

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006 年～2009 年

課題番号：18613015

研究課題名（和文） 脊髄疼痛制御機構におけるノシセプチンの相反性二重作用の解明

研究課題名（英文） Study for reciprocal double effects of nociceptin on spinal pain transmission.

研究代表者 渡辺 千寿子（WATANABE CHIZUKO）

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90296020

研究成果の概要（和文）

脊髄疼痛制御機構における nociceptin をはじめとする様々な神経伝達物質の関与を検討した結果、substance P、glutamate の他に新たに nociceptin、histamine、hemokinin、内因性 cannabinoid、内因性 polyamine も脊髄疼痛伝達に関与していることが明らかとなり、種々の神経伝達物質含有神経の相互制御により脊髄疼痛伝達が行われていることが明らかとなった。また、神経障害性疼痛時にはこれら神経伝達物質の感受性亢進が生じていることも明らかとなった。

研究成果の概要（英文）

The involvement of various neurotransmitters on spinal pain transmission was investigated in this project. As the results, it was found that nociceptin, hemokinin, histamine, endogenous cannabinoid, endogenous polyamine, as well as substance P and glutamate, participated on spinal pain transmission, and the spinal pain transmission was regulated by the mutual control of these neurotransmitter-containing neurons. In addition, it was also found that the supersensitivity of these neurotransmitters was occurred at the stage of the neuropathic pain to increase the pain sensation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,300,000	0	1,300,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	600,000	180,000	780,000
総計	3,600,000	690,000	4,290,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ノシセプチン、疼痛伝達、鎮痛作用、神経制御、脊髄

1. 研究開始当初の背景

Nociceptin は、17 個のアミノ酸からなる内因性オピオイドペプチドであり、opioid receptor like-1 (ORL-1) 受容体の内因性リガンドとして知られている。興味深いことに nociceptin は、脳室内投与および脊髄くも膜下腔内投与のいずれにおいても、鎮痛作用および発痛作用といった相反する作用を発現することが報告されている。この現象は、nociceptin が脳内や脊髄の複数の神経ネットワークの中で、疼痛伝達ならびに疼痛制御に関わる神経伝達物質として複合的に働いていることを示している。また、nociceptin のマウスへの脊髄くも膜下腔内投与により誘発される疼痛関連行動は、nociceptin の代謝物である nociceptin(1-7)、nociceptin(1-9)、nociceptin(1-13) の併用により完全に抑制され、nociceptin を介した脊髄疼痛伝達には nociceptin 代謝物による抑制的制御機構が存在することが報告されているが、知覚受容器において侵害刺激を感じしてから nociceptin が遊離されるまでの過程、ならびに遊離した nociceptin による様々な神経系の活性化機構など nociceptin を介した脊髄疼痛伝達機構、特に各種神経系との相互制御に関する詳細については未だ不明である。

2. 研究の目的

本研究において、(1) nociceptin を介した疼痛伝達機構について各種神経系による相互制御を含め解明する、(2) nociceptin 代謝物による nociceptin 誘発疼痛関連行動の抑制的制御が、疼痛伝達神経経路のどの部位で行われているかを解明する、(3) 神経障害性疼痛の形成・維持に対する内因性 nociceptin およびその代謝物の関与を解明することにより、nociceptin および ORL-1 受容体の関連薬物が神経障害性疼痛の予防薬ならびに治療薬となり得る可能性を模索する。

3. 研究の方法

(1) nociceptin を介した疼痛伝達機構について解明するため、脊髄疼痛伝達に関わる神経系の作動薬および拮抗薬を用い、脊髄くも膜下腔内投与により発現する疼痛関連行動を指標に、疼痛伝達における各種神経系の相互制御を解明する。さらに各神経系の神経伝達物質およびその受容体の選択的抗体を用い、受容体と神経伝達物質の共分布をもとに各神経系の相互制御を免疫学的組織染色法により証明する、(2) nociceptin 代謝物による nociceptin 誘発疼痛関連行動の抑制的制御が疼痛伝達神経経路のどの部位で行われているかを解明するため、各神経系の神経伝達物質を脊髄くも膜下腔内へ投与することにより誘発される疼痛関連行動に対する nociceptin 代謝物の効果を検討することにより、nociceptin 代謝物の作用点となる受容体を検索する。さらに検索された受容体に nociceptin 代謝物が実際に結合することを、受容体結合実験および G 蛋白結合実験により確認する。また最終的に、疼痛伝達神経経路上に存在する nociceptin 代謝物の作用点より下流の神経系からの神経伝達物質の遊離が、nociceptin 代謝物により実際に抑制されることを酵素免疫定量法により確認する、

