

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10568

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛モデルにおけるアンギオテンシン受容体作動薬の中枢作用

研究課題名(英文) Central effects of angiotensin receptor agonists in rat neuropathic pain models

研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・大学病院・准教授

研究者番号：20331001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性痛モデルラットの脳室内に非選択的AT1/AT2受容体アゴニストのアンギオテンシンII (AGII)、選択的AT2受容体アゴニストのCGA42112A、AT1受容体阻害薬のlosartan、AT2受容体阻害薬のPD123311を投与した。AGIIとCGA42112Aは抗痛覚過敏作用を示す一方、losartanは痛覚過敏を増強させた。また、AGIIとCGA42112Aは不安や抑うつ症状を増強させた。一方、losartanは抗不安作用や抗うつ作用を発現させた。神経障害性痛モデルラットの脳内でAT1受容体とAT2受容体は疼痛閾値に影響を与え、不安・抑うつ症状に関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Central effects of angiotensin receptor subtypes on hyperalgesia, anxiety, and depression were examined in rat neuropathic pain models. In chronic constriction injury (CCI) model and diabetic polyneuropathy model, AT1/AT2 receptor agonist angiotensin II and a selective AT2 receptor agonist CGA42112A inhibited cold and mechanical hyperalgesia. In contrast, an AT1 receptor antagonist losartan exacerbated cold and mechanical hyperalgesia. In the CCI model, angiotensin II and CGA42112A decreased percent of the time spent in the central area and total moving distance in the open field test. They decreased time spent in the open arms in the elevated plus maze. They also decreased swimming time and increased immobility time in the forced swim test. These results indicate that AT1 and AT2 receptors in the brain modulate nociceptive transmission and are involved in anxiety and depression in the neuropathic pain models.

研究分野：疼痛治療学

キーワード：神経障害性痛 アンギオテンシン受容体 中枢作用 鎮痛作用 抗不安作用 抗うつ作用

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛には未だ有効性の高い治療薬が無く、慢性疼痛の大きな原因となっている。様々な種類の薬物が臨床応用されているが鎮痛作用が十分でないだけでなく副作用のために薬物治療の継続が困難となる場合もある。このため従来の治療薬と異なる作用機序で選択的に侵害受容伝達を抑制する副作用の少ない治療薬の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

レニン-アンジオテンシン(RAS)系は心血管系、神経系、代謝・内分泌系、腎・肝機能に関与しておりアンジオテンシン(AG)は心血管系や体液の恒常性の調節に重要な役割を担っているほか、細胞増殖や細胞外マトリックス形成をコントロールしている。最近、糖尿病や肥満や認知症の病態に関わっていることも確立されてきている。RAS系の活性物質のうち最も生理活性が高いのがAGIIである。AG受容体はこれまでAT1とAT2の二つのサブタイプが同定されている。様々な組織でのAGの生理作用は大部分がAT1受容体を介して発現すると考えられている。AT1受容体阻害薬は高血圧治療の第一選択薬として臨床応用されている。しかしAT2受容体の生理作用はAT1受容体と比較してほとんど理解されていない。既知の生理作用に加え、AT1とAT2受容体が共に脊髄後角や後根神経節(DRG)の感覚神経に発現していることやDRG神経にAGIIがサブスタンスPと共存していることが示されており、脊髄での侵害受容伝達の調節にAGが関与している可能性がある。一方、AT1とAT2受容体は脳内で広範に分布し、特に視床、視床下部、青斑核、扁桃体など、侵害受容伝達の調節に関与する領域にも発現している。だがその生理的役割はあまり分かっていない。これまでに脳室内に投与されたAGIIが熱侵害刺激に鎮痛効果を示したり、AT2受容体のノックアウトマウスは野生型マウスに比べ痛覚閾値が低下していることが報告されている。更に最近、帯状疱疹後神経痛に対するAT2アゴニストEMA401の経口投与の抑制効果が無作為二重盲検試験で示された(Lancet 2014:383;1637)。これらの結果はRAS系が侵害受容伝達の調節にも関与していることを強く示唆している。従ってAT1やAT2受容体作動薬は脳内および脊髄で痛覚閾値に影響を与えることが考えられる。脳のAG受容体の侵害受容伝達への関与を理解することは受容体作動薬の将来の臨床応用に重要であるが未だ研究されていない。中枢の抑制性神経系の可塑化が神経障害性疼痛の病態の大きな要素であることが近年明らかになった。RAS系の変化は慢性疼痛患者の循環器系に影響を与えるが現時点では分かっていない。

