

令和元年6月28日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15790

研究課題名(和文)慢性疼痛に対するwithaferin Aの鎮痛効果とそのメカニズム解明

研究課題名(英文)A effect of withaferin A on extra-territorial facial pathological pain following a trigeminal nerve injury

研究代表者

堀江 佳代(Kayo, Horie)

広島大学・病院(歯)・歯科診療医

研究者番号：50784253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯科領域における関連痛は原因鑑別が困難である上に、慢性疼痛化し鎮痛薬が効かない難治性の疼痛となりやすい。我々の研究室では、オトガイ神経切断後、上顎神経領域に疼痛が慢性的に発症する、オトガイ切断モデルラットを作成し、今まで疼痛発症機序の解明を行ってきた。今までの実験結果としてオトガイ神経切断後、三叉神経脊髄路核(Vc)領域で、異常なマイクログリアの局在集積が認められ、上顎および下顎神経領域相当部に炎症性サイトカインを過剰分泌することが分かっている。今回我々は、NFkB p65のリン酸化を阻害するwithaferin Aに着目し、この鎮痛効果について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛は、世界中に潜在的な患者が約20%もいるとされている。この疼痛は難治性である上に、心的および身体的苦痛を引き起こす。そのため、慢性疼痛に対する根本的、対処療法的治療方法の確立は急務である。今回我々は、NFkB p65のリン酸化を阻害することで、炎症性サイトカインカスケードを阻害するWithaferin Aという物質に着目し、鎮痛効果が認められるかどうか検討した。Withaferin Aは、インド原産のアシュガワンダというハーブの根から抽出される物質である。古くは民間療法に用いられ、大きな副作用の報告は今のところない。そのため、副作用が少なく汎用性の高い薬剤であると期待する。

研究成果の概要(英文)：Referred pain in the clinical dental area is difficult to differential diagnosis, and is likely to be chronic pain, intractable pain which an analgesic is not effective. In our laboratory, we have created model rat with a chronic pain in the maxillary nerve area after a cutting mental nerve. We have elucidated the pathogenesis of pain so far. As a result of the experiment up to now, abnormal accumulation of microglia was observed in the trigeminal spinal cord nucleus (Vc) area after mental nerve transection. And we observed hypersecretion of inflammatory cytokines in maxillary and mandibular nerve area in Vc. Thus, We focused on withaferin A, which inhibits the phosphorylation of NFkB p65, and examined its analgesic effect.

