

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08233

研究課題名(和文) 線条体と神経ペプチドとのクロストークによる新規疼痛制御システムの解明

研究課題名(英文) A new pain regulation systems activated by the crosstalk between brain striatum and neuropeptides

研究代表者

仲田 義啓 (Nakata, Yoshihiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・名誉教授

研究者番号：40133152

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)：本研究助成期間中、末梢組織からの痛み刺激により、線条体に存在するドパミンが遊離され、ドパミンD1受容体を活性化することにより線条体内でのSPのvolume transmission (VT)を亢進させる。SPのVT活性化によってのみ線条体内での神経細胞が種々の濃度のSPに晒され、その結果、介在性アセチルコリン(Ach)受容体を活性化に伴う下行性の疼痛抑制系の線条体Ach-吻側延髄腹内側部神経系の活性化が神経障害性疼痛をはじめとする難治性の慢性疼痛の緩和効果に繋がる可能性が証明された。

研究成果の概要(英文)：The striatum is involved in not only the modulation of motor functioning but also in nociceptive processing. One brain nucleus that could be a projection target of striatal neurons is the rostral ventromedial medulla (RVM). Peripheral nociceptive stimulation induces a slow-on set substance P (SP) release as a volume transmitter and evokes phosphorylation of ERK by the NK-1 receptor activation.

Continuous striatal infusion of SP by the reverse microanalysis method diffuses with extra low concentration of SP into the striatum and likely to mimic volume transmission. In present study, the data demonstrated that the activation of the SP-volume transmission but not wired transmission in the striatum attenuated tissue injury-induced nociception using neuropathic pain model rats. These observations suggest that the modulation of the SP volume transmission system in the striatum could be a potent therapeutic target for patients with chronic pain due to neurological disorders.

研究分野：neuropharmacology

キーワード：Substance P Striatum Volume transmitter Pain

1. 研究開始当初の背景

(1)末梢組織に侵害刺激が加わると、上行性の知覚神経が刺激され脳の知覚野に「痛み」情報が伝達される。脳は疼痛制御を含め痛覚信号に対応する生理機能を発揮するために種々の情報処理を行う。近年、MRI（核磁気共鳴画像法）などの非侵襲性画像診断法の発達により、疼痛反応時には知覚野のみならず、大脳基底核群の主要な構成要素である線条体が活性化することが報告されさらに大脳基底核群を主要病変部位とするパーキンソン病症状の1つとして、約50~80%の患者に疼痛が認められ、大脳基底核群が従来から知られている随意運動の発現と制御のみならず、痛覚伝達または疼痛制御機構に関与する可能性が考えられる。

(2)申請者はラットを用いた実験で、ホルマリンを足底部に投与し「痛み」を脳に伝達されると、脳線条体特異的に神経ペプチドのサブスタンスP(SP)が、生合成の亢進を伴ってSP遊離量が増加し、脳線条体内に存在するNK1受容体の細胞内情報系を活性化させることにより、疼痛反応時間を有意に短縮させることを世界に先駆けて発表した。SPはカテコールアミンと同様にシナプス小胞に貯蔵されているが、シナプス間隙に放出・遊離されると、カテコールアミンやアミノ酸系の伝達物質群と異なり再利用のためのトランスポーターで再取り込みされず、周囲の神経・グリア細胞へ拡散しながら情報を伝達する方式(volume transmission)で情報を瞬時に、かつ広範囲に伝達することが知られている。従って、SPが遊離直後に作用する部位と遊離後に拡散する部位での作用濃度が、高濃度から低濃度になることが予想される。

(3)SPは、アミノ酸11個からなる生理活性ペプチド(Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂)であり、知覚神経に存在することから痛みの伝達に関与することが示唆され、SPが作用する受容体としてニューロキニン(NK)受容体が同定されている。NK受容体にはNK1、NK2、NK3の3種類のサブタイプが知られており、SPはNK1受容体に高親和性を示すことが知られている。NK1受容体は、知覚神経のほか、線条体、縫線核、視床下部に多く発現していることが報告され、いずれのNK受容体も7回膜貫通型のGタンパク質共役型で、ホスホリパーゼC(phospholipase C; PLC)活性化を介して、イノシトールリン脂質-Ca²⁺セカンドメッセンジャー系へ作用することで生理作用を発現する。SPは知覚神経に存在することから痛みの伝達に関与することが示唆され、SPはNK1受容体に高親和性を示す。SPは他の古典的神経伝達物質(アミノ酸、カテコラミン、オータコイドなど)と異なり、神経やグリア細胞などに再取り込みされないことで、受容体への親和性の濃度範囲が非常に広範囲である。このためSPはシナプスへ長