一方、慢性疼痛患者の多くは不安障害や抑うつ状態により治療効果が低下し日常生活

動作(ADL)が損なわれるため痛みの悪循環に陥る。神経障害性疼痛患者の治療には疼痛の緩和と同時に不安や抑うつ症状に対するケアが患者のADLの向上や就学・就労に関して重要になる。本研究はAG受容体のリガンドが侵害受容伝達、不安障害、抑うつ症状にどのような影響を与えるか行動薬理的に検討する。AG受容体のリガンドに鎮痛作用や抗不安作用を見出すことができれば高血圧や糖尿病などの基礎疾患を持つ慢性疼痛患者の疼痛コントロールに有効な治療薬の開発に繋がる可能性がある。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経障害性疼痛モデルの作製

#### 坐骨神経絞扼モデル(CCI)

Bennett and Xieの方法により、雄Sprague-Dawley(SD)ラットをペントバルビタール麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開し片側の坐骨神経を4.0-silk糸で4箇所緩く結紮した。処置後4日目から患肢に痛覚過敏、アロディニアが発現し持続した。麻酔下に坐骨神経を剥離・露出のみを行うsham operationを施し、坐骨神経損傷の影響を確認した。Ugo Basile社製圧刺激疼痛閾値測定装置を用いて痛覚過敏が認められたラットを用いて実験を行った。

#### 糖尿病性ニューロパチーモデル(DM)

膵細胞を選択的に破壊するストレプトゾトシン100mg/kgを4週令の雄SDラットに腹腔内投与した。1週間後に血糖値が250mg/dL以上のラットを糖尿病ラットとした。投与後4週以降に高血糖が持続し、Ugo Basile社製圧刺激疼痛閾値測定装置により生理食塩水を投与した正常ラットと比べて機械的痛覚過敏が認められたラットを実験に用いた。

### (2) 脳室カニューレ留置

薬物を脳室内に投与するため、ラット右側脳室に22Gのステンレス製のガイドカニューレを頭頂骨より4.0mm挿入し、歯科用セメントとアンカースクリューで頭部に固定した。処置1週間後に29Gの注入用カニューレにPE-20を接続し、非選択的AT1/AT2受容体アゴニストのアンジオテンシンII(AGII)、選択的AT2受容体アゴニストのCGA42112A、AT1受容体阻害薬のLosartan、AT2受容体阻害薬のPD123311溶液(0.5, 1, 2mg/mL)または生理食塩水(対照群)10µLをマイクロシリンジで緩徐に注入した。

結果はone-way ANOVAまたはtwo-way ANOVAで統計解析を行い、 $P < 0.05$ を有意とした。(n=6-8)

### (3) 抗侵害受容作用の検討

以下の試験で薬物の作用を脳室内投与後240分間評価した。

Plantar試験(熱的痛覚過敏に対する作用)

Ugo Basile 社製 model7360 を用いた。神経障害性疼痛に随伴する熱刺激に対する痛覚過敏を評価するための検査で、患肢足底に放射熱を当てて逃避反応(患肢を引き上げる)が起こるまでの時間(潜時)を測定した。

Cold plate 試験 (冷痛覚過敏に対する作用)

Ugo Basile 社製 Hot/Cold plate model35100 を用いた。神経障害性疼痛により発現頻度が高く、特徴的な冷刺激に対する痛覚過敏を評価する。4 の冷板にラットを乗せ逃避反応(後肢を舐める・引き上げる・振り回す)が起こるまでの潜時を測定した。

electronic von Frey 試験 (機械的痛覚過敏に対する作用)

