

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09050

研究課題名(和文)線維筋痛症の前帯状回を中心とした機能解析およびP2X7受容体配列をもつ治療薬開発

研究課題名(英文)Functional analysis in anterior cingulate cortex and development of therapeutic agent using P2X7 receptor sequences on fibromyalgia

研究代表者

右田 啓介(Migita, Keisuke)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：10352262

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):本研究では、線維筋痛症などの慢性疼痛発症における脳内の機能的変化について検討を行った。線維筋痛症モデルマウスとして作製した、反復低温ストレス負荷マウス、社会的ストレスマウス、酸性生理食塩水の腓腹筋投与マウス、坐骨神経部分結紮(PNSL)マウスでは、痛覚異常や前辺縁皮質におけるc-fosタンパク質の発現が観察された。また、PNSLマウスでは、ムスカリンM1受容体アゴニスト刺激により、脳内のGABAB受容体を介して疼痛を抑制できることを示した。本研究より、線維筋痛症患者の疼痛はムスカリンM1受容体アゴニストあるいはGABAB受容体アゴニストにより抑制できる可能性が示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

線維筋痛症の患者は、日本だけでも200万人はいると推定されており、発症原因は明らかにされていない。また、有効な治療薬がほとんどないため、多くの方が症状の疲労感や疼痛で苦しんでいる。本研究では、慢性疼痛に対して脳内のムスカリンM1受容体アゴニストがGABAB受容体を介して抑制効果があることを示した。今後、中枢性のムスカリンM1受容体アゴニストやGABAB受容体アゴニストを開発することで、線維筋痛症の新たな治療薬を創出できることが期待でき、本研究は学術的および社会的に意義深い。

研究成果の概要(英文):We investigated the mechanism of neuropathic pain in the brain of fibromyalgia. To investigate pain assessment and c-fos protein expression, we made mouse models for fibromyalgia, including of RCS (repeated cold stress), SS (social stress), UGIAS (unilateral gastrocnemius injection with acidic saline) and PNSL (partial sciatic nerve ligation) models. All mouse models showed the hypersensitivity to the mechanical stimulation using von Frey filament. In SS and RCS mice, c-fos protein was expressed in prefrontal cortex. On the other hand, PNSL-induced mechanical hypersensitivity was inhibited by an intracerebroventricular administration of a muscarinic M1 receptor agonist. Further, the muscarinic M1 agonist-induced alleviative effect was inhibited by a GABAB receptor antagonist. These results suggest that the pain in fibromyalgia may be alleviated by a muscarinic M1 receptor agonist and a GABAB receptor agonist.

研究分野：神経薬理学

キーワード：線維筋痛症 疼痛 前頭前野 帯状回 ムスカリンM1受容体 GABAB受容体

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛の脳内では、様々な部位における機能的変化が解明されつつある。慢性疼痛に対する fMRI の研究では、体性感覚野、帯状回、島皮質、視床の局所血流増加により神経活動性が高いことが示唆され、これらの部位では種々の可塑的变化も報告されている。慢性疼痛や心因性などのストレスにより疼痛関連領域で生じる神経調節のバランス崩壊は、下行性疼痛抑制系の神経核である中脳水道周囲灰白質への調節に異常をきたし、難治性疼痛を引き起こすと考えられる。近年、線維筋痛症の脳に対する fMRI 研究において、前帯状回と島皮質のネットワークが強くなり、前帯状回と中脳水道周囲灰白質との連絡がなくなることが報告された¹⁾。また、線維筋痛症は、女性の発症率が高いことが知られており、島皮質および中脳水道周囲灰白質と前帯状回の機能的変化に性差があるかもしれない。しかしながら、これらのメカニズムについては明らかにされていない。

2. 研究の目的

上記の研究背景から、線維筋痛症における島皮質および中脳水道周囲灰白質と前帯状回間の神経調節機構の変化について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 線維筋痛症モデルマウスの作製

