

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16740

研究課題名(和文)慢性疼痛における痛覚伝導路でのヘム・オキシゲナーゼの鎮痛・発痛効果の検討

研究課題名(英文)The role of heme oxygenase in chronic pain

研究代表者

五代 幸平 (Godai, Kohei)

鹿児島大学・医歯学域医学系・助教

研究者番号：20767488

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)：本研究は慢性疼痛におけるヘム・オキシゲナーゼ-1 (H0-1)の役割を痛覚の伝導路において解明するものである。ガバペンチノイド(プレガバリン・ガバペンチン)はCaチャンネル $\alpha 2\delta$ リガンドであり、神経障害性疼痛の第一選択薬である。慢性神経障害性疼痛モデルでマウスにおいてH0-1誘導薬はガバペンチノイドの鎮痛効果を増強し、H0-1阻害薬は鎮痛効果を抑制した。ガバペンチノイドは脊髄後角においてH0-1の発現を増加させグリア細胞の発現を抑制したが、その効果はH0-1阻害薬により消失した。以上、ガバペンチノイドの鎮痛効果にH0-1が関与していることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は難治性であり、しばしば慢性化する。ガバペンチノイド(プレガバリン・ガバペンチン)は神経障害性疼痛の第一選択薬であるが、その効果は十分ではない。本研究により、ガバペンチノイドの鎮痛効果にH0-1が関与していることが判明した。ガバペンチノイドの鎮痛効果を増強できれば、慢性神経障害性疼痛患者の治療効果改善に貢献することが期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the roll of heme oxygenase-1 (H0-1) during chronic pain conditions. Gabapentinoids are classified as first-line drugs for neuropathic pain. Neuropathic pain was induced by spared nerve injury of the sciatic nerve. H0-1 inducer enhanced the antiallodynic effects of gabapentinoids. H0-1 inhibitor prevented the antiallodynic effects of gabapentinoids. SnPP prevented H0-1 induction and glial inhibition which were produced by gabapentinoids.

In conclusion, this study suggests that H0-1 plays crucial roles in the antiallodynic effects of gabapentinoids.

研究分野：麻酔科学

キーワード：ヘム・オキシゲナーゼ 神経障害性疼痛 カルシウムチャンネル 2 サブユニット ガバペンチノイド  
ミクログリア

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヘム・オキシゲナーゼ (HO)はヘム分解酵素であり、ヘムを分解し一酸化炭素(CO)とビリルピンを産生する。HOにはHO-1及びHO-2の2種類のサブタイプが存在し、それぞれ慢性疼痛に関与している。HO-1は末梢性に鎮痛に作用する一方で、HO-2は中枢性に発痛に関与していると考えられている。申請者らはHO-1が炎症組織でのマクロファージの極性を炎症型から抗炎症型へ変化させることによって炎症性疼痛及び術後痛を改善することを報告した(Biochem Biophys Res Commun 2012, PAIN 2013)。また申請者らは術後痛において、モルヒネ局所投与の鎮痛作用にHO-1が関与することを示した(Mol Pain 2014)。HO-1はニューロン・ミクログリア・アストロサイト全ての細胞に発現すると報告されている。神経障害性疼痛などの慢性疼痛において、ミクログリアが活性化することでニューロンの興奮性が高まることが知られている。慢性疼痛においては、グリア細胞でのHO-1発現が減少しニューロンでのHO-2発現が増加していると予想される。それぞれの細胞でHO-1/HO-2の発現を制御することにより神経障害を抑制し、鎮痛効果を発揮できる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛およびガバペンチノイドの鎮痛効果におけるヘム・オキシゲナーゼ-1 (HO-1)の役割を痛覚の伝導路において解明することである。具体的には以下について明らかとする。

(1) HO-1誘導薬であるcobalt protoporphyrin IX (CoPP)とCO放出物質であるCO-releasing molecule tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM-2)の鎮痛効果。

(2) CoPP/CORM-2によるガバペンチノイド(プレガバリン・ガバペンチン)の鎮痛効果への影響。

(3) HO-1阻害薬であるtin protoporphyrin IX (SnPP)によるガバペンチノイド(プレガバリン・ガバペンチン)の鎮痛効果への影響。

(4) CoPP/CORM-2による脊髄後角でのHOやCaチャンネル $\alpha 2$ サブユニット、炎症型M1ミクログリアマーカー、抗炎症型M2ミクログリアマーカー、アストロサイトマーカーmRNA発現量への影響。

