

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K08866

研究課題名（和文）認知症のリスクファクターとしての慢性疼痛におけるサブスタンスPの役割

研究課題名（英文）Role of Substance P in Chronic Pain as a Risk Factor for Dementia

研究代表者

山口 敬介（YAMAGUCHI, Keisuke）

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10338410

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：神経伝達物質であるサブスタンスPによる神経原性炎症に対し、抑肝散はニューロキニン1受容体を介するシグナル伝達への影響を有することが示された。特に、MAPKのうち、P38のリン酸化を抑制することにより、転写因子NF- $\kappa$ Bの核内移動を抑制し、その結果、IL-6、IL-8およびCOX-2などの炎症性メディエーターの産生を抑制することが明らかになった。以上より、抑肝散は、サブスタンスPに対する抗炎症作用により、認知症行動・心理症状を改善する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢者における慢性疼痛が将来的な認知症のリスクに関連するという報告から、慢性疼痛の適切な治療が認知症発症の予防になり得るといった発想に至った。慢性疼痛の多くが神経障害性疼痛に関連した難治性疼痛であり、薬物療法が治療の中心となる。高齢患者における薬物療法において、漢方薬は安全性の面からも比較的処方し易いと考えられているが、科学的根拠に基づいた研究は、これまでなかった。本研究結果から、漢方薬抑肝散は、サブスタンスPによる神経原性炎症に抗炎症的に作用することが明らかになり、慢性疼痛および認知症行動・心理症状改善のメカニズムの認知症治療法確立の足掛かりになることが期待された。

研究成果の概要（英文）：Yokukansan has been shown to have an effect on neurokinin 1 receptor-mediated signal transduction for neurogenic inflammation caused by the neurotransmitter substance P (SP). In particular, among MAPKs, by suppressing the phosphorylation of P38 MAPK, the transcription factor NF- $\kappa$ B is suppressed in the nucleus, resulting in the production of inflammatory mediators such as IL-6, IL-8, and COX-2. It was suggested that yokukansan may improve dementia behavioral and psychological symptoms by its anti-inflammatory effect on SP.

研究分野：疼痛学、麻酔科学

キーワード：高齢者 認知症 サブスタンスP 神経原性炎症 抗炎症作用 慢性疼痛 抑肝散

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において、超高齢社会の到来とともにアルツハイマー型認知症(以下 AD)をはじめとした認知症患者数は増加の一途をたどり、その対策は医学的課題であるだけでなく、社会的重要な課題の一つである。また、認知症治療においては、中核症状である認知機能障害の治療のみならず、行動・心理症状(behavioral and psychological symptoms of dementia; 以下 BPSD)の改善による精神的安定や QOL の確保も必須の課題である。

一方、高齢者の約 30%が何らかの慢性疼痛を有すると言われ、加齢により有訴率も増加することが知られている。高齢者の慢性疼痛は治療抵抗性であることも多く、最近の研究では、転倒、運動機能障害、認知機能低下などの老人性症候群との関連が報告されている。さらに、中等度から重度の慢性疼痛は、高齢者の認知機能低下の加速および認知症発症のリスク増大に関連することが示され、慢性疼痛を有する患者では、認知症発症や身体的衰弱のリスクが高まる可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

近年、全身性炎症の免疫応答の結果、中枢神経系(以下 CNS)にも炎症が惹起され、神経原性炎症が神経変性疾患の発症や認知機能障害の進行に関与する可能性を示すエビデンスが得られつつある。また、慢性疼痛における神経障害過程や、AD における神経変性において神経原性炎症が発症プロセスに大きく関わることが知られている。中でもグリア細胞の活性化が疼痛の慢性化に関係し、活性化されたミクログリアとアストロサイトが、サイトカインをはじめとした炎症メディエーターを産生することにより、認知機能を低下させることが報告されている。

神経伝達物質サブスタンス P(以下 SP)は、ニューロンに発現し、その受容体であるニューロキニン 1(以下 NK1)受容体は CNS に広く分布している。SP が疼痛や炎症惹起と強く関連していることがこれまで報告されており、AD 患者の髄液中の SP 濃度が上昇していることや、SP がミクログリアを活性化することからも、SP が神経原性炎症に深く関連していることが推察されている。