線維筋痛症モデルマウスとして、反復低温ストレス負荷モデル (Repeated cold stress, RCS)、社会的ストレスモデル (Social stress, SS)、酸性生理食塩水の腓腹筋投与モデル (Unilateral gastrocnemius injection with acidic saline, UGIAS) を以下の方法で作製した。また、比較のために坐骨神経部分結紮 (PSNL) マウスも作製した。

- ・RCS は、6 週齢の雄性および雌性 ICR マウスを用いて、1 日目の 17 時から翌日 10 時まで 4°C で飼育し、その後 17 時まで 1 時間毎に 4°C と室温の部屋を交互に移動させ、17 時から次の日の 10 時まで 4°C で飼育する操作を、ストレス負荷開始から 5 日後の 10 時まで行い作製した。
- ・SS マウスは、雄性および雌性 ICR マウスを 10 分間 Wistar 系雄性ラットと同じケージに入れ、その後ラットとマウスを金網で隔てて一晩飼育して作製した。
- ・UGIAS マウスは、pH 4 に調整した生理食塩水 5 μ L を 5 日間連続で左側の腓腹筋に投与して作製した。
- ・PSNL マウスは、三種混合麻酔 (塩酸メドミジン、ミダゾラム、酒石酸ブトルフェノール) 下で、左後肢の大腿中央部より中枢側の坐骨神経の 1/3~1/2 を 8-0 ナイロン糸で強く結紮し作製した。

(2) 疼痛評価

疼痛評価は、von Frey 法により行った。0.4 g および 0.16 g の von Frey フィラメントをマウスの後肢足底部に 5 秒間押し当て、その刺激に対する逃避行動をスコア化 (0: 無反応, 1: 3 秒~5 秒で後肢を挙上, 2: 3 秒以内に後肢を挙上, 3: 瞬時に後肢を挙上またはなめる) した。この操作を 5 回行い、スコアの合計を痛みの強さとして評価した。

(3) 免疫染色法

各モデルマウスに対して、三種混合麻酔下で生理食塩水および 4% パラホルムアルデヒドの心臓灌流を行った。固定後、脳を摘出し、30% ショ糖液に 2 日間漬けこみ、20 μ m~50 μ m の凍結切片を作製した。前頭前野の切片は PBS で 3 回洗浄し、M1 受容体、GABAB1 受容体、c-fos タンパク質の抗体を 4°C で一晩反応させた。PBS で洗浄後、Alexa 488 または 594 で標識された二次抗体を室温で 1 時間反応させ、蛍光顕微鏡下で観察した。

4. 研究成果

(1) PSNL マウス

PSNL 側では、結紮後 7 日から 50 日以上 of 長期間にわたり痛覚異常が観察された (Fig. 1)。この痛覚異常は、ムスカリン M1 受容体アゴニストの McN-A-343 を脳室内投与することで濃度依存的に抑制された (Fig. 2)。さらに、McN-A-343 による痛覚異常の抑制は、GABAB 受容体アンタゴニストの CGP35348 を脳室内に同時投与することで濃度依存的に抑制されたが、GABAA 受容体アンタゴニストのピククリンの脳室内同時投与では抑制されなかった (Fig. 3)。これらの結果から、ムスカリン M1 受容体を介した痛覚異常の抑制効果は、GABAB 受容体を介して生じていることが示唆され

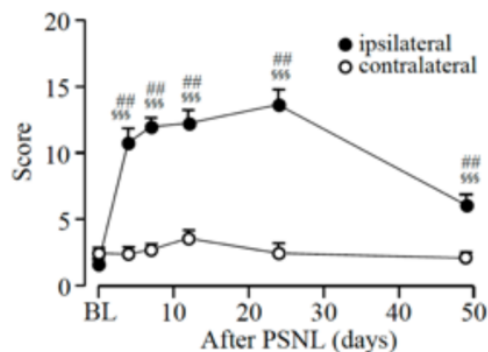


Fig. 1. PSNL マウスにおける痛覚評価

た。さらに、ムスカリン M1 受容体および GABAB1 受容体抗体を用いて、全脳に対する免疫染色を行なった結果、帯状回、一次体性感覚野、海馬、視床、扁桃体あるいは中脳水道周囲灰白質など多くの痛覚関連領域で両受容体が共存していることも確認された。これらのことから、中枢に作用するムスカリン M1 受容体アゴニストは疼痛抑制薬に応用できる可能性が非常に高い。

