

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06776

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛の新たな治療戦略 標的分子としての活性酸素産生酵素

研究課題名(英文) The role of NADPH oxidase, ROS-generating enzyme, on the neuropathic pain.

研究代表者

衣斐 督和 (Ibi, Masakazu)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：10336539

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は末梢神経損傷または化学療法薬による末梢神経障害と付随する精神症状における活性酸素産生酵素NADPHオキシダーゼの役割についてNOX1遺伝子欠損マウスを解析した。末梢神経損傷モデル(SNI)および化学療法薬(パクリタキセル、オキサリプラチン、ボルテゾミブ)により惹起される末梢神経障害にはNOX1が関わらないことを明らかにした。一方、SNIにより惹起される不安・うつ様行動には、海馬のNOX1が寄与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Development of the tactile allodynia was demonstrated until 4 weeks after SNI. Administration of paclitaxel and oxaliplatin induced allodynia, which sustained for 7 days, while bortezomib-induced allodynia sustained for 4 weeks. There was, however, no difference in the levels of neuropathic pain between WT and Nox1-KO. On the other hand, the SNI-induced anxiety- and depressive-like behaviors were significantly suppressed in Nox1-KO. In the hippocampus and hypothalamus of WT, the expression of NOX1 mRNA was significantly elevated following SNI. Delivery of miRNA against NOX1 to the hippocampus, but not to the hypothalamus of WT, restored SNI-induced emotional behaviors without affecting mechanical allodynia. Taken together, the anxiety- and depressive-like behaviors induced by neuropathic pain may be mediated by up-regulation of NOX1 in the hippocampus.

研究分野：神経薬理学

キーワード：NADPHオキシダーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

神経の障害に起因する難治性疼痛（神経障害性疼痛）は麻薬性鎮痛薬に抵抗性を示す持続した痛みである。効果的な除痛治療が十分ではないことから、しばしば慢性的な痛みにより不安や抑うつなどの精神症状を併発し、患者の QOL を著しく低下させる。現在治療には鎮痛補助薬が用いられているが、有効性や副作用の点で満足度が低く、より効果的な治療法の確立が望まれている。

一方、近年化学療法めざましい発展によりがんの完治が可能となり、がん治療における化学療法薬の重要性が増大している。しかし一部の薬物は知覚異常や神経痛など末梢神経障害を高頻度に惹起し、緩和する薬物が存在しないため減薬または休薬しなければならない、臨床上克服すべき問題となっている。

### 2. 研究の目的

本研究は神経障害性疼痛と、随伴する精神症状における活性酸素産生酵素 NOX1/NADPH オキシダーゼの役割と制御機構を解明することで、神経障害性疼痛の新たな治療戦略を開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1)動物

*Nox1* 遺伝子欠損マウス (NOX1-KO) と同腹仔の野生型マウス (WT) を明暗サイクル 12 時間環境下で、水および飼料を自由摂食させることで飼育した。実験は京都府立医科大学動物実験指針に従い行なった。

#### (2)坐骨神経損傷モデルの作製

坐骨神経損傷 (Spared nerve injury:SNI) モデルは Woolf らの方法に基づいて神経枝結紮することで作製した。

#### (3)化学療法薬投与による末梢神経障害性疼痛モデルの作製

本研究では化学療法薬としてパクリタキセル (4mg/kg, i.p.)、オキサリプラチン (5mg/kg, i.p.)、ボルテゾミブ (0.4mg/kg, i.p.) を用いた。

#### (4)痛覚閾値の測定

von Frey filament を用いた up and down 法により、触刺激に対する痛み行動の測定を行なった。

#### (5)不安様行動の評価

オープンフィールドテストの中心部への移行回数と滞在時間を指標として不安様行動を評価した。

#### (6)うつ様行動の評価

尾懸垂試験では無動時間を、ショ糖嗜好性試験ではその嗜好性を指標とし、うつ様行動を評価した。

### (7)アデノ随伴ウイルス (AAV) を用いた NOX1 発現抑制

NOX1 発現抑制が可能な人工マイクロ RNA (miRNA) を搭載した pAAV2/rh10 を海馬、視床下部に微量注入することで、各脳領域で NOX1 発現を抑制させた。

### 4. 研究成果

#### (1)化学療法薬により惹起される末梢神経障害における NOX1 の役割

タキサン系のパクリタキセル (PX)、白金製剤のオキサリプラチン (OXA)、プロテアソーム阻害薬のボルテゾミブ (BTZ) をそれぞれマウス腹腔内に投与した。溶媒投与群では痛覚閾値に変化は認められなかったが、化学療法薬を投与した WT では、著明な機械的アロディニアが惹起された。これら化学療法薬による機械的アロディニアは NOX1-KO でも惹起され、その強さは WT と同程度であった (Fig.1-3)。