一方、漢方薬抑肝散は、AD を含む認知症患者の BPSD 治療や慢性疼痛治療に用いられており、高齢者診療ガイドライン(高齢者の安全な薬物療法ガイドライン 2015)にも記載されているが、詳細な作用メカニズムは不明のままである。

本研究では、アストロサイトーマ細胞株 U373MG を用い、NK1R を介するシグナル伝達系への抑肝散の効果を解明することにより、慢性疼痛および BPSD 治療法確立の足掛かりになることが期待された。

## 3. 研究の方法

### (1) NK1 受容体を介する細胞内情報伝達経路と抑肝散の影響についての検討

U373MG 細胞を用い、SP が MAP キナーゼ、特に ERK1/2 や P38 MAPK を活性化させることをウエスタンブロット(WB)法により測定する。

### (2) 抑肝散の炎症性サイトカイン産生抑制効果についての検討

SP 刺激によって惹起される炎症性サイトカインの発現・産生を定量する。さらに抑肝散による発現への影響を検討する。

### (3) 抑肝散の炎症性転写因子 NF- $\kappa$ B 活性化抑制効果についての検討

同様に、SP 刺激によって惹起される NF- $\kappa$ B のリン酸化を、WB 法を用いて測定する。さらに抑肝散による発現への影響を検討する。

以上より、抑肝散による BPSD 改善効果のメカニズムを、分子レベルで解析することにより、認知症の治療方法の安全かつ有効な治療方法を確立することを目的とした。

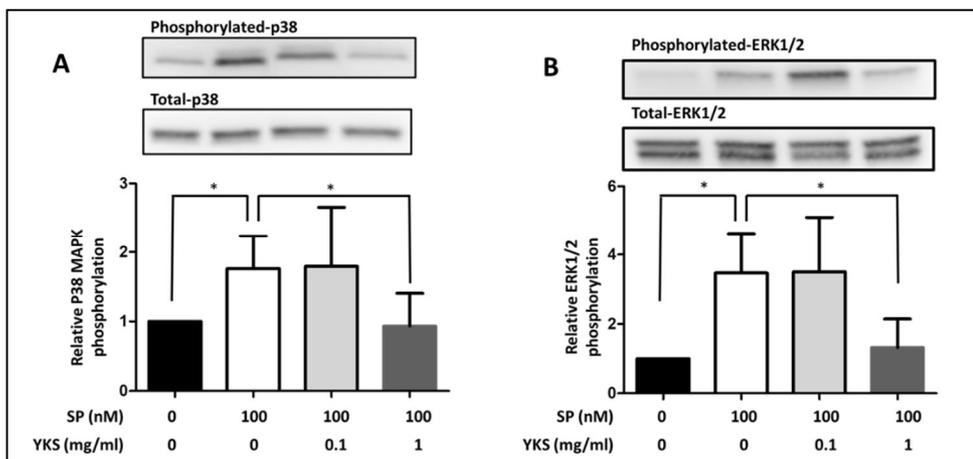
#### 4. 研究成果

(1)初めに、NK1R を介した P38 MAPK のリン酸化および ERK に対する抑肝散の影響を検討した。

U373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml 抑肝散で前処理した後、100 nM SP で 10 分刺激した。反応停止後、細胞を回収し、電気泳動後にウエスタンブロット法で A; リン酸化 P38 MAPK および B;リン酸化 ERK1/2 を検出した。ストリッピング後、A;全 P38MAPK および B; 全 ERK1/2,を検出し、コントロールとの割合を比較した。その結果、