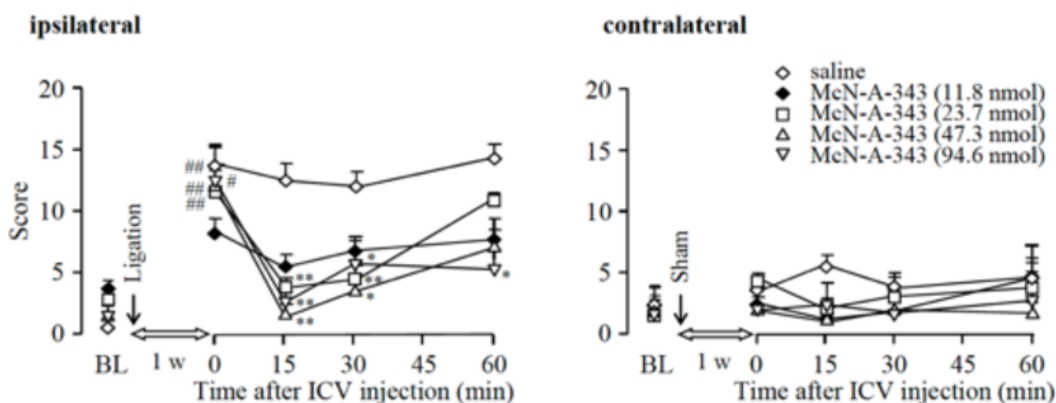


Fig. 2. PSNLマウスの疼痛に対するMcN-A-343の効果

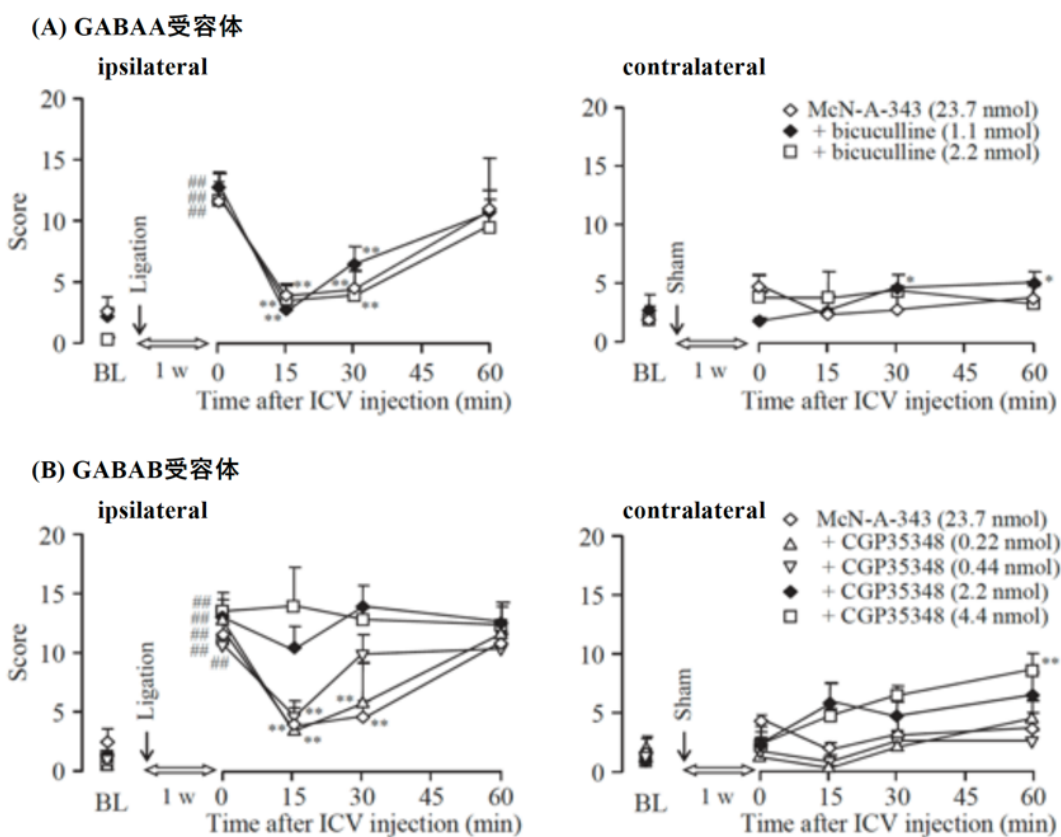


Fig. 3. McN-A-343によるPSNLマウスの疼痛抑制の作用機序に含まれるGABA受容体サブタイプ

(2) RCS マウス

RCS マウスでは、反復ストレス負荷後 7 日目まで痛覚異常が見られた。また、この痛覚異常は左足と右足で異なる傾向にあったが、バラツキが大きくさらに精度の高いデータを取得する必要がある。

(3) SS マウス

SS マウスでは、雌性マウスにおいてストレス負荷後 7 日までに若干の痛覚異常が見られた。また、前頭前野における c-fos タンパク質の発現も観察されたが、対照群と比較して明らかな差は確認できなかった (Fig. 4)。今後、さらなる追加の実験が必要である。