研究分野：慢性疼痛

キーワード：慢性疼痛 オトガイ神経切断 上顎神経 三叉神経脊髄路核 NFkB p65 withaferin A

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科領域では、疾患の部位と患者が疼痛を訴える部位が異なる異所性疼痛（通称関連痛と呼ばれる。）がしばしば認められる。例えば、下顎の歯根の細菌感染によって、上顎の疼痛を認めることがある。異所性疼痛は疾患の発症部位の特定が困難であることに加え、鎮痛薬の効果が少ないことから、治療が非常に困難である。さらに異所性疼痛は、疼痛が6週間を超えて持続する慢性疼痛に移行しやすく、その場合、さらに治療は困難になる。そればかりではなく、疼痛に対する恐怖心、不安感といった精神的苦痛を二次的に強いられ、痛みの悪循環を引き起こす。異所性疼痛の発症機序については、過去の報告より、末梢神経の障害ではなく中枢側である脊髄もしくは、延髄での炎症に由来するものであると考えられている。顎顔面領域の主要な脳神経として、三叉神経が存在するが、三叉神経は脳皮質より三叉神経脊髄路核の延髄脊髄移行部を経由し、三叉神経節から、第1枝の眼神経、第2枝の上顎神経、第3枝の下顎神経に分岐し、それぞれ末梢神経へと分布している。2次ニューロンが存在する三叉神経脊髄路核付近では、神経細胞の他に、主に神経膠細胞として、マイクログリアやアストロサイトが存在する。疼痛研究の初期において、異所性疼痛の発症には、神経細胞による何らかの異常反応が関与しているという仮説が立てられていたが、近年では、疼痛実験動物モデルの作製によって、異所性疼痛は神経膠細胞が主要因であるという説が主流になってきている。我々の研究グループにおいても、下顎神経の末梢神経であるオトガイ神経損傷後、上顎神経支配領域である whisker pad (WP) において、異所性疼痛が長期にわたって発症していることを明らかにした (Takahashi et al., 2011)。さらに、オトガイ神経損傷後、中枢神経領域において、三叉神経脊髄路核付近のマイクログリアの異常集積が認められることを明らかにした (Murasaki et al., 2013)。さらに我々は、Bovine Lactoferrin (bLF) を用いた、異所性疼痛の鎮痛効果について検討した。bLF は多彩な生理活性を有した牛の母乳に含まれる 80 kDa 程度の糖タンパク質である。bLF は細胞内に取り込まれた後、膜受容体近傍に存在する TRAF6 に結合し、NF κ B p65 のリン酸化を抑制することで、それ以降のシグナルカスケードを阻害し、炎症性サイトカインを分泌抑制すると考えられている (Inubushi et al., 2012)。末梢神経損傷後に異所性疼痛が発症した際、bLF を髄腔内投与を行うことで、強力な鎮痛作用が認められた。また、三叉神経脊髄路核における組織タンパク質解析から、bLF は NF κ B p65 のリン酸化を抑制し、炎症性サイトカインの分泌を抑えることが明らかとなった (Horie et al., 2016)。そこで、NF κ B p65 のリン酸化が異所性疼痛の発症と持続に関与している可能性に着目した。これまで、異所性疼痛に関して、NF κ B p65 に着目した報告は少なく、その詳細なメカニズムは不明のままである。そのため今回申請者らは、NF κ B p65 の選択的阻害薬である Withaferin A を用いて実験を行うこととした。

2. 研究の目的

Withaferin A はインド原生の樹木であるアシュガワンダの根から抽出される成分であり、ステロイドホルモンに類似する化学式を持つ成分である。古くから、抗炎症、抗免疫反応、抗疲労作用を有する民間伝承医療薬として使用されてきた。Withaferin A は、強力な IKK α kinase (IKK complex) の阻害薬であり、IKK complex のリン酸化を阻害することで、NF κ B p65 の活性を抑制すると報告されている (Bargagna-Mohan et al., 2007; Gambhir et al., 2015)。しかし、Withaferin A は、現在までに乳癌や大腸癌への効果に対する報告があるのみで、異所性疼痛への報告は皆無である。異所性疼痛への鎮痛作用をもたらす薬剤で、Withaferin A と bLF はともに過去の報告から、大きな副作用を有しておらず、生体安全性は高い薬剤であると考えられる。一方で bLF と Withaferin A を比較すると、Withaferin A のほうが分子量が小さく、鎮痛効果が出現する用量が少なく済む可能性がある。そのため、コストの面や摂取量の面で bLF に比べて有利である可能性が高い。また、分子構造が bLF と比較して比較的簡略的である点や親水基を持つ点から、水溶性が高く局所への到達度について、有利であると考えられ、操作性のより良い鎮痛薬として今回研究することとした。

3. 研究の方法

実験 1 異所性疼痛とリン酸化 NF κ B p65 の関連性についての検討オトガイ神経損傷後、異所性疼痛モデルラットを作製し、機械的逃避行動試験を行う。また、NF κ B p65 のリン酸化と異所性疼痛の関連性について検討する。

