

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592421

研究課題名（和文）痛みの生物学に立脚した歯髄局所の疼痛緩和を目指す創薬アプローチ

研究課題名（英文）Potential pain-releasing action of PAF antagonists in neuropathic pain animal models and the mechanisms of action

研究代表者

本山 直世 (MOTOYAMA NAOYO)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70509661

研究成果の概要（和文）：

本研究において申請者らは、血小板活性化因子 (PAF) 受容体阻害薬や脊髄および三叉神経脊髄路核での PAF 受容体ノックダウンが、原因の異なる様々な疼痛モデルにおいて、長時間持続性で強力な鎮痛作用を示すことを明らかにした。

これらの成果は PAF 受容体阻害薬が各種疼痛疾患における有効な治療薬となる可能性を示すものである。PAF 受容体阻害薬は強力な抗炎症作用に鎮痛作用を併せ持つことが明らかとなり、歯髄炎や歯周組織の炎症に起因した疼痛の治療に有望な治療薬となる可能性が示された。PAF 受容体阻害薬は既存の鎮痛薬とは全く異なったメカニズムで作用しており、新規治療薬開発の基礎的基盤を与えるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

The present study elucidated the effectiveness of platelet-activating factor (PAF) antagonists against neuropathic pain in several different models of peripheral nerve injury and inserted them into the mechanism of anti-allodynia action. PAF antagonists by intravenous and oral administration have potent anti-allodynia action in mice with several different models of neuropathies. Also, PAF antagonists have potent anti-inflammatory and analgesic action in mice inflammatory pain models. Those effects were achieved with low doses and long lasting. Intrathecal injection of the PAF antagonists and siRNA against PAF receptor ameliorated allodynia. Together, these results suggest that PAF aggravates peripheral and spinal pronociceptive inflammatory responses and contributes to the pathogenesis of inflammatory and neuropathic pain. Regulation of PAF/PAF receptor system may be targets for future innovations for pathological pain management.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：保存治療学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：保存修復学，歯痛，アロディニア，神経障害性疼痛，難治性疼痛

## 1. 研究開始当初の背景

歯科臨床において最も多い主訴は痛みであり、非ステロイド性抗炎症薬(NSAIDs)を処方することが一般的である。しかしながら、NSAIDsには胃腸障害や消化管出血、腎性高血圧といった副作用や薬物相互作用が問題となっており、小児のインフルエンザ脳症を増悪させる可能性も指摘されている。喘息患者には禁忌である。近年、副作用が少ないシクロオキシゲナーゼ(COX-2)阻害薬が開発された。しかし、COX-2阻害薬にも心筋梗塞や脳梗塞の危険性を高めるとして循環器疾患患者や高齢者には慎重投与が必要である等の問題が生じている。一方、慢性炎症や知覚神経損傷時には、正常では痛みを起こさない刺激、例えば軽い触覚や冷たい刺激に対して痛み反応を生じるアロディニアと呼ばれる現象が生じる。アロディニアは、糖尿病、帯状疱疹、三叉神経痛などにおいてもみられる神経障害性疼痛の主症状であり、従来の鎮痛薬はあまり有効ではなく難治性で非常に長期間持続する。その発症機序は良く解かっていない。近年の社会環境の複雑さや超高齢化社会の到来に伴い、多種の薬剤を服用している基礎疾患保有患者や歯科恐怖症等のメンタル面で問題を抱えた患者が増加している。歯科診療における痛みのコントロールは今後ますます重要となる課題であり、新しい治療法、鎮痛薬の開発が待たれている。

この様な情勢の内、申請者らは種々の疼痛モデル動物において脊髄抑制性グリシン神経機能の賦活が強力な鎮痛効果を発揮すること、更に、炎症性メディエーターである血小板活性化因子(PAF)の脊髄腔内投与により低濃度で強力な疼痛反応を引起し、本作用にNO/cGMP系を介した抑制性脊髄グリシン受容体(GlyR)  $\alpha 3$  の機能変調(脱抑制)によることを明らかにし、PAFが種々の病態生理学的疼痛の発症に関係する可能性を示唆してきた。

## 2. 研究の目的

日々の歯科診療における歯痛、その90%以上は歯髄と歯周組織の炎症に起因する。歯髄刺激による疼痛には水酸化カルシウム製剤を従来通り裏層しているが、その効用については疑問が持たれている(Am. J. Dent. 2006)。近年のMinimal Interventionの概念により健全象牙質および歯髄保存が重要視されている。日常臨床で問題となる痛みに対して歯科医師は投薬を行うことで対処しており、一般的にNSAIDsが処方される。NSAIDsには種々の副作用や薬物相互作用など問題点が指摘されており、作用機序の異なった副作用の少ない新しい治療薬の開発が待たれている。