(5) ガバペンチノイド(プレガバリン・ガバペンチン)による脊髄後角でのHOやCaチャンネル $\alpha 2$ サブユニット、炎症型M1ミクログリアマーカー、抗炎症型M2ミクログリアマーカー、アストロサイトマーカーmRNA発現量への影響。および、SnPPによるガバペンチノイドのmRNA発現作用への影響。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経障害性疼痛モデルの作成

8-10週齢の雄性C57BL6マウスを使用した。坐骨神経のSpared Nerve Injury (SNI)により神経障害性疼痛を発生させた。これは坐骨神経3分枝のうち、総腓骨神経・脛骨神経を結紮切離し腓腹神経のみ温存することで腓腹神経領域に神経障害性疼痛を生じさせるモデルである。イソフルラン麻酔下に、大腿部を切開し総腓骨神経・脛骨神経を結紮切離し腓腹神経のみ温存。筋膜と皮膚を6-0絹糸で縫合した。

#### (2) 疼痛反応の評価

疼痛反応は、von Frey filament (0.008-2.0 g)による機械的刺激に対する逃避行動(後肢を挙げる)により評価した。足底の損傷を防ぐために、2.0gをカットオフ値とした。マウスの後肢足底にfilamentを少し曲がるまで押し付け逃避行動を観察した。この操作を5回繰り返し3回以上逃避反応がある最も小さい値を機械的閾値とした。薬剤の効果はMaximum Possible Effect (MPE, %)で判定した。 $MPE = (\text{薬剤投与後機械的閾値} - \text{ベースライン機械的閾値}) \div (\text{カットオフ値} - \text{ベースライン機械的閾値}) \times 100$ として計算を行った。

#### (3) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

深麻酔下に心臓切開を行い、マウスを安楽死させた。L3-4の脊髄後角を採取した。Sepasol reagentを用いてRNAを抽出し、High-Capacity RNA-to-cDNA Kitを用いてcDNAを合成した。TaqMan Fast Advanced Master MixとABI Prism StepOnePlus Real-Time PCR Systemを用いてmRNAの測定を行った。

#### (4) 試薬および投与方法

SNIから7日後にCoPP (1, 3, 10 mg/kg)とCORM-2 (1, 3, 10 mg/kg)、SnPP (13, 10 mg/kg)をそれぞれ腹腔内投与した。プレガバリン (3, 10, 30 mg/kg)、ガバペンチン (3, 10, 30 mg/kg)も腹腔内投与した。試薬投与30分後から6時間後まで機械的閾値を測定した。

#### (5) 統計分析

結果はMean  $\pm$  SEMで表示した。群間比較はANOVAで行い、Tukey法で各群の差を検討した(Graphpad Prism 7.0)。P値0.05未満を有意とした。

