

平成30年6月20日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20039

研究課題名（和文）神経因性疼痛モデルマウスにおけるCGRPとアドレノメデュリンの関与

研究課題名（英文）Involvement of CGRP and adrenomedullin in animal models of neuropathic pain

研究代表者

石田 公美子（松尾公美子）（Ishida, Kumiko）

信州大学・医学部・助教（特定雇用）

研究者番号：80467191

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： CGRP遺伝子欠損マウスと野生型マウスを用いて、一側の坐骨神経結紮モデル（Partial sciatic nerve ligation model）を作製し、神経因性疼痛における CGRPの関与を検討した。本研究では、神経因性疼痛における自発痛、機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏に対して、CGRPは関与しないことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： We studied the involvement of CGRP in neuropathic pain model by using CGRP knockout mice and wild type mice. Our study suggested that CGRP was not involved in spontaneous pain, thermal hyperalgesia and mechanical hyperalgesia in partial sciatic nerve ligation model.

研究分野：麻酔・蘇生学

キーワード：神経因性疼痛 CGRP CGRPファミリー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 神経因性疼痛や炎症性疼痛、術後痛のような持続的な疼痛状態では、脊髄後角の神経終末よりグルタミン酸、ペプチドなど様々な種類の興奮性伝達物質が放出される。同時に複数の受容体が活性化することで細胞内シグナル伝達を介し、脊髄の過剰興奮を来す (Milligan ED et al., Nature Rev Neurosci, 2009)。一方で軸索反射により逆行性にも刺激が伝達し、末梢より興奮性神経伝達物質が放出され、末梢の痛覚線維感受性興奮もきたす (Julius D, et al., Nature 2001)。これまでグルタミン酸やそれらの受容体に関する研究は発展したが、サブスタンス P, CGRP などのペプチドについてはいまだ不明な点が多い。これらの背景のもと、我々は、独自に作製された  $\alpha$ CGRP ノックアウトマウスを用いて、術後痛モデルと炎症性疼痛モデルを作製し、 $\alpha$ CGRP は術後痛には関与しないが、炎症性疼痛モデルの自発痛や、熱性痛覚過敏に関与することを明らかにした (Ishida K et al. Anesthesiology 2014)。

(2) CGRP ファミリーであるアドレノメデュリン (AM) は血管拡張作用、抗炎症作用、抗酸化作用、ホルモン分泌調節など多彩な生理活性を有するだけでなく、痛みの伝達物質である可能性が示唆され、炎症性疼痛への関与が報告されている (Hong et al., Pain, 2009)。CGRP 以上の長時間痛覚過敏を示すことから、CGRP より痛みに重要な内因性リガンドである可能性がある (Ma et al., PNAS, 2006)。

(3) CGRP ファミリーの受容体は、カルシトニン受容体様受容体 (CRLR) という 7 回膜貫通 G 蛋白受容体を共有し、受容体活性調節蛋白 (RAMP1-3) が CRLR に結合してそのリガンドを決定する。すなわち、CRLR + RAMP1 の発現では CGRP 受容体として作用し、CRLR + RAMP2 は AM 受容体として作用する。このように、受容体の構成が

複雑なため、痛みの研究において CGRP の研究は遅延していたと思われる。最近、CGRP 受容体に特異性の高い拮抗薬の開発がなされ、欧米では、偏頭痛治療薬として、RAMP1 に対する拮抗薬である MK-0974 (telcagepant) が開発中である。

## 2. 研究の目的

神経因性疼痛は、末梢・中枢神経系の損傷により生じる痛みであり、外傷、脊椎・脊髄疾患、糖尿病性ニューロパチー、代謝異常に起因し治療に難渋する痛みである。これまで様々な治療が試みられてきたが、いまだ決定的な治療法がない。一方、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) は痛みの伝達・修飾物質として重要であるが、その詳細な機序は未だ不明である。本研究では、独自に作製されたノックアウトマウスを用いて、CGRP ファミリーである CGRP やアドレノメデュリン (AM) が神経因性疼痛に関与しているメカニズムを明らかにし、カルシトニン受容体様受容体 (CRLR) と、受容体活性調節タンパク (RAMP) をターゲットとした、新たな鎮痛法の開発を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 神経因性疼痛モデルの作製と疼痛行動の評価