1) 異所性疼痛モデルラットの作製実験モデルは 8 週齢雄性 sprague dawley ラットを用いた。ラットの下顎左側のオトガイ神経を剖出し、5-0 号シルク糸で硬く絞扼した後、その遠位側を 1 mm 切り取って作製する。その 24 時間後には、上顎神経支配領域である whisker pad の痛覚過敏が誘導される。判定は von Frey filament を用いて、whisker pad を刺激し、強く頭を振ったりひっこめたりする疼痛逃避行動を記録することで行われる。機械的逃避行動試験は、頭を振った回数を統計処理し EF50 値に換算する。2) 異所性疼痛時の三叉神経脊髄路核における p-NF κ B p65 の発現について無処置ラットと異所性疼痛モデルラットを経時的に還流固定し、延髄部分を摘出する。4%ホルムアルデヒドを用いた浸漬固定 30%スクロース液を用いた脱水を行った後、延髄の解剖学的指標である ovex を目安にし、厚さ 30 μ m の凍結切片を作成する。この切片に対し、p-NF κ B p65 の抗体を用いて免疫染色を行い、オトガイ神経損傷後の三叉神経脊髄路核での NF κ B p65 のリン酸化の経時的変化を検討することとする。さらに Western blot 解析を行い、オトガイ神経損傷後の NF κ B p65 のリン酸化発現の亢進を経時的に検討する。3) 異所性疼痛時の三叉神経脊髄路核における pNF κ B p65 の発現局在について無処置ラットと異所性疼痛モデルラットを用いて、実験 1-1) で確認した p-NF κ B p65 の発現の変化が著しい時点を選

扱し、p-NFκB p65 と、NFκB p65、Iba1 (マクログリア特異的抗体)、GFAP (アストロサイト特異的抗体)、抗 CD11b / CD11c 抗体(ニューロン特異的抗体)、について二重蛍光免疫染色を行う。これにより、各細胞の無処置とオトガイ神経損傷後の変化を確認し、また NFκB p65 のリン酸化発現の局在を検討する。

実験 2 異所性疼痛発症後、NFκB p65 のリン酸化阻害薬である Withaferin A を髄腔内投与することで、鎮痛効果について検討する。

1) 異所性疼痛に対する Withaferin A の鎮痛効果について予備実験を行い、Withaferin A の髄腔内投与の量と、濃度を決定する。効果が認められる最低濃度と、その 1/10 倍の効果が認められない濃度を用い、さらにコントロール薬剤として、希釈溶液に用いる saline を用いる。まずラットは髄腔内投与のためのチューブ留置オペを行った後、オトガイ神経損傷術を行うこととする。無処置時と機械的逃避行動試験を継続して行うことで、手術による影響が異所性疼痛と関連性がないことを確認しながら行うこととする。さらに、オトガイ神経損傷後、確実に異所性疼痛が発症していることを確認したのち、薬剤を投与し、1日後、2日後、3日後、と鎮痛効果が消失するまでを機械的逃避行動試験を行うこととする。Withaferin A で鎮痛効果が得られると仮説設定をしているが、ここで鎮痛効果が得られない場合は、NFκB p65 の選択的阻害薬について他の薬剤について検討することにする。2) Withaferin A 髄腔内投与後の鎮痛効果の分子メカニズムについて無処置群と、コントロール薬剤群と、Withaferin A 投与群で比較する。まず無処置群の延髄を摘出し、ドライアイスによる低温管理化で、前述したように規格化したサンプリングを行う。他の薬剤投与群は、チューブ留置オペを行った後、異所性疼痛の発症、機械的逃避行動試験を用いて確認し、各薬剤を髄腔内投与し、すべて同じタイムポイントで (実験 2-1) の結果から、Withaferin A の鎮痛効果が最も高い時点を基準にする。延髄を摘出し、規格化したサンプリングを行う。すべてのサンプルは新鮮なうちに、リン酸化阻害薬を添加しホモゲナイズを行い、遠心分離した後、タンパク上清を抽出する。このタンパクを 25 μg 当量ピックアップし、電気泳動によって分離し、ニトロセルロースに転写する。その後、各抗体を使用して反応させ、検出はケミルミにて行うこととする。すべての結果を Image J によって取り込み、タンパク発現濃度の density を無処置群で補正し、タンパク発現の定量化を行うこととする。また、NFκB p65 のリン酸化のほか、p38 MAPK のリン酸化や、申請者らの研究室で今まで検討していた炎症性サイトカインである IL-6、IL-18、および TNFα についても検討を行う予定である。