(3) 神経障害性疼痛の形成・維持に対する内因性 nociceptin およびその代謝物の関与について検討するため、坐骨神経結紮モデル (Seltzer モデル) を使用し神経障害性疼痛の形成期・維持期における nociceptin 神経系の変化を免疫学的組織染色法により検討する。また、内因性 nociceptin 遊離量の変化およびその代謝物量の変化を、酵素免疫定量法により測定し、さらに神経障害性疼痛形成期および維持期における、脊髄後角ならびに脊髄後根節の ORL-1 受容体 mRNA 量の変化を RT-PCR 法により検討する。

4. 研究成果

(1) ① nociceptin の脊髄くも膜下腔内投与により誘発される疼痛関連行動の発現には、GABA 神経上に存在する ORL-1 受容体の活

性を介した脱抑制による histamine 神経系の活性化と、それに伴う substance P および glutamate の遊離増加が関与する、② hemokinin の脊髄くも膜下腔内投与により substance P 様の疼痛関連行動が発現することを見出し、さらにその発現機構は投与用量により異なる、③cannabinoid 受容体拮抗薬により疼痛関連行動が発現することから、内因性 cannabinoid もまた脊髄における疼痛制御物質である可能性がある、④内因性 polyamine である spermidine により疼痛関連行動が発現し、その発現には histamine 神経系は関与せず、一次知覚神経およびグリア細胞からの substance P や glutamate の遊離が関与する、⑤高用量の histamine を脊髄くも膜下腔内へ投与することにより誘発される疼痛関連行動は、グリア細胞に存在する NMDA 受容体を介して発現するが、低用量の histamine により誘発される疼痛関連行動は一次知覚神経上に存在する histamine H₁ 受容体を介して発現する、⑥histamine H₂ 受容体拮抗薬である cimetidine の脊髄くも膜下腔内投与により疼痛関連行動が発現することを見出し、その発現は histamine、substance P あるいは glutamate 等の神経伝達物質の遊離を介するものではなく、二次神経上に存在する histamine H₁ 受容体あるいは NMDA 受容体の直接的な活性化を介して発現することを明らかにした。これらの結果から、一次知覚神経・脊髄系には上記を含む多数の神経伝達物質含有神経が存在し、それらが複雑に相互制御し合うことにより疼痛刺激を伝達していることが明らかとなった。

(2)① nociceptin の N 末端代謝物である nociceptin (1-7)、nociceptin (1-9) および nociceptin (1-13) は、nociceptin 誘発疼痛関連行動を有意に抑制し、さらにこれら N 末端代謝物は substance P および NMDA 誘発疼痛関連行動に対して何ら影響を与えない、② nociceptin の C 末端代謝物である nociceptin (14-17) は、ORL-1 受容体を直接刺激するのではなく、間接的に nociceptin の遊離を誘発することにより疼痛関連行動

を発現する、③nociceptin の C 末端代謝物である nociceptin (12-17) および nociceptin (13-17) は histamine H₁ 受容体を直接的に刺激することによって疼痛関連行動を発現することを明らかにした。これらの結果から、内因性ペプチドの代謝物が何らかの機構により元ペプチドの反応を抑制するといったホモローガスなネガティブフィードバック機構と、内因性ペプチドの代謝物が何らかの機構により元ペプチドの遊離を誘発するといったホモローガスなポジティブフィードバック機構、さらには内因性ペプチドの代謝物が神経支配上において下流に存在する神経上の他の受容体に作用するといったヘテローガスなポジティブフィードバック機構の3種類の制御機構が生体内には存在することが明らかとなった。

(3)神経障害性疼痛モデルマウス (Seltzer モデル)においては、nociceptin や histamine などの疼痛伝達物質に対する感受性が亢進しており、正常マウスでは反応を示さない極めて低用量の脊髄くも膜下腔内投与によっても疼痛関連行動が発現し、その発現には histamine 神経系は関与せず、グリア細胞の NMDA 受容体が関与することから、神経障害性疼痛時には一次知覚神経・脊髄系の疼痛伝達経路に機能変化が生じていることが明らかとなった。実際に、Seltzer モデルを使用し神経障害性疼痛の形成期・維持期における nociceptin 神経系の変化を免疫学的組織染色法により検討を行った結果、神経損傷側の脊髄後角において nociceptin の分布量の増加が認められた。

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6件)

- (1) Characterization of intrathecally administered hemokinin-1-induced nociceptive behaviors in mice.