(4) UGIAS マウス

UGIAS マウスでは、酸性生理食塩水を投与した左側において後 4 日目から 11 日目まで痛覚異常

が観察された。また、右側でも4日目から11日目まで徐々に痛覚異常が増強した (Fig. 5)。

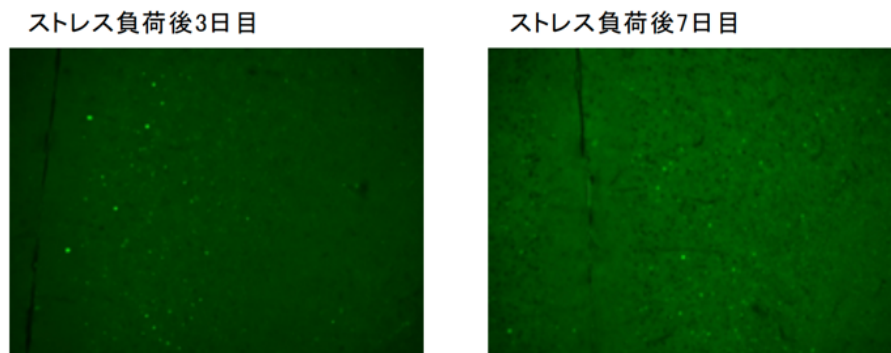


Fig. 4. 雌性SSマウスの前頭前野におけるc-fosタンパク質の発現

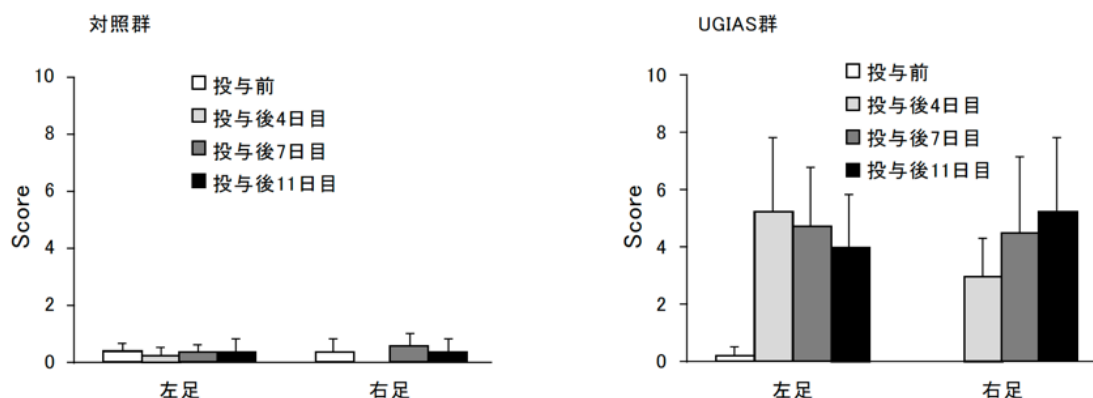


Fig. 5. UGIASマウスにおける痛覚評価

以上のように、線維筋痛症のモデルマウスとして考えられている RCS マウスやUGIAS マウスに加えて、SS マウスおよびPSNL マウスを用いて疼痛の評価を行った。全てのモデルマウスにおいて、痛覚異常は確認されたが、そのレベルにはバラツキが見られた。また、従来用いられてきた慢性疼痛モデルマウスである PSNL マウスを用いて、ムスカリン M1 受容体アゴニストが疼痛を抑制することを見出した。さらに、この疼痛抑制は、脳室内へ GABAB 受容体アンタゴニストを投与することで抑制され、GABAA 受容体アンタゴニストでは抑制が見られなかった。一方、我々はムスカリン M1 受容体アゴニストによる疼痛抑制は、帯状回への GABAA 受容体アンタゴニストの微量投与により抑制できることも報告している⁵⁾。このことから、脳室内に投与された GABAA 受容体拮抗薬は、帯状回に到達できない可能性も考えられる。

以上のように、慢性疼痛の脳内では、前頭前野のムスカリン M1 受容体や GABA 受容体が深く関与しており、島皮質と帯状回あるいは帯状回と中脳水道周囲灰白質の神経連絡に影響している可能性が考えられ、今後さらなる検討を続けていく必要がある。

