

令和 2 年 5 月 12 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16471

研究課題名（和文）痛みの遷延化に関する内因性鎮痛機構の可塑的变化の解明

研究課題名（英文）Investigation of neuronal plasticity of endogenous analgesia related with pain chronification

研究代表者

須藤 貴史（SUTO, Takashi）

群馬大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60739621

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）：本研究はアデノ随伴ウイルスベクターを用いて人工リガンドにのみ反応する人工受容体を発現させ、神経活動を人為的に制御可能な状態とすることで、慢性痛状態での内因性鎮痛の変化を詳細に解明するものである。神経障害による慢性痛は内因性鎮痛機構を減弱させたが、内因性鎮痛のひとつを司る青斑核の活性化により鎮痛が観察された。特に脊髄後角で調節を行う青斑核細胞を興奮させると強い鎮痛が見られた。これは青斑核細胞の投射先により鎮痛に対する機能がことなることが示唆され、脊髄以外への投射する細胞群が痛みを発するように変化してい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

神経障害性疼痛に対する鎮痛薬は内因性鎮痛を活性化すること効果を示し、その効果は神経障害後の経過とともに減弱することが報告されている。本研究の結果と合わせると、鎮痛薬の全身投与は投射先を問わず青斑核を活性化させ、脊髄へ投射する細胞群が鎮痛を示すが、それ以外へ投射する細胞群がその鎮痛作用を打ち消している可能性を示唆する。これは鎮痛薬が効きにくくなるメカニズムのひとつである可能性がある。従来の鎮痛薬が無効な症例に対しても脊髄のノルアドレナリン増加は鎮痛に有効であるとともに、脳のノルアドレナリン量を調整することで減弱した鎮痛効果を回復できる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We examined the analgesic effects of artificial activation/inhibition of locus coeruleus using DREADD system in a rat model of neuropathic pain. Adeno associated virus (AAV) vectors were used to express artificial receptors, which only an artificial ligand called CNO can bind. We also used retrogradely infected AAVs to examine the roles of spinal projection from locus coeruleus. Our results suggested that spinal projection from locus coeruleus produce analgesia even in the chronic stage of neuropathic pain, however, brain projection may be antagonistic.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経障害性疼痛 内因性鎮痛 青斑核

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々の研究を含めたこれまでの研究では、代表的な慢性痛である神経障害性疼痛状態が長期化すると、カプサイシン皮下投与などの強い痛みにより誘発される内因性鎮痛が減弱することがわかっている(5)。カプサイシンによる痛み刺激は青斑核を刺激し、脊髄後角で NA を放出させ鎮痛に関与するが、慢性痛状態では青斑核の興奮が起こりにくい状態であることも報告している。カプサイシンを用いる方法は他の様々なシグナルにも影響するため、青斑核の NA 系のみの関与を理解するには不十分である。また、アミトリプチリン、デュロキセチンは減弱した内因性鎮痛を回復させるが(2,3)、これらの薬剤は急性の鎮痛作用を持つため内因性鎮痛の回復による鎮痛なのか、薬剤の直接の鎮痛作用なのか判別しにくい。内因性鎮痛のみを回復させ、直接の鎮痛作用を持たない化合物はこれまでに報告されていないため、直接的、選択的に青斑核 NA 神経を活性化させる手法が必要である。正常動物では青斑核を直接刺激すると鎮痛が起こることが報告されているが、慢性痛状態でも人為的な青斑核の興奮制御による NA 放出が鎮痛的に作用するのかについては解明されていない。様々な可塑的变化の結果、反応が異なる可能性がある。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛に有効とされる鎮痛薬は下行性抑制系を含めた内因性鎮痛機構を活性化することで鎮痛を示す可能性があるが、難治性の患者は内因性鎮痛の正常な経路が破綻しており、薬物による活性化効果を発揮できない可能性がある。鎮痛薬を投与することで内因性鎮痛を回復させて調査する場合、鎮痛薬の持つ直接の鎮痛効果のため、判断が難しい。光遺伝学的手法や薬理遺伝学的手法により直接青斑核を活性化することでノルアドレナリンを介する下行性抑制を直接調節可能である。これにより**青斑核の機能や内因性鎮痛を回復させることの意義をより詳細に検討可能**である。

青斑核が鎮痛作用の減弱にどのように関与しているのか解明し、難治性の慢性痛患者の治療効果を高めるための新規戦略としての可能性についても検討する。また、青斑核のノルアドレナリン系は中枢神経系に広く投射し、慢性痛でよく見られるうつ症状や認知機能の変化、睡眠などと密接に関係する可能性があるため、本研究の結果が**慢性痛の痛み以外の随伴症状の改善にもつながる可能性**がある。

3. 研究の方法

実験動物

ノルアドレナリンの合成酵素である Dopamine beta hydroxylase 存在下に Cre リコンビナーゼ発現するトランスジェニックラットを用いた。研究初年度は感染症のため搬入時期に遅れが生じたが、本年度は安定して飼育・繁殖が行えた。