Chizuko Watanabe, Hirokazu Mizoguchi,

- Akihiko Yonezawa, Shinobu Sakurada, Peptide, (in press) 査読 ; 有
- (2) New therapy for neuropathic pain. Hirokazu Mizoguchi, Chizuko Watanabe, Akihiko Yonezawa, Shinobu Sakurada, Int. Rev. Neurobiol., 85, p.249-260 (2009) 査読 ; 有
- (3) Intrathecal high-dose histamine induces spinally-mediated behavioral response through a polyamine site of NMDA receptors. Chizuko Watanabe, Tohru Orito, Hiroyuki Watanabe, Hirokazu Mizoguchi, Akihiko Yonezawa, Kazuhiko Yanai, Jalal I. Mobarakeh, Kenji Onodera, Tsukasa Sakurada, Shinobu Sakurada, Eur. J. Pharmacol., 581, p.54-63 (2008) 査読 ; 有
- (4) Possible involvement of endogenous nociceptin/orphanin FQ in the pain-related behavioral responses induced by its own metabolite, nociceptin/orphaninFQ(14-17). Hiroyuki Watanabe, Hirokazu Mizoguchi, Tohru Orito, Sou Katsuyama, Akihiko Yonezawa, Chizuko Watanabe, Tsukasa Sakurada, Shinobu Sakurada, Peptides, 28, p.670-677 (2007) 査読 ; 有
- (5) Enhanced antinociceptive effects of morphine in histamine H₂ receptor gene knockout mice. Jalal I. Mobarakeh, Kazuhiro Takahashi, Shinobu Sakurada, Atsuo Kuramasu, Kazuhiko Yanai, Neuropharmacology, 51, p.612-622 (2006) 査読 ; 有

[学会発表] (計 22 件)

- (1) 瀧澤 裕 ; 脊髄 cimetidine 誘発性疼痛関連行動の発現機構に関する行動薬理的検討、第 13 回日本ヒスタミン学会、2009 年 10 月、仙台
- (2) 円子 颯子 ; 神経損傷モデルにおけるヒ

- スタミン誘発疼痛関連行動に及ぼすトランスグルタミンナーゼの影響、第 13 回日本ヒスタミン学会、2009 年 10 月、仙台
- (3) 瀧澤 裕 ; Spermidine 誘発性疼痛関連行動の発現機序に関する行動薬理的検討、第 4 回東北薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム、2009 年 5 月、仙台
- (4) 齋藤 真奈美 ; スペルミジン誘発性疼痛関連行動の発現機序に関する行動薬理的検討、第 18 回神経行動薬理若手研究者のつどい、2009 年 3 月、横浜
- (5) 加藤 慧 ; Nociceptin(12-17)の脊髄くも膜下腔内投与誘発性疼痛関連行動の発現機構、第 18 回神経行動薬理若手研究者のつどい、2009 年 3 月、横浜
- (6) 勝山 壮 ; Cannabinoid₁ (CB₁)受容体拮抗薬の脊髄くも膜下腔内投与は疼痛関連行動を誘発する、日本薬学会第 129 会、2009 年 3 月、京都
- (7) 齋藤 真奈美 ; スペルミジン誘発性疼痛関連行動の発現機序について、第 114 回日本薬理学会近畿部会、2008 年 11 月、神戸
- (8) 加藤 慧 ; ノシセプチン代謝物ノシセプチン(12-17)の脊髄くも膜下腔内投与誘発性疼痛関連行動発現機構、第 12 回日本ヒスタミン学会、2008 年 10 月、徳島
- (9) 神経障害性疼痛モデルにおける histamine 誘発性疼痛関連行動の発現機構、第 3 回東北薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム、2008 年 6 月、仙台
- (10) 小林 悠佳 ; 神経障害性疼痛モデルマウスの痛覚過敏発現における疼痛関連行動におけるヒスタミンの役割、第 11 回日本ヒスタミン学会、2007 年 12 月、富山
- (11) 長岡 高史 ; CB₂受容体拮抗薬の脊髄くも膜下腔内投与による疼痛関連行動の発現について、第 112 回日本薬理学会近畿部会、2007 年 11 月、札幌
- (12) 折戸 融 ; 高用量ヒスタミン脊髄クモ膜下腔内投与誘発性疼痛関連行動における NMDA 受容体の関与について、第 46 回日本薬学会東北支部大会、2007 年 10 月、仙台
- (13) 長岡 高史 ; CB₁受容体拮抗薬の脊髄く

も膜下腔内投与による疼痛関連行動の発現について、第 28 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム、2007 年 8 月、札幌
(14) 小林 悠佳；神経損傷モデルにおけるヒスタミンの疼痛伝達機構、第 2 回東北薬科大学ハイテク・リサーチ・シンポジウム、2007 年 5 月、仙台

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 千寿子

東北薬科大学・薬学部・助教

研究者番号：90296020

(2) 研究分担者

櫻田 忍

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30075816

溝口 広一

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号：30360069