IITC Life Science 社製 esthesiometer model12391C を用いた。患肢足底に上向きの力がかかるように filaments を押し当て、逃避反応(患肢を引き上げる)が起こる閾値(g)を測定した。

(4)不安・抑うつに対する作用の検討

以下の試験で脳室内投与 30 分後の薬物の作用を評価した。

オープンフィールド(OF)試験 (不安・抑うつの評価)

ラットを高さ 40cm の壁で囲まれた 80cm 四方のオープンフィールドの中央に置き、5 分間自由に探索させる。不安が強いとフィールドの外側領域を好むため中央部分での滞在時間が短縮する。ラットの探索行動をビデオ撮影し、ビデオ行動解析システム[Stoelting 社製 ANY-maze]で解析した。中央部分に滞在した割合(%)と総移動距離(cm)を定量評価した。

高架式十字迷路(EPM)試験 (不安・抑うつの評価)

床から 70cm の高さにある十字型の 4 本のアームの中央にラットを置き、5 分間自由に探索させる。不安が強いラットは壁のないオープンアームの滞在時間が短縮し、壁で囲まれたクローズドアームの滞在時間が延長する。オープンアーム滞在時間とクローズドアーム滞在時間をビデオ行動解析システム[Stoelting 社製 ANY-maze]で定量評価した。

強制水泳試験 (FST:抑うつの評価)

ラットを逃避不可能な深さ 50cm の円柱型の水槽に入れ、強制水泳を負荷する。1 回目に 15 分間のトライアルを行い、24 時間後に行う 2 回目の 5 分間の試験で逃避行動の後に無動行動になるまでの時間(swimming time)と無動行動の持続時間(immobility time)を測定し、swimming time と immobility time の変化を抑うつ行動の指標として評価した。

#### 4. 研究成果

(1)神経障害性痛に対する脳内 RAS 系の抗侵害受容作用

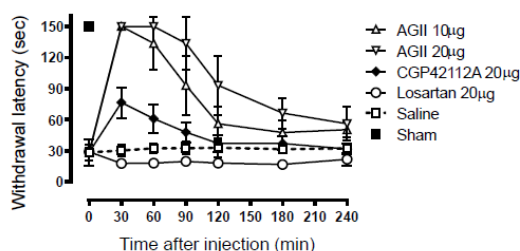
CCI モデル

Plantar 試験

AGII と CGP42112A は 2mg/mL まで逃避反応潜時に影響を与えなかった。同様に losartan と PD123319 は、2mg/mL まで逃避反応潜時に影響を与えなかった。

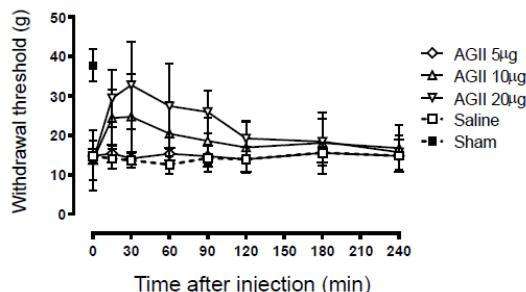
Cold plate 試験

AGII は 1mg/mL と 2mg/mL で、CGP42112A は 2mg/mL で逃避反応潜時を延長させた。一方、losartan は 2mg/mL で逃避反応潜時を短縮させた。PD123319 は 2mg/mL まで影響を与えなかった。



electronic von Frey 試験

AGII と CGP42112A は 1mg/mL と 2mg/mL で用量依存性に逃避反応閾値を上昇させた。一方、losartan は 2mg/mL で逃避反応閾値を低下させた。PD123319 は 2mg/mL まで影響を与えなかった。