<引用文献>

- 1) Cifre et al, Disrupted functional connectivity of the pain network in fibromyalgia, *Psychosom Med*, 74(1):55-62, 2012
- 2) Yamashita et al, Astrocytic activation in the anterior cingulate cortex is critical for sleep disorder under neuropathic pain, *Synapse*, 68(6):235-247, 2014
- 3) Lalo et al, ATP from synaptic terminals and astrocytes regulates NMDA receptors and synaptic plasticity through PSD-95 multi-protein complex, *Sci Rep*, 6:33609, 2016
- 4) Lee et al, Histone deacetylase 6 gates the synaptic action of acute stress in prefrontal cortex, *J Physiol*, 590(7):1535-1546, 2012
- 5) Koga et al, Stimulating muscarinic M₁ receptors in the anterior cingulate cortex reduces mechanical hypersensitivity via GABAergic transmission in nerve injury rats, *Brain Res*, 1704:187-195, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Migita K, Matsuzaki Y, Koga K, Matsumoto T, Mishima K, Hara S, Honda K	4. 巻 137
2. 論文標題 Involvement of GABAB receptor in the antihypersensitive effect in anterior cingulate cortex of partial sciatic nerve ligation model	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 233-236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2018.05.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Terada K, Migita K, Matsushima Y, Sugimoto Y, Kamei C, Matsumoto T, Mori M, Matsunaga K, Takata J, Karube Y	4. 巻 13
2. 論文標題 Cholinesterase inhibitor rivastigmine enhances nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells via sigma-1 and sigma-2 receptors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Koga K, Matsuzaki Y, Migita K, Shimoyama S, Eto F, Nakagawa T, Matsumoto T, Terada K, Mishima K, Furue H, Honda K	4. 巻 1704
2. 論文標題 Stimulating muscarinic M1 receptors in the anterior cingulate cortex reduces mechanical hypersensitivity via GABAergic transmission in nerve injury rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Brain Res	6. 最初と最後の頁 187-195
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.brainres.2018.10.013	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nikaido Y, Furukawa T, Shimoyama S, Yamada J, Migita K, Koga K, Kushikata T, Hirota K, Kanematsu T, Hirata M, Ueno S	4. 巻 361
2. 論文標題 Propofol anesthesia is reduced in phospholipase C-related inactive protein type-1 knockout mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Pharmacol Exp Ther	6. 最初と最後の頁 367-374.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.116.239145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Terada K, Migita K, Matsushima Y, Kamei C	4. 巻 14
2. 論文標題 Sigma-2 receptor as a potential therapeutic target for treating central nervous system disorders	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neural Regen Res	6. 最初と最後の頁 1893-1894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4103/1673-5374.259609	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Migita K, Matsumoto T, Terada K, Ono K, Hara S	4. 巻 140