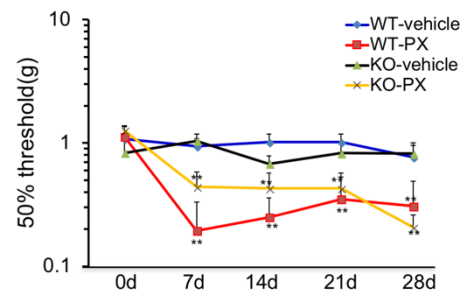


Fig.1 パクリタキセルによる痛覚閾値低下  
\*\* $p < 0.01$  compared with vehicle

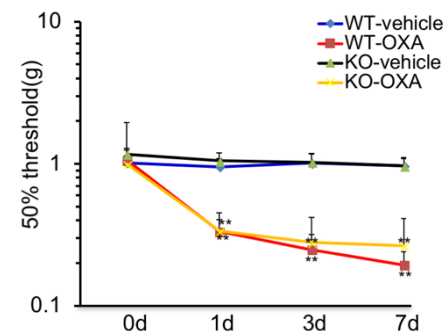


Fig.2 オキサリプラチンによる痛覚閾値低下  
\*\* $p < 0.01$  compared with vehicle

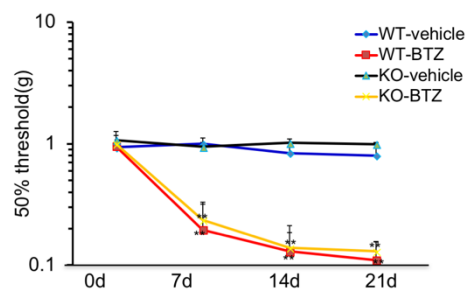


Fig.3 ボルテゾミブによる痛覚閾値低下  
\*\* $p < 0.01$  compared with vehicle

(2)SNI により惹起される不安・うつ様行動発現における NOX1 の役割

SNI による末梢神経障害の発現には NOX1 が関与しないが、SNI による不安行動発現に NOX1 が関与することを見出している。うつ様行動をショ糖嗜好性試験および尾懸垂試験を用いて解析した。ショ糖嗜好性試験で SNI により嗜好性が WT で減少したが、NOX1-KO では認められなかった。また尾懸垂試験で SNI により無動時間が WT で増加したが、NOX1-KO では認められなかった。以上の結果より、SNI により惹起されるうつ様行動の発現にも NOX1 が関与することが見出した (Fig.4)。

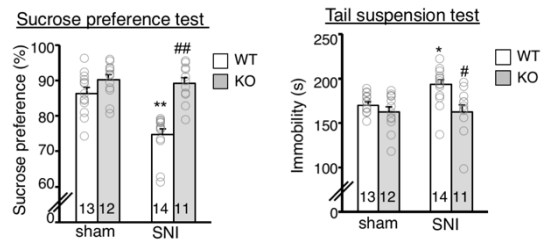


Fig.4 SNI によるうつ様行動発現  
\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  compared with sham  
## $p < 0.01$ , # $p < 0.05$  compared with WT/SNI

次に、不安・うつ様行動発現における NOX1 の責任脳領域を解析した。SNI により NOX1 mRNA の上昇が海馬、視床下部で認められた (Fig.5)。

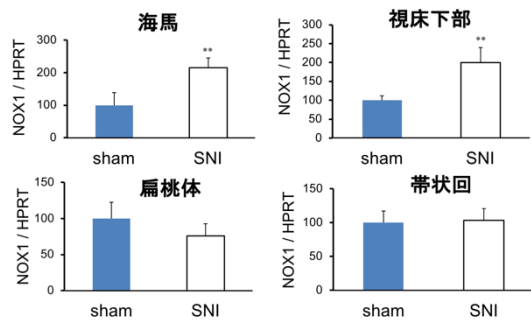
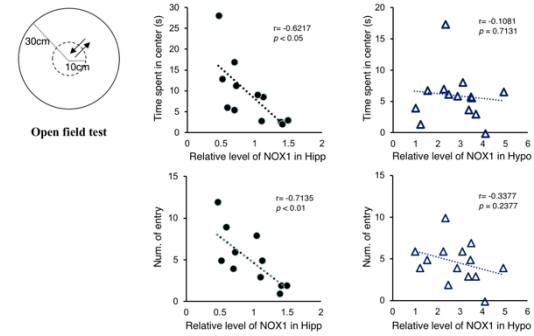


Fig.5 SNI による NOX1 mRNA 発現  
\*\* $p < 0.01$  compared with sham

そこで、NOX1 が関わる脳領域として海馬、視床下部を想定し、これら脳領域に NOX1 発現抑制可能な miRNA を搭載した pAAV2/rh10 を海馬、または視床下部に微量注入し、オープンフィールドテストとショ糖嗜好性試験を行なった。海馬に miRNA/pAAV を注入したマウスでは海馬での NOX1 mRNA 発現と不安・うつ様行動発現に正の相関が認められた。一方、視床下部に miRNA/pAAV を注入したマウスでは、視床下部での NOX1 mRNA 発現と不安・うつ様行動発現に相関は認められた (Fig.6)。