CCI ラットは Cold plate 試験と electronic von Frey 試験で AGII と CGP42112A が冷痛覚過敏と機械的痛覚過敏を抑制した。Losartan が冷・機械的痛覚過敏を増強させたことから、AT1 受容体は痛覚閾値の調節に関与していることが示唆された。PD123319 が冷・機械的痛覚過敏のどちらにも影響を与えなかった理由は明らかではないが、脳内で AT2 受容体は AT1 受容体に比べ、抗侵害受容作用への生理的役割が小さい可能性が考えられる。Plantar 試験の結果から、RAS 系の活性化は熱的痛覚過敏を抑制しないことが示唆されたが、その機序は明らかではない。刺激強度が影響している可能性があり、実験条件を変えて再検討する必要がある。

DM モデル

Plantar 試験

AGII と CGP42112A は 2mg/mL まで逃避反応潜時に影響を与えなかった。同様に losartan と PD123319 は、2mg/mL まで逃避反応潜時に影響を与えなかった。

#### Cold plate 試験

AGII は 1mg/mL と 2mg/mL で、CGP42112A は 2mg/mL で逃避反応潜時を延長させた。一方、losartan は 2mg/mL で逃避反応潜時を短縮させた。PD123319 は 2mg/mL まで影響を与えなかった。

#### electronic von Frey 試験

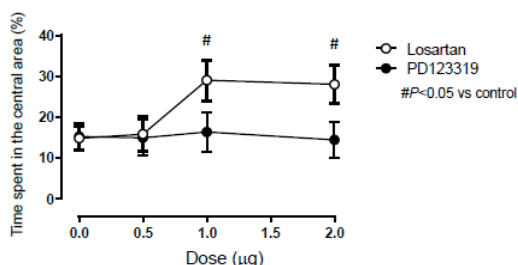
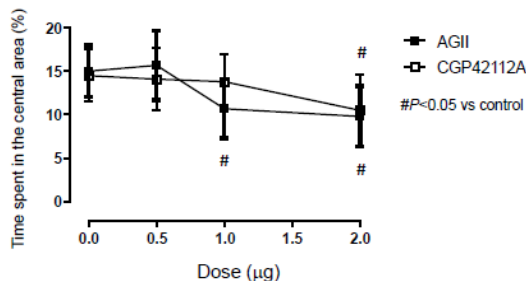
AGII と CGP42112A は 1mg/mL と 2mg/mL で用量依存性に逃避反応閾値を上昇させた。一方、losartan は 2mg/mL で逃避反応閾値を低下させた。PD123319 は 2mg/mL まで影響を与えなかった。

DM ラットでも CCI ラットと同様に Cold plate 試験と electronic von Frey 試験で AGII と CGP42112A が冷痛覚過敏と機械的痛覚過敏を抑制した。Losartan が冷・機械的痛覚過敏を増強させたことから AT1 受容体は痛覚閾値の調節に関与していることが示唆された。PD123319 は冷・機械的痛覚過敏に影響を与えなかった。CCI ラットの結果と合わせ、神経障害性痛の発生要因に関わらず脳内で AT2 受容体は AT1 受容体に比べ、抗侵害受容作用への生理的役割が小さい可能性が考えられる。

#### (2)CCI モデルにおける脳内 RAS 系の不安・抑うつ症状に与える影響

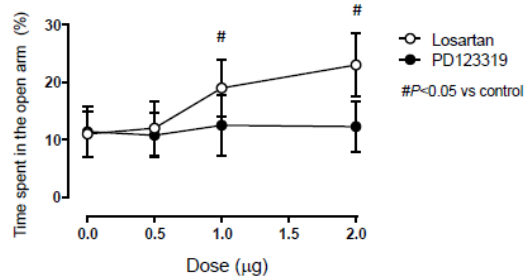
##### OF 試験

AGII と CGP42112A は最大用量 2mg/mL で 5 分間の観察期間での中央部分の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)を減少させた。一方、losartan は最大用量 2mg/mL で中央部分の滞在時間を延長させ、総移動距離を増加させた。また、PD123319 は最大用量 2mg/mL まで中央部分の滞在時間の割合(%)と総移動距離(cm)に影響を与えなかった。



