明らかとなった。加えて足底筋の筋紡錘と神経筋接合部にも GFP が発現していた。従って、骨格筋の反射弓に沿って GFP が発現していると考えられた。さらに脊髄の足底筋の反射弓の経路に沿って、GFP の発現面積と活性化ミクログリアの数が有意に増加していた。そこで、PLX3397 を経口投与しミクログリアを除去したところ、RCS によるミクログリアの増加が抑制され、併せて疼痛行動も有意に抑制された。

【考察】

本研究では、*Atf3*:BAC Tg マウスを用いることにより、RCS 負荷後、足底筋の筋紡錘、DRG の固有感覚ニューロン、足底筋に投射する脊髄運動ニューロン、足底筋という反射弓の経路が活性化していることが明らかになった。脊髄における反射弓経路の GFP 陽性線維周囲に活性化ミクログリアが集積し、ミクログリアを抑制すると疼痛行動が軽減したことから、脊髄の反射弓の経路に沿った活性化ミクログリアの集積が痛覚過敏を惹起させていることが示唆された。一方、足底の皮膚や筋において、炎症に関連する IL-6、IL-1 β 、TNF- α の mRNA は増加せず、血中の炎症や筋損傷のマーカーである CRP とクレアチンキナーゼも上昇しなかった。さらに、末梢の侵害受容に関連する主だった神経成長因子の mRNA は、RCS モデルの筋では変化していないことが報告されていることから、RCS モデルで惹起される慢性疼痛は、非炎症性・非侵害受容性であり、骨格筋の固有感覚誘導性である可能性が示唆された。

機能性身体症候群に属する他の疾患である筋痛性脳脊髄炎モデル(低水位モデルラット)でも同様に固有感覚を介したミクログリアの活性化と疼痛行動が以前報告されていることから、負荷されるストレスは異なるが固有感覚の過活動が誘発するミクロ

グリアの活性化が、線維筋痛症と筋痛性脳脊髄炎の両モデルに共通する疼痛の原因であることは興味深い。

本研究ではなぜ足底筋が過緊張状態になるのかを探ることはできなかった。また、一定温度での寒冷ストレスは慢性疼痛を引き起こさないと報告されていることから、筋の反復的な緊張と弛緩が固有感覚の過活動化に関与している可能性があるという仮説を立てており、今後の研究課題である。

【結論】

本研究により、RCSモデルでは固有感覚の過活動がミクログリアの活性化を誘導し、病的な疼痛を惹起させるメカニズムが明らかになった。これは全く異なる実験系を用いた筋痛性脳脊髄炎モデルと類似していた。このことは一部の機能性身体症候群では筋の過緊張が共通の疼痛治療の対象である可能性がある。