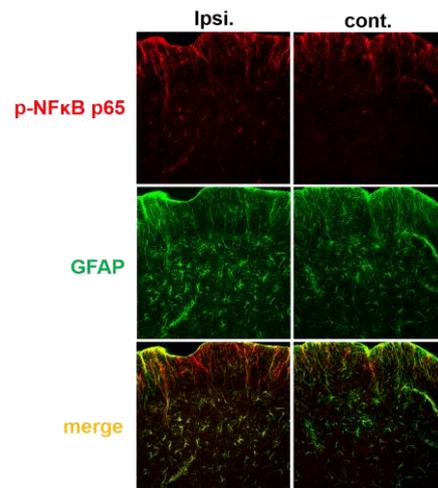
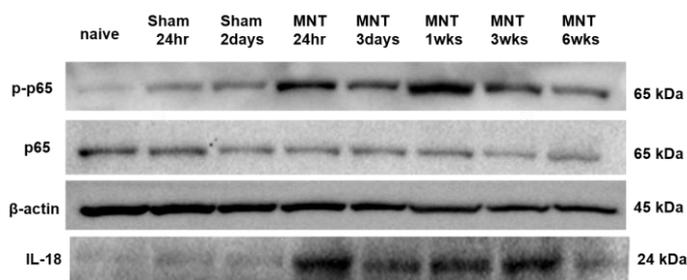
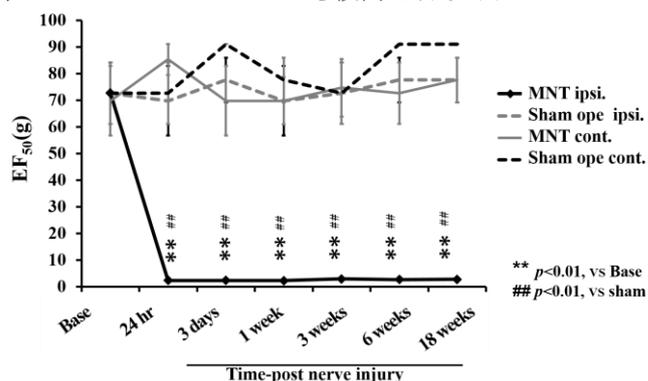
4. 研究成果

実験 1 1) と 4) MNT 後、異所性疼痛が発症し慢性化していることが認められた。つまり、MNT によって異所性疼痛は上顎神経領域に発症し慢性化することが、機械的逃避行動試験によって確認した。さらに、各タイムポイントで、脳サンプルを摘出し、ホモゲナイズ後、ウェスタンブロットを行った。その結果から、NFκB p65 のリン酸化と、IL-18 の過剰な分泌が、異所性疼痛発症時において naïve や偽オペ群と比較して、明らかに亢進していた。このことから異所性疼痛発症時、NFκB p65 のリン酸化によるシグナルカスケードによって炎症性サイトカイン IL-18 の分泌亢進が引き起こされる可能性が示唆され、これらの亢進が異所性疼痛発症に起因する可能性が示唆された。

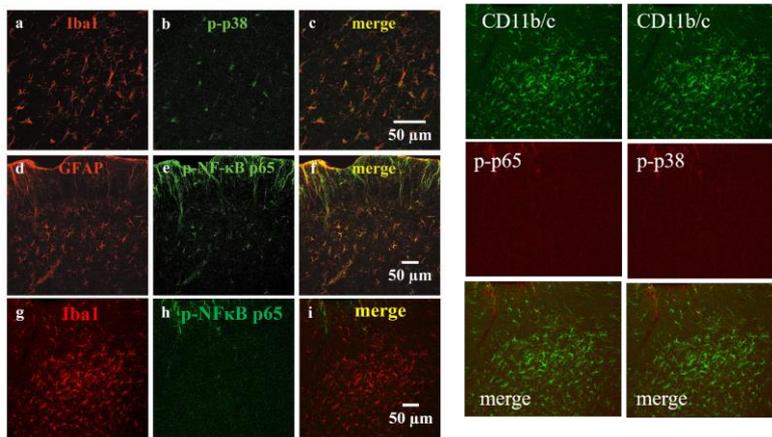
2) 三叉神経脊髄路核において NFκB p65 のリン酸化の経時的な変化について、脳摘出し、蛍光免疫染色をしたが、良好な画像データが得られなかった。しかし、傾向として、NFκB p65 のリン酸化は鮮明に染色されたものから観察すると、星状膠細胞との merge が認められた。そのため、MNT 後 1day で脳を摘出し、蛍光免疫染色を行い、3)の実験を行った。