### 4. 研究成果

(1) CoPPおよびCORM-2は容量非依存的にSNIによる機械的閾値を上昇させた。SnPPはSNIによる機械的閾値へ影響を与えなかった。

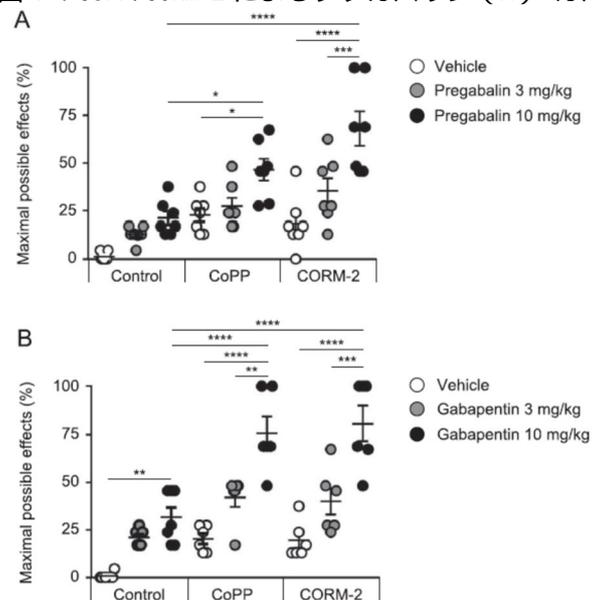
表1. CoPPおよびCORM-2、SnPPの機械的閾値への影響

Treatments	Dose, mg/kg	Maximal possible effects, %
Vehicle	—	2.7 ± 2.5
CoPP	1	6.3 ± 6.4
CoPP	3	22.8 ± 9.0***††
CoPP	10	24.3 ± 8.7****†††
Vehicle	—	1.7 ± 2.4
CORM-2	1	11.8 ± 7.5
CORM-2	3	21.0 ± 12.9**
CORM-2	10	20.4 ± 11.2**
Vehicle	—	2.0 ± 2.5
SnPP	3	1.3 ± 2.3
SnPP	10	2.0 ± 2.5

\*\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\*\* $P < 0.0001$  vs respective vehicle; †† $P < 0.01$ , ††† $P < 0.001$  vs CoPP 1 mg/kg, 1-way ANOVA followed by the Tukey multiple comparison test,  $n = 7-8$ .  
ANOVA, analysis of variance; CoPP, cobalt protoporphyrin IX; CORM-2, tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer; SnPP, tin protoporphyrin IX; SNI, spared nerve injury.

(2) CoPP (3 mg/kg)およびCORM-2 (3 mg/kg)はそれぞれプレガバリン (10 mg/kg) およびガバペンチン (10 mg/kg) の機械的閾値上昇を強化した。

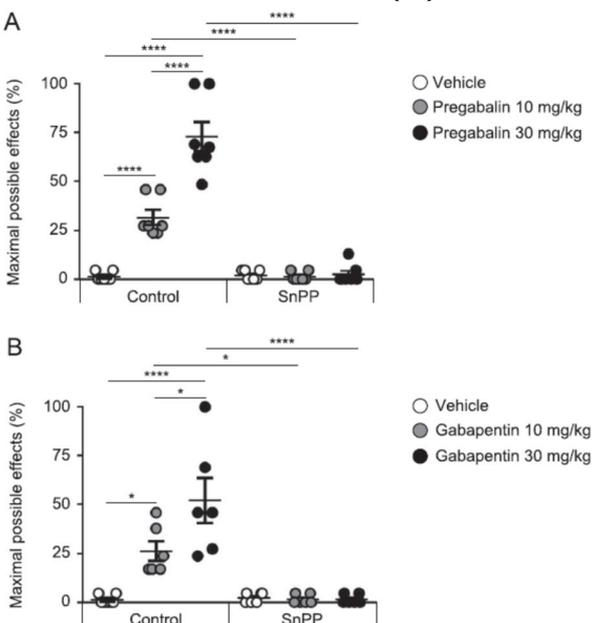
図1. CoPP/CORM-2によるプレガバリン (A)・ガバペンチン (B) の鎮痛効果への影響



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparison test,  $n = 6-7$ .

(3) SnPP (10 mg/kg)はプレガバリン (10, 30 mg/kg) およびガバペンチン (10, 30 mg/kg) の機械的閾値上昇を抑制した。

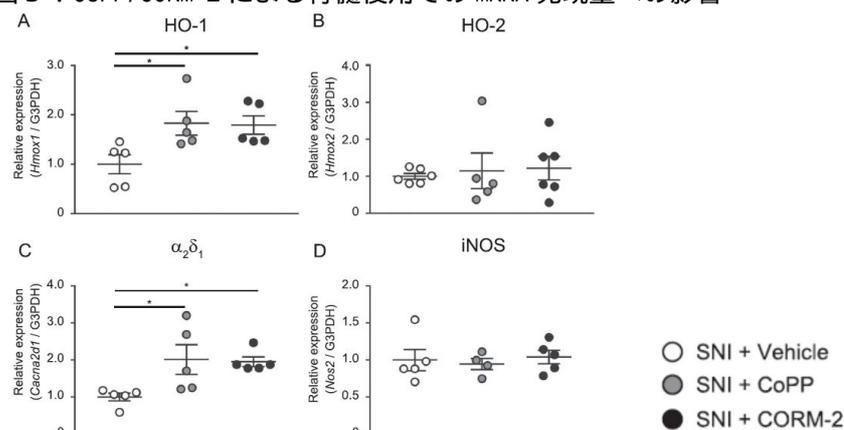
図2. SnPPによるプレガバリン (A)・ガバペンチン (B) の鎮痛効果への影響