期的に作用すること(秒-分)や、シナプス外へと拡散し周囲の神経、グリア細胞などに作用することからvolume transmission(VT)の伝達形式をとるが、VTの薬理的意義については全く報告されていない。

2. 研究の目的

本研究課題は「線条体SP神経系」と「疼痛抑制」の関連性を解明することを目的とし、線条体での新規の疼痛抑制機構の機能について研究を展開した。

3. 研究の方法

(1)動物実験は広島大学動物実験等規則で定める手法に準じて行った。体重200-300g(6週齢)のWistar系雄性ラットを使用した。ラットは恒温(22±2)、恒湿(55±5%)かつ、12時間-12時間の明暗サイクルの環境下で飼育し、水と飼料は自由に摂取させた。

(2)von Frey testによる疼痛閾値の測定：0.4,0.6,1.0,1.4,2.0,4.0,6.0,8.0,10.0,15.0および26.0gのvon Frey filamentを用いて、触刺激に対する痛み行動の測定を行った。ラットをメッシュ板の上に乗せ、30分から1時間順応させた。その後、強度(g)の低いフィラメントから順番にラットの後肢足蹠部に対して垂直に押し当て、ラットが逃避行動(足を上げる、振る、舐める等)を示した時点でのフィラメント強度を疼痛閾値(paw withdrawal threshold; PWT)として記録した。

(3)Western blot解析：ラットより素早く脳を摘出し、radio-immunoprecipitation-assay buffer(RIPA buffer)100μLを加え超音波により破碎した。13,000rpm10分間遠心し、上清をLowry法によりタンパク質量を定量した後、3×SDS Laemli's bufferを上清量に対して1:2の割合で加え、95℃で5分間熱処理したものをサンプルとした。そして、(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE)によりタンパク質を分離した後、ニトロセルロース膜に転写した。その膜を5%のスキムミルク(skim milk)により室温で120分間ブロッキングした後、一次抗体と共に4℃にてひと晩インキュベートした。さらにhorse-radish peroxidase(HRP)標識二次抗体と共に室温で60分間インキュベートし、その後Pierce ECL Plusにより可視化し、Multi Gauge(Fuji Film)により数値化した。

(4)リバースマイクロダイアリシス法によるラット線条体への持続的薬物投与：マイクロダイアリシス法は半透膜プローブを生体組織に留置し、人工脳脊髄液(artificial-cerebrospinal fluid; aCSF)を灌流することにより、浸透圧の原理で細胞外物質を継時

的に回収する方法である。この方法の利点は、無麻酔、非拘束で実験が可能であること、半透膜を介するため組織への影響力が低いことなどが挙げられる。さらに、灌流液中に薬物を溶解させることにより、組織へ薬物を微量投与することも可能である(リバースマイクロダイアリシス法)。近年、この技術は神経伝達物質の研究における様々な系において汎用されている。本研究では、このリバースマイクロダイアリシス法をラット脳線条体への薬物持続投与方法として用いた。

すなわち、ラットをペントバルビタール(pentobarbital, 50 mg/kg, i.p.) およびイソフルラン(isoflurane, inhalation anesthesia) 麻酔下、定位脳固定装置に固定し、Paxions 及び Watson の脳図譜に従い、ラット脳線条体(Bregma; A: -0.26 mm, L: 4 mm, V: 7 mm) にガイドカニューレを留置した。その後、矢状縫合に対し対角線上にアンカーピスを埋め込み、これらを歯科用セメントで固定した。ガイドカニューレにダミーカニューレを挿入し、キャップナットを装着・固定して、回復期間として約 7 日間飼育用ケージ内で飼育した。実験使用前に異常行動が観察されないことを確認した後、無麻酔・無拘束の状態にガイドカニューレにマイクロダイアリシス用プローブ(C-M-4-03H, Eicom, 半透膜: 3 mm, 100% cut-off 値: 35 kDa) を挿入し、このプローブ内に SP (0.4 µg/mL), または NK1 受容体遮断薬である CP96345 (10 µM) を溶解させた aCSF を持続的に投与 (1 µL/min) した。

(5) 神経障害性疼痛モデルラットの作製:

神経障害性疼痛モデルとして片側の坐骨神経を部分結紮する方法を用いた (Partial Sciatic Nerve Ligation; PSNL)。すなわち麻酔下において Wistar 系雄性ラット (6 週齢) の左側、あるいは右側大腿部の坐骨神経を露出させ、絹糸 (滅菌済み) で坐骨神経の 1/2 ~ 1/3 程度を結紮することで作製した (Ligation 群)。また神経の露出のみを行い、結紮を行わないラットを対照群 (Sham 群) として用いた。