A; 抑肝散(1.0 mg/ml)は、SP (100nM)による p38 のリン酸を抑制した。

B; 抑肝散(1.0 mg/ml)は、SP (100nM)による ERK1/2 のリン酸を部分的に抑制した。



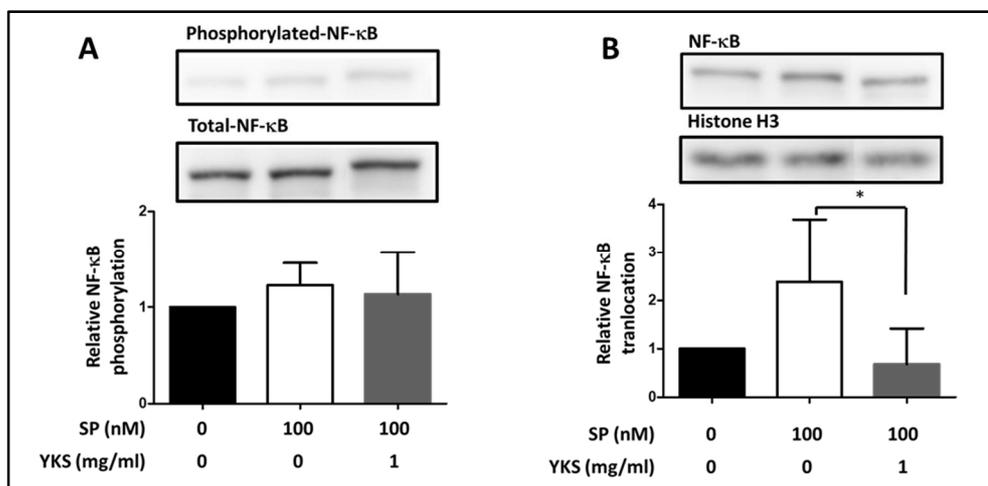
以上より、U373MG 細胞において、NK1R を介した MAPK 経路の活性化は、特に P38 MAPK において、抑肝散によって抑制されることが分かった。

(2)次に、NK1 受容体を介した NF- $\kappa$ B のリン酸化および NF- $\kappa$ B の核内移動に対する抑肝散の影響を検討した。

U373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、1.0 mg/ml 抑肝散で前処理した後、100 nM SP で 10 分刺激した。反応停止後、細胞を回収し、電気泳動後に WB 法で A;リン酸化 NF- $\kappa$ B を、B;核内移動を検出した。ストリッピング後、A;全 NF- $\kappa$ B を、B;ヒストン H3 を検出し、コントロールと比較した。その結果、

A; 1.0 mg/ml 抑肝散は、SP (100nM)による NF- $\kappa$ B のリン酸化を部分的に抑制した。

B; 1.0 mg/ml 抑肝散は、SP (100nM)による NF- $\kappa$ B の核内移動を抑制した。



以上より、U373MG 細胞において、NK1 受容体を介した NF- $\kappa$ B の活性化は、抑肝散によって抑制されること、さらに、NF- $\kappa$ B の細胞膜から核内への移動が、抑肝散によって抑制されることが分かった。

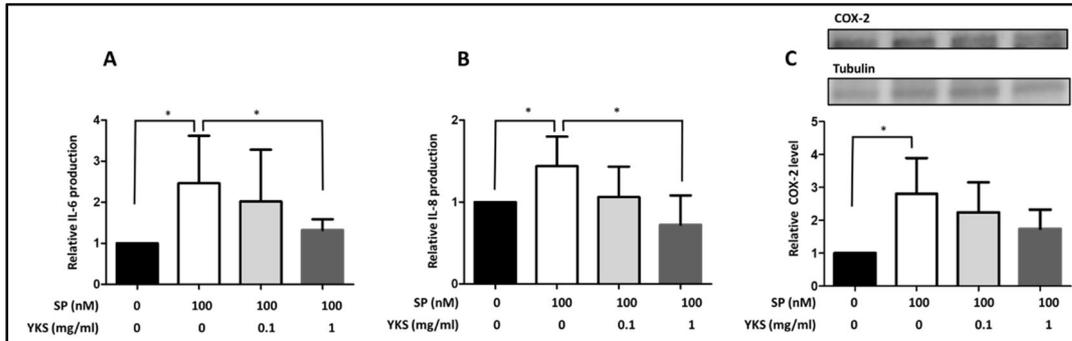
(3) 次に、NK1 受容体を介した IL-6 ,IL-8 産生および COX-2 発現に対する抑肝散の影響を検討した。

373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、0.1 mg/ml, 1.0 mg/ml 抑肝散で全処理した後、100 nM SP で 24 時間刺激した。培養液を回収し、培養液中の IL-6 と IL-8 の産生を ELISA 法で検出した。また、COX-2 の発現を WB 法で検出した。その結果、