2. 論文標題 Effects of geldanamycin on neurite outgrowth-related proteins and kinases in nerve growth factor-differentiated pheochromocytoma 12 cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 255-262
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.07.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto T, Jimi S, Migita K, Terada K, Mori M, Takamatsu Y, Suzumiya J, Hara S	4. 巻 110
2. 論文標題 FF-10501 induces caspase-8-mediated apoptotic and endoplasmic reticulum stress-mediated necrotic cell death in hematological malignant cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Hematol	6. 最初と最後の頁 606-617
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12185-019-02722-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Migita K, Nishimura A, Eto F, Koga K, Matsumoto T, Terada K, Hara S, Honda K	4. 巻 142
2. 論文標題 Muscarinic M1 receptors stimulated by intracerebroventricular administration of McN-A-343 reduces the nerve injury-induced mechanical hypersensitivity via GABAB receptors rather than GABAA receptors in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J Pharmacol Sci	6. 最初と最後の頁 50-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.06.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 寺田一樹、松嶋ゆかり、渡瀬大輔、山川博文、松永和久、瀬戸口修一、後藤将太郎、右田啓介、高田二郎、加留部善晴
2. 発表標題 神経様細胞PC12におけるNGF依存性神経突起伸展作用に対するリバスチグミンの増強機構
3. 学会等名 第48回日本精神神経薬理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右田啓介、松本太一、原周司
2. 発表標題 ボルテゾミブは神経細胞に対して障害作用および突起伸長作用を有する
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松本太一、木村公彦、小野和彦、右田啓介、原周司
2. 発表標題 ボルテゾミブがG-CSFによる造血幹細胞動員を促進するメカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 本多健治、古賀浩平、松崎雄、右田啓介、中島茂人、牛島悠一、入江圭一、三島健一
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルにおける前帯状回ムスカリン受容体の疼痛抑制とムスカリン受容体発現量
3. 学会等名 第70回日本薬理学会西南部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 右田啓介, 松本太一, 木村公彦, 原周司
2. 発表標題 HSP90拮抗薬ゲルダナマイシンにおける神経細胞への影響
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右田啓介, 松本太一, 木村公彦, 原周司
2. 発表標題 P2X2受容体またはP2X7受容体のNおよびC末部分がもつ機能的特徴
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 右田啓介, 本多健治, 松本太一, 原周司
2. 発表標題 内ムスカリンM1受容体はGABAB受容体を介し神経障害性疼痛を抑制する
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>福岡大学機関リポジトリ薬学集報 https://fukuoka-u.repo.nii.ac.jp/index.php?action=pages_view_main&active_action=repository_view_main_item_snippet&index_id=691&pn=1&count=20&order=7&lang=japanese&page_id=13&block_id=39</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松本 太一 (Matsumoto Taichi) (80570803)	福岡大学・薬学部・助教 (37111)	
連携 研究者	古賀 浩平 (Koga Kohei) (50768455)	弘前大学・886・28 (11101)	