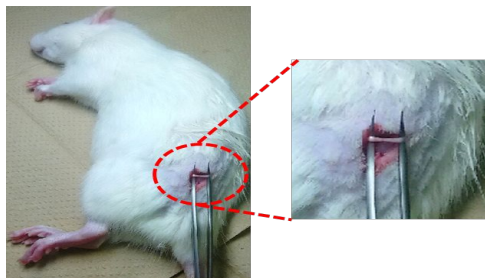


図 1. 坐骨神経の結紮による疼痛モデルラットの作成

(6) 免疫蛍光組織染色法: クリオスタットを用いて、凍結サンプルより厚さ 20 ~ 30 µm の薄切片を作製し 2% の 3-アミノプロピルトリエトキシシランでコートしたスライドガ

ラス (MAS-GP type A; Matsunami Glass, Osaka, Japan) に回収した。その後、風乾させた後に 4%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液で固定し、濃度が低い ethanol から順に脱水した。その後、10 mM Glycine/リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline: PBS) を用いて 5 分間隔で 3 回洗浄し、ブロッッキング溶液 (3% BSA, 10% Goat serum, 0.1% Triton X and 0.05 % Tween 20) を処置し 2 時間室温でインキュベートした。次に 10 mM Glycine/PBS 及び 0.1%/BSA/PBS を用いて洗浄し、一次抗体 [rabbit anti-cFos antibody (1 : 750)] 添加後、3 日間 4 でインキュベートした。0.1% BSA/PBS を用いて 5 分間隔で 6 回洗浄し、遮光下で蛍光標識二次抗体 (1 : 500) 添加後、2 時間 4 でインキュベートした。再び 0.1% BSA/PBS を用いて 5 分間隔で 6 回洗浄後、Fluoro-KEEPER Antifade Reagent で封入し BZ-9000 Bioevo all-in-one fluorescence microscope (Keyence, Elmwood Park, NJ, USA) を用いて観察した。また、蛍光強度解析は Image J を用いて行った。

4. 研究成果

(1) 線条体への SP 及び NK1 受容体遮断薬の併用投与による PSNL 誘発性疼痛への影響:

リバースマイクロダイアリシス法により SP を持続的に投与することで、PSNL 誘発性疼痛に対する影響を検討した。PSNL 処置 7, 14 日後における有意な疼痛閾値の低下は、PSNL 処置反対側線条体へ SP を持続的に投与することで有意に回復した。この効果は SP 投与開始 60 分以降において認められた。また PSNL 処置 7, 14 日後のどちらの群においても、線条体への SP 持続投与による疼痛緩和効果は、NK1 受容体遮断薬である CP96345 を併用持続投与することで有意に拮抗された。以上の結果より、神経障害性疼痛モデルにおいて、PSNL 処置反対側線条体への SP 持続投与は NK1 受容体を介して疼痛緩和効果を示すことが明らかとなった。

(2) 線条体への SP 持続投与 (濃度変化) 及び SP 単回投与による PSNL 誘発性疼痛への影響: 以降の検討は疼痛閾値の低下及び SP 投与による疼痛緩和効果が最も顕著であった PSNL 処置 7 日後の神経障害性疼痛モデルラットを用いて行い、SP の投与濃度を変化させることで PSNL 誘発性疼痛に及ぼす効果を検討した。PSNL 処置による疼痛閾値の有意な低下は、PSNL 処置反対側線条体へ SP を持続的に投与することで濃度依存的に回復した。これらの効果は SP 投与開始 60 分以降において認められた。また持続的投与の必要性を調べるために、持続的投与で線条体に入ったであろう SP の総量を算出し、SP を単回投与することで検討した。その結果、線条体へ SP (10 ng) を単回投与することでは疼痛閾値の低下に対する疼痛緩和効果は認められなかった。これら

の結果より、神経障害性疼痛モデルにおいて、PSNL 処置反対側線条体への SP 持続投与は濃度依存的に疼痛緩和効果を示すことが明らかとなった。しかし、その疼痛緩和効果は SP の単回投与では認められなかったことより、線条体に対して SP が持続的に作用することが神経障害性疼痛に対する抑制的制御に重要である可能性が示唆された。