Anxiety-like behaviors



Depressive-like behaviors

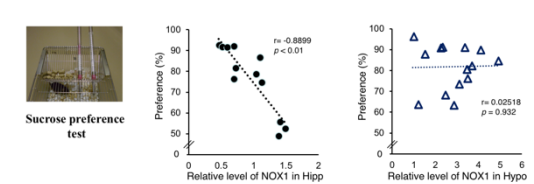


Fig.6 NOX1 を介した不安・うつ様行動発現に関わる脳領域の解析

以上の結果より、SNI や化学療法薬により惹起される末梢神経障害の発現には NOX1 は寄与しないことが明らかになった。しかし SNI による不安・うつ様行動の発現に海馬の NOX1 が関わるということが明らかになった。

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6件)

①Yamamoto K, Yamada H, Wakana N, Kikai M, Terada K, Wada N, Motoyama S, Saburi M, Sugimoto T, Kami D, Ogata T, **Ibi M**, Yabe-Nishimura C, Matoba S. Augmented neutrophil extracellular traps formation promotes atherosclerosis development in socially defeated apoE<sup>-/-</sup> mice. *Biochem Biophys Res Commun.* **500**:490-496, 2018. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.04.115.

②Ohshima Y, Iwata K, **Ibi M**, Matsumoto M, Katsuyama M, Yabe-Nishimura C. Nicotine and methyl vinyl ketone, major components of cigarette smoke extracts, increase protective amyloid- $\beta$  peptides in cells harboring amyloid- $\beta$  precursor protein. *J Toxicol Sci.* **43**:257-266, 2018. (査読あり)  
DOI: 10.2131/jts.43.257.

③Iwata K, Matsuno K, Murata A, Zhu K, Fukui H, Ikura K, Katsuyama M, **Ibi M**, Matsumoto M, Ohigashi M, Wen X, Zhang J, Cui W, Yabe-Nishimura C. Up-regulation of NOX1/NADPH oxidase following drug-

induced myocardial injury promotes cardiac dysfunction and fibrosis. *Free Radic Biol Med.* **120**:277-288, 2018. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.03.053.

④Matsumoto M, Zhang J, Zhang X, Liu J, Jiang JX, Yamaguchi K, Taruno A, Katsuyama M, Iwata K, Ibi M, Cui W, Matsuno K, Marunaka Y, Itoh Y, Torok NJ, Yabe-Nishimura C. The NOX1 isoform of NADPH oxidase is involved in dysfunction of liver sinusoids in nonalcoholic fatty liver disease. *Free Radic Biol Med.* **115**:412-420, 2018. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.019.

⑤Ibi M, Liu J, Arakawa N, Kitaoka S, Kawaji A, Matsuda KI, Iwata K, Matsumoto M, Katsuyama M, Zhu K, Teramukai S, Furuyashiki T, Yabe-Nishimura C. Depressive-like behaviors are regulated by NOX1/NADPH oxidase by redox modification of NMDA receptor 1. *J Neurosci.* **37**:4200-4212, 2017. (査読あり)  
DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2988-16.2017.

⑥Zhu K, Kakehi T, Matsumoto M, Iwata K, Ibi M, Ohshima Y, Zhang J, Liu J, Wen X, Taye A, Fan C, Katsuyama M, Sharma K, Yabe-Nishimura C. NADPH oxidase NOX1 is involved in activation of protein kinase C and premature senescence in early stage diabetic kidney. *Free Radic Biol Med.* **83**:21-30, 2015. (査読あり)  
DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.02.009.

[学会発表] (計5件)

①衣斐督和、矢部千尋. 活性酸素種 ROS を介するうつ様行動発現とその機序 - NOX1/NADPH オキシダーゼの役割- 第 71 回日本酸化ストレス学会・第 18 回日本 NO 学会合同学術集会. シンポジウム. (京都) (2018 年)

②衣斐督和、劉俊傑、矢部千尋. 活性酸素種を介したうつ様行動発現とその機序 - NOX1/NADPH オキシダーゼの役割- 第 39 回日本生物学的精神医学会・第 47 回日本神経精神薬理学会. シンポジウム. (札幌) (2017 年)

③衣斐督和、劉俊傑、矢部千尋. 情動変動に寄与する活性酸素産生酵素の役割. 第 89 回日本薬理学会年会. シンポジウム. (横浜) (2016 年)

④Ibi M, Liu J, Yabe-Nishimura C. NOX1/NADPH oxidase-derived ROS regulate depressive-like behaviors in mice - Identification of the target molecule

modified by ROS. 2016 Gordon Research Conferences on Thiol-Based Redox Regulation & Signaling. Aug 8,9, 2016. Stowflake Conference Center Stowe, VT, USA.

⑤Ibi M, Liu J, Yabe-Nishimura C. The involvement of NOX1/nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form oxidase in anxiety- and depressive-like behaviors induced by stress. *Neuroscience*2015. Oct. 20, 2015. McCormic Place, Chicago, IL, USA.

[図書] (計1件)

①衣斐督和.  
抗精神病薬と D2 受容体シグナリング. 医学のあゆみ 264: 620-621, 2018.

[その他]

ホームページ等

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/k/pharmaco/gyoseki.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

衣斐 督和 (IBI MASAKAZU)

京都府立医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：10336539