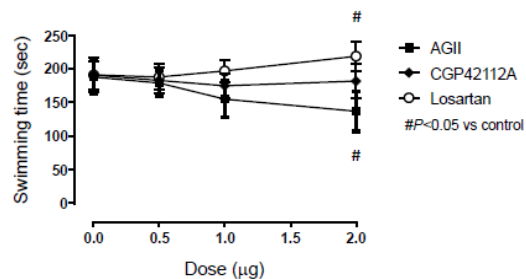
#### EPM 試験

AGII と CGP42112A は最大用量 2mg/mL で 5 分間の観察期間でのオープンアームの滞在時間の割合(%)を減少させた。一方、losartan は 1mg/mL と 2mg/mL でオープンアームの滞在時間を延長させた。また、PD123319 は最大用量でもオープンアームの滞在時間に有意な影響を与えなかった。



#### FST

AGII 最大用量 2mg/mL で、5 分間の観察期間での swimming time を減少させ、immobility time を増加させた。Losartan は最大用量 2mg/mL で swimming time を増加させ、immobility time を減少させた。一方、CGP42112A と PD123319 はともに swimming time と immobility time に影響を与えなかった。



以上の結果から、CCI ラットにおいて脳内の AT1 受容体と AT2 受容体を介して AGII と CGP42112A が不安や抑うつ症状を惹起させるのに対して、losartan は抗不安作用や抗うつ作用を発現させることが示唆された。PD123319 が全ての試験で高用量でも不安・抑うつ症状関連行動に影響を与えなかったことから、脳内の AT2 受容体は、AT1 受容体と比較して不安・抑うつ症状への関与が小さいことが示唆された。

本研究により、神経障害性痛モデルラットにおいて、脳内 RAS 系は、AT1 受容体及び AT2 受容体を介して疼痛閾値の調節と不安・抑うつ症状に関与していることが明らかになった。AT1 受容体及び AT2 受容体作動薬は、抗侵害受容作用を発揮するのに対して不安・抑うつ症状を増悪させる可能性があり、これらの生理的作用について、AT1 受容体は AT2 受容体と比較して、より重要な役割を持つこと

が示唆された。

これまでの報告で、脊髄の AT1 受容体及び AT2 受容体が侵害受容伝達の調節を行っていることが示唆されているが、これらの作動薬は脳内でも疼痛閾値を高めることが期待される一方で不安・抑うつ症状を増悪させることが懸念される。慢性疼痛患者に対して、RAS 系への治療介入には更なる研究が必要である。

## 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 2 件)

Kumakura M, Hara K, Sata T. Sevoflurane-associated torsade de pointes in a patient with congenital long QT syndrome genotype 2. J Clin Anesth 2016 33:81-5. 査読有

doi: 10.1016/j.jclinane.2016.03.011.

Takahashi Y, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Obara G, Sata T. Antinociceptive effect of intracerebroventricular administration of glycine transporter-2 inhibitor ALX1393 in rat models of inflammatory and neuropathic pain. Pharmacol Biochem Behav 2015;130:46-52. 査読有

doi: 10.1016/j.pbb.2015.01.001.

[学会発表](計 3 件)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、ラット神経障害性疼痛モデルにおける AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬ペランパネルの抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第 64 回学術集会、2017 年 6 月 9 日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、ラット神経障害性疼痛モデルにおけるカンナビノイド再取り込み阻害薬 AM404 の抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第 63 回学術集会、2016 年 5 月 27 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、高橋 良宏、小原 剛、佐多 竹良、ラット疼痛モデルでのグリシントランスポーター 2 阻害薬 ALX1393 の脳室内投与による鎮痛作用、日本麻酔科学会第 62 回学術集会、2015 年 5 月 29 日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・大学病院・准教授

研究者番号： 20331001

(2)研究分担者

原西 保典 (HARANISHI, Yasunori)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号： 90449942

佐多 竹良 (SATA, Takeyoshi)

産業医科大学・名誉教授、学長等・名誉教授

研究者番号： 60128030