3) MNT 後 1 day で脳摘出し、蛍光二重免疫染色を行った。結果として、異所性疼痛発症時、対照側と比較して、星状膠細胞の明らかな肥大化が認められた。この結果は、星状膠細胞の突起の伸展と肥大化が慢性疼痛時に認められるという論文結果と同じ結果となった (Hayden and Ghosh et al., 2004)。さらに NFκB p65 のリン酸化について免疫染色したところ、星状膠細胞内に merge しているような所見を得た。

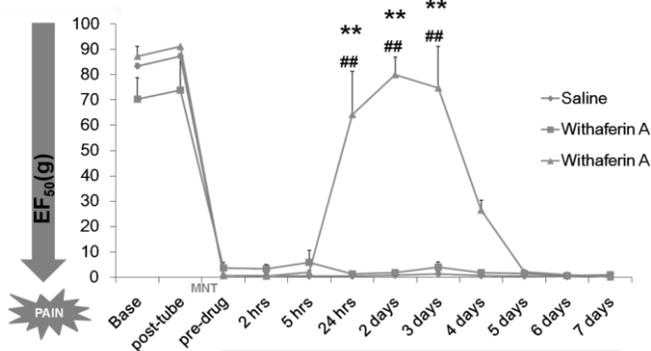
さらに、この所見を明確化するため、MNT 後 1 day の脳摘出を行い、星状膠細胞およびニューロンおよび小膠細胞において、NFκB p65 および MAPK p38 のリン酸化の局在を蛍光二



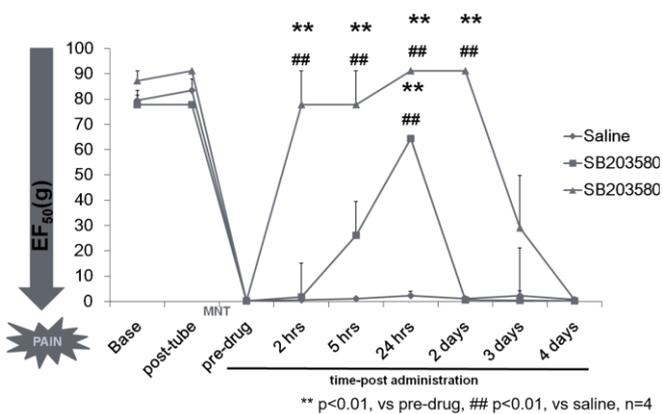
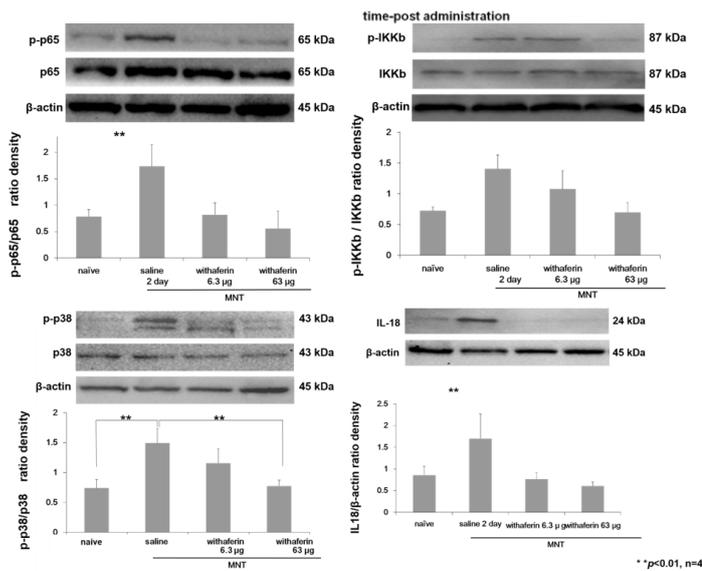
重免疫染色にて確かめた。図は、星状膠細胞および小膠細胞だけで表記しているが、ニューロンの結果も得ている。これによると、MAPK p38 のリン酸化は Iba1 である小膠細胞内に merge され、NFκB p65 のリン酸化は GFAP に示される星状膠細胞と merge している所見となった。ニューロンにおいては、とくに重なる所見は認められなかった。つまり、小膠細胞は MAPK による、また星状膠細胞は NFκB p65 によるシグナルカスケードを有する可能性が示唆された。