神経障害性疼痛モデル作成

Chung らによる神経障害性疼痛モデルである spinal nerve ligation model (SNL) を用いた。背部皮膚を切開し、第 6 腰椎横突起を切除した後、L5-6 腰神経を結紮切離する。術後 6 週の段階で実験に用いた。Paw pressure test による逃避閾値の測定を行った。

青斑核の興奮制御

NA の合成酵素である Dopamine beta hydroxylase 存在下に Cre リコンビナーゼ発現するトランスジェニックラットを用いた。ステレオタキシクフレームを用いてラットを固定し、Cre 依存性にチャンネルロドプシンまたはハロロドプシンを発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを青斑核に注入した。実験の 1 週間前に青斑核に光刺激用の光ファイバー留置を試みたが試行段階でファイバーのズレや脱落が懸念されたため、薬理遺伝学的手法を用いた検討に変更した。人工受容体である hM_3D_q あるいは $hM4Di$ を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターを青斑核周囲へ投与しその 2 週間後から実験に用いた。実際の青斑核神経細胞の興奮制御は CNO (1mg/kg) の腹腔内投与により行った。CNO 投与前、投与 30 分おきに paw pressure test による逃避閾値の測定を行った。さらに、神経軸索周囲に投与することで逆行性に細胞体へ運ばれ、人工受容体を発現させる逆行性アデノ随伴ウイルスベクター (AAV2-Retro) を脊髄後角にマイクロピペットを用いた方法で投与し、脊髄に投射する青斑核細胞のみを制御した場合の疼痛行動についても観察した。

4. 研究成果

神経障害性疼痛モデル作成により 6 週間後でも術側の逃避閾値の低下が観察された。興奮性人工受容体を発現させた神経障害性疼痛モデルラットに CNO を投与すると、術側の逃避閾値は大幅に上昇するものと不変のものが観察された。ウイルスの青斑核への感染を確認した個体においても閾値が不変の場合があった。青斑核の細胞群は脊髄に投射する群と脳に投射し様々な機能を調節する群があり、どちらに強く受容体を発現させるかは今回の方法では制御しにくい。また脊髄、脳両方の投射先でノルアドレナリンが放出されたことで、総和として互いの変化を打ち消し合った可能性も否定できない。このため、本研究では逆行性アデノ随伴ウイルス

ベクターを脊髄後角へ投与し、脊髄後角へ投射する青斑核細胞群のみに人工受容体を発現させた実験も行った。この場合、脊髄に投射する細胞群を興奮させるとほぼ全例で神経障害による閾値の低下は回復し、正常よりも逃避閾値が上昇した。また、細胞群を抑制すると逃避閾値は僅かに低下した。このことから、青斑核細胞は通常の方法では活性化させにくい神経障害性疼痛モデル作成から6週後でもDREASSシステムを用いて人為的に興奮させることが可能であることが判明した。また、この経路の活性化はおおむね鎮痛的に働くことはわかった。つまり神経障害性疼痛モデル作成の慢性期における下行性抑制系機能の減弱はノルアドレナリン作動性神経そのものの変化というよりも興奮を引き起こすメカニズムに問題がある可能性が示唆される。たとえば、青斑核内のアストロサイトによる興奮性シグナルの増幅機能の減弱が考えられる。また、人為的にであっても下行性抑制系の活性化は鎮痛的に働くことから、この経路を活性化させる薬剤は疼痛抑制に重要であることが再確認させた。一方で、薬剤が効きにくいメカニズムに関しては解明すべき課題が残っている。これまでに青斑核活性化に伴うノルアドレナリンの増加は脊髄後角でアセチルコリンの増加をもたらし、それが鎮痛に関与することがわかっているが、今回の結果からは人為的な青斑核の活性化が脊髄においてアセチルコリンを増加させるかについてはわかっていない。現在実験の準備中である。一方、逆行性アデノ随伴ウイルスを前頭前野に投与することで前頭前野に投射する青斑核細胞のみを制御した上で、デュロキセチンの鎮痛効果を見た場合は鎮痛効果が変化することが観察された。現在実験数を増やして最終的な確認を行っている。脊髄でのノルアドレナリンの増加は鎮痛的、前頭前野での増加は時期によって役割が変化する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Takashi Suto, Daiki Kato, Hideaki Obata, Shigeru Saito
2. 発表標題 Attenuation of Analgesic Effect of Duloxetine in a Rat Model of Chronic Neuropathic Pain Involvement of cholinergic plasticity
3. 学会等名 World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤貴史、加藤大樹、齋藤繁
2. 発表標題 神経障害性疼痛モデルにおけるデュロキセチン鎮痛の減弱とアセチルコリンの関与
3. 学会等名 第40回 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
--	---------------------------	-----------------------	----