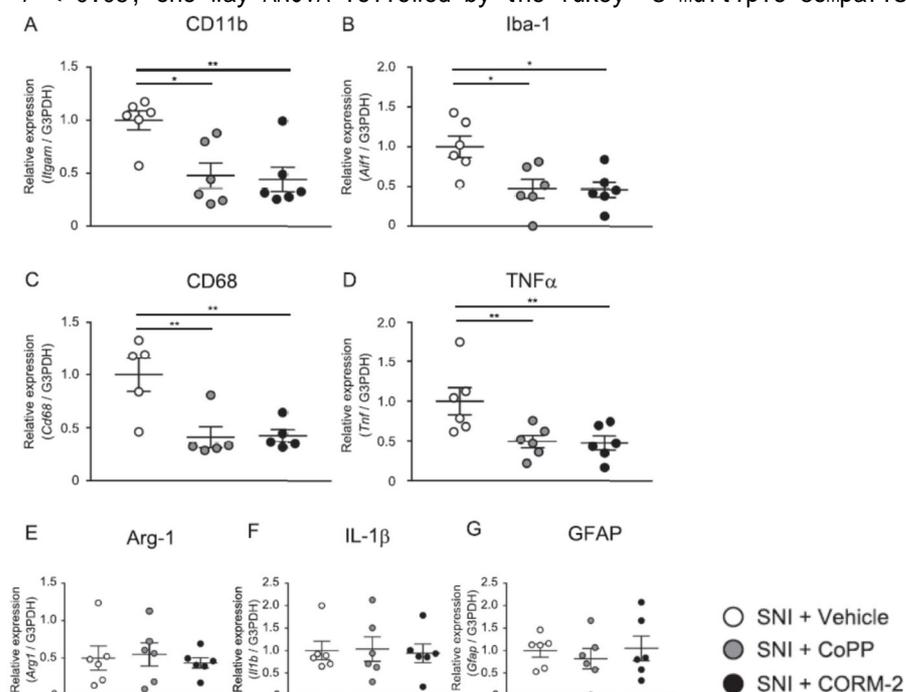
\* $P < 0.05$ , \*\*\*\* $P < 0.0001$ , one-way ANOVA followed by the Tukey 's multiple comparison test,  $n = 6-7$ .

(4) CoPP (3 mg/kg)およびCORM-2 (3 mg/kg)はそれぞれ脊髄後角でHO-1とCaチャンネル 2サブユニットのmRNA発現を誘導した。またCoPP (3 mg/kg)およびCORM-2 (3 mg/kg)はそれぞれ脊髄後角でミクログリアマーカー (CD11b, Iba-1), M1ミクログリアマーカー (Cd68), TNF- $\alpha$ のmRNA発現を減少させた。

図3 . CoPP/CORM-2による脊髄後角でのmRNA発現量への影響



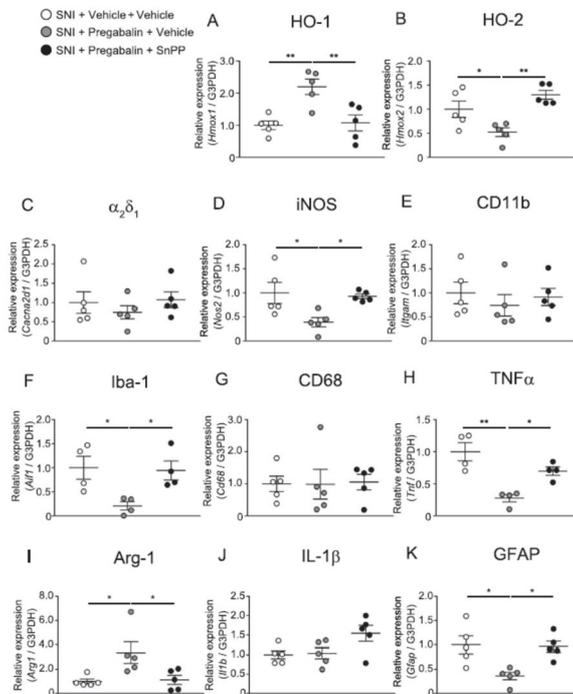
\* $P < 0.05$ , one-way ANOVA followed by the Tukey 's multiple comparison test,  $n = 4-6$ .