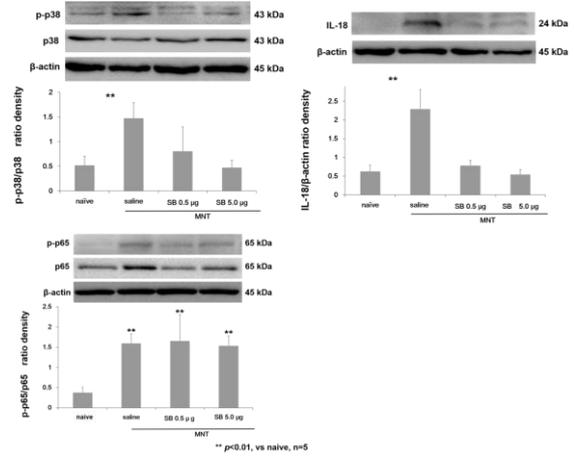
実験 2 1) MNT 前に髄腔内投与用の tube open を行い、Withaferin A の髄腔内投与によって鎮痛効果がられるか機械的逃避行動試験によって検討したところ、Withaferin A の効果有効濃度を髄腔内投与した群において逃避行動は示さず、鎮痛効果があることが示された。



2) Withaferin A の有効濃度が確定したため、有効濃度とその 10 倍希釈濃度および生理食塩水でコントロールをとり、脳サンプルにおいて、NFκB p65 のリン酸化と、IL-18 の分泌について変化があるかどうかをウエスタンブロットで検討したところ、鎮痛効果が認められる Withaferin A 有効濃度群において、NFκB p65 のリン酸化亢進と IL-18 の分泌亢進を抑制した。さらに、周辺組織の影響によると考えられるが、p38 のリン酸化抑制もなされた。この結果から、星状膠細胞および小膠細胞はお互いの活性について協同している可能性が示唆された。そのため、対照実験として、p38 のリン酸化阻害剤である SB203580 を髄腔内投与して機械的逃避行動試験を行ったところ、やや強く鎮痛効果が得られた。またこのサンプルでウエスタンブロットを行った結果から、p38 のリン酸化を阻害することでも、炎症性サイトカインの分泌亢進は抑制されることが示された。



またこのサンプルでウエスタンブロットを行った結果から、p38 のリン酸化を阻害することでも、炎症性サイトカインの分泌亢進は抑制されることが示された。



5. 主な発表論文等
[雑誌論文] (計0件)

[学術発表] (計0件)

6. 研究組織
(2) 研究協力者

研究協力者氏名：谷本 幸太郎
ローマ字氏名：Kotaro Tanimoto

研究協力者氏名：廣瀬 尚人
ローマ字氏名：Naoto Hirose

研究協力者氏名：國松 亮
ローマ字氏名：Ryo kunimastu

研究協力者氏名：中谷 文香
ローマ字氏名：Ayaka Nakatani

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。