(3) PSNL 処置同側線条体への SP 持続投与による PSNL 誘発性疼痛への影響の検討：
PSNL 誘発性疼痛に対する SP 持続的投与位置の重要性を調べるために、PSNL 処置同側線条体への SP 持続投与による PSNL 誘発性疼痛への影響を検討した。その結果、PSNL 処置同側線条体へ SP を持続的に投与しても疼痛閾値の低下に対する疼痛緩和効果は認められなかった。以上の結果より、神経障害性疼痛モデルにおいて、線条体への SP 持続投与による疼痛緩和効果は SP 投与反対側に発症した機械的アロディニアに効果を発揮する可能性が示唆された。

(4) 線条体への SP と抗コリン薬の併用投与による PSNL 誘発性疼痛への影響については、線条体において NK1 受容体はコリン作動性神経に発現していることや、線条体への SP 局所投与によって線条体 ACh 遊離量が増加することが報告されている¹⁾。従って、本研究で認められた PSNL 誘発性疼痛に対する線条体 SP 持続投与による疼痛緩和効果に ACh が関与している可能性が推察される。そこで SP 持続投与による疼痛緩和効果に対するニコチン性 ACh 受容体遮断薬 メカミラミン(mecamylamine) 及びムスカリン性 ACh 受容体拮抗薬(atropine) の効果を検討した。PSNL 群における PSNL 処置反対側線条体への SP 持続的投与による疼痛抑制作用をアトロピン(atropine) の併用持続投与することで有意に拮抗されたが、ニコチン性 ACh 受容体遮断薬のメカミラミン(mecamylamine) では今回用いた濃度(10 μM)では有意な拮抗作用は認められなかった。以上の結果より、神経障害性疼痛モデルにおいて、PSNL 処置反対側線条体への SP 持続投与による疼痛緩和効果は mACh 受容体を介して惹起されていることが明らかとなった。

(5) 線条体内への SP 持続投与による自発運動量への影響について検討する必要から、線条体内への SP 持続投与による PSNL 誘発性機械的アロディニアの抑制効果がラットの自発運動量の低下に起因する可能性を除外するため、線条体内へ SP を 2 時間持続投与している間のラット自発運動量を無人環境下で測定した。その結果、線条体内 SP 持続投与中におけるラット自発運動量に変化は認められなかった。

(6) PSNL 誘発性疼痛時における RVM 内神経

細胞の活動変化：近年、線条体の特定部位から投射する神経が吻側延髄腹内側部(Rostral Ventromedial Medulla ; RVM) に直接投射している報告されている。このことから本研究で認められた線条体への SP 投与による疼痛緩和作用は下行性疼痛調節を介する可能性が推測される。そこでまず、PSNL 疼痛時に RVM 神経が活性化しているのかかを神経活性化のマーカーとして用いられる c-Fos の蛍光組織染色により検討した。その結果、Sham 群と比較し PSNL 群において、RVM における c-Fos 蛍光強度の増強が確認できた。以上のことから PSNL 誘発性疼痛時に RVM 神経が活性化している可能性が示唆された。

(7) これまでの結果において、線条体への SP 持続投与による RVM 内神経細胞の活動変化つまり、PSNL 誘発性疼痛時に RVM 神経が活性化している可能性が示唆された。そこで線条体への SP 持続投与が PSNL 処置誘発性の RVM 神経活性化に対する影響を検討した。その結果 PSNL 処置 7 日後において、aCSF 投与 30 分後と比較して SP 投与 30 分後では RVM における c-Fos の蛍光強度は有意ではないが減少傾向であった。一方 aCSF 投与 60 及び 90 分後と比較して SP 投与 60 及び 90 分後において、RVM における c-Fos の蛍光強度が有意に減少した以上のことから、線条体への持続的な SP 投与は PSNL 誘発性の RVM 神経が亢進を抑制的に制御している可能性が示唆された。

(8) これまでの研究成果を総合的に考察すると、SP をラット線条体に持続的に投与することにより、aCSF を持続投与したラットと比較し、PSNL 処置後に認められた機械的アロディニアが有意に抑制された。また、この効果は NK1 受容体遮断薬である CP96345 を SP と併用持続投与することにより有意に拮抗された。一方で SP (10 ng) の単回投与では持続的投与で見られた疼痛緩和効果は認められなかった。SP のようなペプチド性神経伝達物質の特徴は他の古典的神経伝達物質(アミノ酸、カテコールアミン、オータコイドなど) と異なり、神経やグリア細胞などに再取り込みされないこと、さらに受容体との親和性が高いことである (pM-low nM order)。このため SP はシナプスへ長期的に作用すること(秒-分)や、シナプス外へと拡散して周囲の神経、グリア細胞などに作用することから、volume transmission という伝達形式をとることが報告されている。今回投与方法として用いたリバースマイクロダイアリシス法は組織中への投与濃度が厳密には不確かだが、in vitro における SP (0.4 μg/mL) の半透膜を介した遊離量の基礎検討を行った結果、1 時間あたり 10.79 ± 5.14 (S.D.) pg と少量であったことから、SP による volume transmission の生理的条件に近い投与方法であると考えられる。また、SP の単回投与では他組織への拡散が考えられるため、線条体