臨床における神経損傷にともなう神経因性疼痛は、不完全な神経損傷により起こることが多く、本研究では以下に示す 3 種類の部分神経損傷モデルを用いた。実験には、 $\alpha$ CGRP KO マウス (ホモ接合体) と野生型マウスを用いた。各マウスにおいて、一側の坐骨神経を部分結紮する Partial sciatic nerve ligation (PSNL) モデル (Seltzer et al. 1990)、一側の L5 神経を結紮切断する Segmental spinal nerve ligation (SNL) モデル (Chung et al. 1992)、一側の総腓骨神経と脛骨神経を結紮・切断する Spared nerve injury (SNI) モデル (Descosterd et al. 2000) の 3 種類の神経因性疼痛モデルを作製し、自発痛

関連行動、侵害性機械刺激 ( von Frey フィラメント ) に対する逃避閾値、侵害性熱刺激に対する逃避潜時を経時的に記録し、遺伝子欠損マウスと野生型マウスを比較した。

## (2) 生化学的検討

神経因性疼痛モデルを作製後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄・脊髄後根神経節(DRG)を取り出し、CGRP や神経活動のマーカーである c-Fos の発現を免疫組織学的に検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 神経因性疼痛モデルにおける $\alpha$ CGRP の自発痛関連行動・熱性痛覚過敏・機械性痛覚過敏への関与

PSNL モデル作製 1-7 日後に野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに Guarding Pain Score (GPS) は基準値と比較して有意に増加した。観察期間を通して両群間に差はなかった。

自発痛関連行動 ( Flinch 回数 ) は、野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに PSNL モデル作製 1-3 日後に増加傾向であったが、基準値と比較して有意差はなく、観察期間を通して両群間に差はなかった。

PSNL モデル作製 1-63 日後に野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに侵害性機械刺激に対する逃避閾値が基準値と比較して有意に低下した。観察期間を通して両群間に差はなかった。

PSNL モデル作製 1-63 日後に野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに侵害性熱刺激に対する逃避潜時が基準値と比較して有意に減弱した。観察期間を通して両群間に差はなかった。

#### (2) 免疫組織染色による脊髄後角における c-Fos 発現の検討

PSNL モデル作製 4 時間後は野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに患側の脊髄後角表層における c-Fos の発現が増加したが、モデル作製 7 日後には消失した。

### (3) 研究成果のまとめ

$\alpha$ CGRP は神経障害性疼痛モデルにおいて自発痛、機械性痛覚過敏、熱性痛覚過敏に関与しないことが示された。

神経障害性疼痛モデル (PSNL モデル) による機械性痛覚過敏や熱性痛覚過敏は野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに術後 1-63 日まで持続したが、自発痛は、野生型マウス、 $\alpha$ CGRP KO マウスともに術後 1-7 日で減弱した。また、免疫組織染色より神経活動のマーカーである c-Fos は術後 4 時間後には発現が増加したが、7 日後には発現は消失した。このことから神経障害性疼痛モデルは、以前我々が報告した (Ishida et al. 2014) 術後痛モデルや炎症性疼痛モデルとは異なるメカニズムであることが示唆された。

臨床において CGRP 受容体拮抗薬は偏頭痛の治療薬としてすでに臨床応用されている。疼痛の種類により効果が異なり、神経障害性疼痛自体には有効でないが、炎症を伴う神経障害性疼痛には有効である可能性がある。

### 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)

石田公美子、川真田樹人：カルシトニン遺伝子関連ペプチドの作用から考える術後痛モデルのメカニズム - 炎症性疼痛モデルと比較して - . 日臨麻会誌 2017; 38: P397-404. (査読有)

石田公美子、川股知之、田中聡、新藤隆行、川真田樹人：カルシトニン遺伝子関連ペプチドは炎症性疼痛に関与するが術後痛には関与しない. 麻酔 2015; 64: S230-S237. (査読有)

[学会発表](計3件)

張昊、石田公美子、田中聡、小島恵美、中田勉、柏原俊英、川真田樹人、山

田 充彦: 徐脈誘発薬イバブラジンのラット神経障害性痛モデルへの効果, 第90回日本薬理学会, 2017.

石田公美子: カルシトニン遺伝子関連ペプチドの作用から考える術後痛モデルのメカニズム - 炎症性疼痛モデルと比較して, 日本臨床麻酔学会第36回大会, 2016.

Ishida K, Tanaka S, Zhang H, Kawamata M: Hyperpolarization-Activated Cyclic Nucleotide-Gated (HCN) Channels are involved in Neuropathic Pain in Rats. Anesthesiology: A2206, 2015.

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 公美子 (ISHIDA KUMIKO)

信州大学・医学部・助教 (特定雇用)

研究者番号: 80467191