A; 1.0 mg/ml 抑肝散は、SP (100nM)による IL-6 の産生を有意に抑制した。

B; 1.0 mg/ml 抑肝散は、SP (100nM)による IL-8 の産生を有意に抑制した。

C; 1.0 mg/ml 抑肝散は、SP (100nM)による COX-2 の発現を抑制した。



以上より、U373MG 細胞において、SP 受容体を介した IL-6、IL-8 の産生および COX-2 の発現は、抑肝散によって抑制されることが分かった。

本研究により、抑肝散は NK1 受容体を介するシグナル伝達への影響を有することが示された。特に、MAPK のうち、P38 のリン酸化を抑制することにより、転写因子 NF- $\kappa$ B の核内移動を抑制し、その結果、IL-6,IL-8 および COX-2 などの炎症性メディエーターの産生を抑制することが明らかになった。以上より、抑肝散は、SP に対する抗炎症作用により、BPSD を改善する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 M Yamaguch, K Yamada, M Iseki, Y Karasawa, Y Murakam, T Enomoto, N Kikuchi, S Chiba, A Hara, K Yamaguch, E Inada	4. 巻 15(4)
2. 論文標題 Insomnia and caregiver burden in chronic pain patients: A cross-sectional clinical study.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0230933.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0230933	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 該当する

1. 著者名 C Akiba, H Bandai, Y Ito, T Maeda, k Yamaguchi, M Nakajima, M Miyajim	4. 巻 20
2. 論文標題 Cerebrospinal fluid leak presented with the C1-C2 sign caused by spinal canal stenosis: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMC Neurol	6. 最初と最後の頁 151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 該当する

1. 著者名 Yamaguchi K, Yamazaki S, Kumakura S, Someya A, Iseki M, Inada E, Nagaoka I.	4. 巻 -
2. 論文標題 Yokukansan, a Japanese Herbal Medicine, suppresses Substance P-induced Production of Interleukin-6 and Interleukin-8 by Human U373 MG Glioblastoma Astrocytoma Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Endocr Metab Immune Disord Drug Targets.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1871530320666200131103733.	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 該当する

〔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 山口敬介, 飯田史絵, 斎藤貴幸, 田中英文, 中村かんな, 松本園子, 今井美奈
2. 発表標題 筋萎縮性側索硬化症の腰背部痛に対し脊髄刺激療法が有効であった一例
3. 学会等名 第40回日本臨床麻酔学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 今井美奈, 飯田史絵, 中村かんな, 山口敬介
2. 発表標題 両側慢性硬膜下血腫を伴う脳脊髄液漏出症に対し、RACzカテーテルを用いて自己血輸血を施行した1症例
3. 学会等名 第40回日本臨床麻酔学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石橋 千佳, 飯田 史絵, 前田 剛, 齋藤 貴幸, 田中 英文, 中村 かんな, 秋山 絢子, 今井 美奈, 萬代 秀樹, 高倉 朋和, 山口 敬介
2. 発表標題 胸髄損傷後慢性疼痛に対し、脊髄刺激療法を導入した1例
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 敬介, 齋藤 貴幸, 飯田 史絵, 石橋 千佳, 田中 英文, 前田 剛, 圓谷 直子, 井関 雅子
2. 発表標題 遷延性術後痛の臨床:現状とこれから APSからTransitional Pain Service(TPS)に繋げる時代へ
3. 学会等名 第40回日本疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口敬介
2. 発表標題 パーキンソン病に伴う腰痛に対して脊髄刺激療法が有効であった2例
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口敬介
2. 発表標題 パーキンソン病に伴う腰痛に対して脊髄刺激療法が有効であった2例
3. 学会等名 日本ニューロモデュレーション学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口敬介
2. 発表標題 抑肝散がサブスタンスPを介した COX発現に与える影響について
3. 学会等名 日本疼痛学会
4. 発表年 2018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
研究分担者	長岡 功  (NAGAOKA Isao)  (60164399)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授   (32620)	
研究分担者	井関 雅子  (ISEKI Masako)  (80221076)	順天堂大学・医学部・教授   (32620)	

	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
研究協力者	若林 彩子  (zIWAKABAYASHI Saiko)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------