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA followed by the Tukey 's multiple comparison test,  $n = 5-6$ .

(5) プレガバリン (3 mg/kg)は脊髄後角でHO-1, M2ミクログリアマーカー (Arg) mRNA発現を増加させ、ミクログリアマーカー (Iba-1), M1ミクログリアマーカー (iNOS), TNF- $\alpha$ , アストロサイトマーカー (GFAP)のmRNA発現を減少させた。その変化はSnPP (10m/kg)の投与で消失した。

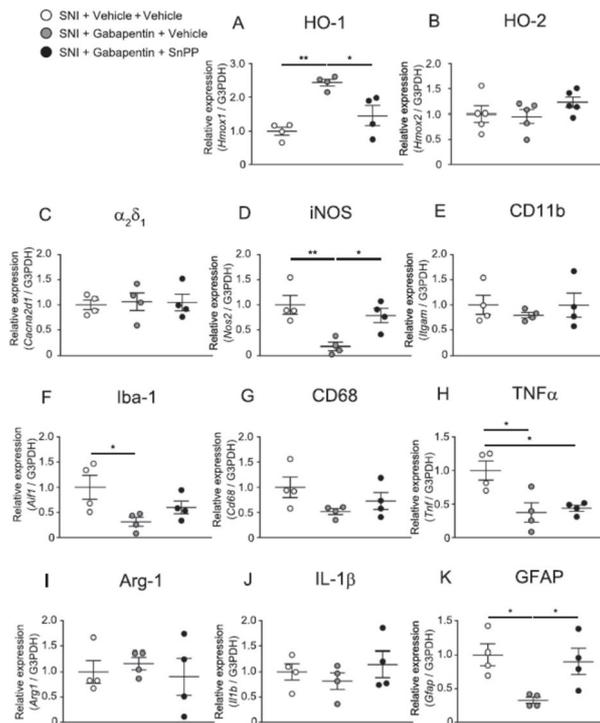
図4 . プレガバリン単独投与とSnPP同時投与による脊髄後角でのmRNA発現量への影響



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA followed by the Tukey 's multiple comparison test,  $n = 4-5$ .

(5) ガバペンチン (3 mg/kg) は脊髄後角で HO-1 mRNA 発現を増加させ、M1 ミクログリアマーカー (iNOS), アストロサイトマーカー (GFAP) の mRNA 発現を減少させた。その変化は SnPP (10m/kg) の投与で消失した。

図5. ガバペンチン単独投与と SnPP 同時投与による脊髄後角での mRNA 発現量への影響



\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , one-way ANOVA followed by the Tukey 's multiple comparison test,  $n = 4-5$ .

以上、HO-1 が脊髄後角において神経障害性疼痛抑制作用を有すること。また神経障害性疼痛治療薬ガバペンチノイドの鎮痛効果に HO-1 が関与していることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Godai Kohei, Kanmura Yuichi	4. 巻 3
2. 論文標題 Heme oxygenase-1 inducer and carbon monoxide-releasing molecule enhance the effects of gabapentinoids by modulating glial activation during neuropathic pain in mice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PAIN Reports	6. 最初と最後の頁 e677 ~ e677
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="http://dx.doi.org/10.1097/PR9.0000000000000677">http://dx.doi.org/10.1097/PR9.0000000000000677</a>	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 五代幸平、上村裕一
2. 発表標題 神経障害性疼痛に対するプレガバリンの鎮痛効果におけるヘム・オキシゲナーゼの役割：マウスで検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 K. Godai, T. Shimizu, Y. Oe, K. Sai, A. Yoshida, T. Saito, K. Onitsuka, Y. Kanmura
2. 発表標題 The Role of Heme-oxygenase on Analgesic Effects of Gabapentin in Neuropathic Pain Mouse Model
3. 学会等名 Anesthesiology 2018, The annual meeting of American Society of Anesthesiologists (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 五代幸平、上村裕一
2. 発表標題 バベンチンの神経障害性痛抑制効果にはヘム・オキシゲナーゼが重要である：マウスでの検討
3. 学会等名 日本ペインクリニック学会第53回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 K. Godai
2. 発表標題 Calcium channel $\alpha_2\delta$ ligands, from basic research to clinical applications
3. 学会等名 37th scientific meeting of The Pain Society of Busan Ulsan Kyungnam Pain Society Meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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