特異性が低くなってしまった可能性が考えられる。これらのことから、線条体 SP による疼痛緩和効果には volume transmission による NK1 受容体の持続的な活性化が必要である可能性が示唆された。

(9)線条体内において間接路に分類される MSN 群は RVM と間接的あるいは直接的にリンクしている疼痛反応を制御している。また、RVM 内の細胞は下行性疼痛促進系の On-cell, 下行性疼痛抑制系の Off-cell, そして Neutral-cell に分類される。RVM は末梢からの痛覚入力により機能を変えることや、炎症時における痛覚過敏に RVM の下降性促進系の賦活化が関与していることが報告されており、疼痛時に RVM が重要な役割を果たす可能性が考えられる。さらに、線条体への mGluR 8 作動薬投与による RVM 神経の電気的活動変化が報告されたことから、線条体神経が直接もしくは間接的に RVM 神経を制御している可能性が考えられる。今回の研究において、PSNL 誘発性疼痛時において RVM 内における cFos の蛍光強度の増加及び線条体への SP 持続投与による RVM 内における cFos の蛍光強度の減少が認められた。このことから線条体が疼痛時において RVM 神経を制御していることが示唆された。

これまでをまとめると、線条体への SP 投与により疼痛緩和効果が認められることから SP は NK1 受容体, ACh 受容体を介して RVM 内の On-cell の神経活動を低下させ、結果として下行性疼痛促進系の抑制的制御により疼痛緩和効果をもたらすことが示唆された。本研究課題の遂行の成果として、下行性の疼痛抑制系の線条体 ACh- 吻側延髄腹内側部 (Rostral ventromedial Medulla ; RVM) 神経系の活性化が神経障害性疼痛をはじめとする難治性の慢性疼痛の緩和効果に繋がる可能性を証明した。

<引用文献>

Nakamura Y, Izumi H, Shimizu T, Hisaoka-Nakashima K, Morioka N, Nakata Y. Volume Transmission of Substance P in Striatum Induced by Intraplantar Formalin Injection Attenuates Nociceptive Responses via Activation of the Neurokinin 1 Receptor. *J Pharmacol Sci* 121, 257-271 (2013).

Nakamura Y, Izumi H, Fukushige R, Shimizu T, Watanabe K, Morioka N, Hama A, Takamatsu H, Nakata Y. Continuous infusion of substance P into rat striatum alleviates nociceptive behavior via phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2. *J Neurochem.* 131, 755-766 (2014).

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)

[学会発表](計 5 件)

福重 亮, 中村庸輝, 森岡徳光, 仲田義啓: Involvement of the striatal substance-P nervous system in regulation of nociceptive transmission. 疼痛伝達制御における線条体 substance P 神経系の関与. 第 89 回日本薬理学会年会(横浜市), 2016

福重 亮, 中村庸輝, 森岡徳光, 仲田義啓: 脳線条体への substance P 持続投与により誘発される疼痛制御機構の解明. 日本薬学会第 136 年会(横浜市), 2016

渡部亨平, 福重 亮, 岸田祐輝, 中村庸輝, 森岡徳光, 仲田義啓: 線条体サブスタンス P 神経系の疼痛抑制作用とドーパミン神経系との関係, 第 54 回 日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会中四国支部学術大会(高知市), 2015

渡部亨平, 福重 亮, 岸田祐輝, 中村庸輝, 森岡徳光, 仲田義啓: 線条体サブスタンス P 神経系による疼痛抑制作用のメカニズム, 第 128 回日本薬理学会近畿部会(大阪市), 2015

福重 亮, 中村庸輝, 森岡徳光, 仲田義啓: 神経障害性疼痛モデルラットにおける脳線条体 substance P 神経系を介した疼痛制御機構. 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015(東京都), 2015

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/pha>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仲田 義啓 (NAKATA Yoshihiro)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・

名誉教授

研究者番号: 40133152

(2)研究分担者

森岡 徳光 (MORIOKA Norimitsu)

広島大学・医歯薬保健学研究科(薬)・

教授

研究者番号: 20346505