歯髄の可逆的保存治療には炎症歯髄の炎

症消退が不可欠である。炎症のメディエーターとして知られるPAFが、脊髄で抑制性グリシン神経機能に影響して疼痛のメディエーターとして重要な役割を果たす可能性を視野に、PAF阻害薬に焦点をあて、PAF阻害薬がGlyR  $\alpha 3$  機能の変調を解除し、グリシン神経伝達の賦活による鎮痛作用と抗炎症作用を併せ持つ、各種疼痛疾患の治療薬となりうる可能性を検討している。本研究の目的は、顎顔面領域の疼痛管理「特に歯髄炎」における治療法の開発と安全な新規鎮痛薬の開発を目指して、グリシン神経の賦活を標的とした顎顔面領域における疼痛治療戦略を構築し、PAF受容体阻害薬を新しい痛み治療に反映されることにある。これらにより歯髄の保存治療が可能になり、新しい歯科保存治療法開発に貢献できるものと考ええる。

## 3. 研究の方法

顎顔面領域における各種疼痛や歯髄の痛みを効果的に抑制する新しいタイプの治療法、治療薬の開発を目指し、顎関節炎モデル、神経障害性疼痛モデル、実験的歯髄炎モデルを用いて、PAF阻害薬の鎮痛作用を検討することにより歯科領域における疼痛療法への応用を試みる。

神経障害性疼痛モデルとしては坐骨神経部分結紮モデル、眼窩下神経および下歯槽神経、咬筋神経の部分結紮モデルおよび慢性絞扼性神経障害モデル、およびストレプトゾトシン(STZ)誘発有痛性糖尿病性神経損傷モデルを作製し、von Frey hear 刺激に対する逃避行動閾値より評価した。

慢性炎症性疼痛はComplete Freund Adjuvant (CFA)をマウス足蹠皮下投与して作製したCFAモデル、および顎関節腔内にCFAを注入して作製した顎関節炎モデルを使用し、von Frey hear 刺激に対する逃避行動閾値より評価した。

炎症性疼痛モデルとしてはホルマリンの足蹠皮下投与(ホルマリンテスト)或いは酢酸の腹腔内投与(酢酸ライジングテスト)による疼痛関連行動から評価した。

実験的歯髄炎モデルは歯髄を露髄しLPS或いはカプサイシンを貼付することで作製し、開口反射から評価した。

抗炎症試験はCFAの足蹠皮下投与による足浮腫即ち足甲幅の変化で評価した。

PAF阻害薬は嘗て喘息や炎症、血栓症等の予防または治療薬として開発された薬物で、第二相、第三相臨床試験まで実施され、ヒトでの安全性が確立されているTCV-309およびWEB2086を主に使用した。

#### 4. 研究成果

顎顔面領域の神経障害性疼痛においても、脊髄が中継する痛みと同様にグリシン神経機能の変調が疼痛の発症に重要な役割を果たしており、グリシントランスポーター(GlyT)阻害薬が有効であることを明らかにした。

PAF 受容体阻害薬を用い、各種病態生理学的疼痛モデルについて検討を行い以下の成果を得た。

(1) 選択的 PAF 阻害薬(BN50739, TCV-309, WEB2086)は坐骨神経部分結紮モデル, STZ 誘発有痛性糖尿病性ニューロパチーモデル, 下歯槽神経部分結紮モデル, 眼窩下神経絞扼性神経損傷モデルおよび眼窩下神経部分結紮モデル等の原因の異なる各種神経障害性疼痛モデルにおいて用量依存性に抗アロディニア作用を示した。

(2) これら PAF 受容体阻害薬の抗アロディニア作用は gabapentine に比べ強力で、その作用は1回の投与で5-6日間持続する長期間持続性であった。

(3) PAF 受容体阻害薬は全身投与(静脈内投与, 経口投与) および脊髄腔内, 大槽内に局所投与しても有効であり, 脊髄 PAF 受容体を阻害して機能している可能性を示唆した。

(4) PAF 阻害薬の静脈内投与は, ホルマリン誘発炎症性疼痛モデル, 酢酸誘発炎症性内臓痛モデルといった急性炎症性疼痛モデル, および CFA 誘発慢性炎症性疼痛モデルにおいて強力に持続する鎮痛作用と抗炎症作用を認めた。

(5) RNA 干渉により脊髄 PAF 受容体をノックダウンしても抗アロディニア作用を認め, PAF 受容体阻害薬は脊髄レベルで PAF 受容体阻害薬は脊髄レベルで PAF 受容体に特異的に阻害することにより機能していることが明らかとなった。

(6) PAF 受容体阻害薬の抗アロディニア作用は脊髄 GlyR $\alpha$ 3 ノックダウンで拮抗された。PAF 受容体阻害薬が PAF による GlyR $\alpha$ 3 機能の抑制を解除して, グリシン神経伝達を賦活することで鎮痛作用を惹起することを明らかにした。

(7) 神経障害性疼痛の発症と維持過程ではメカニズムが全く異なることが示唆されている。疼痛の発症と維持過程の両方を抑えることが出来れば, 有用な鎮痛薬となることが期待される。PAF 受容体阻害薬は神経損傷の前および直後に投与しても鎮痛作用を示し, 神経障害性疼痛の発症を防御することができた。このことから, PAF 受容体阻害薬が神経障害性疼痛の発症や形成, 維持過程を通して痛みの発生を抑制することが出来ること

を示している。

(8) 坐骨神経部分結紮モデルにおいて PAF 受容体阻害薬の連続頻回反復投与により薬物投与とよく対応した抗アロディニア作用を示し, 作用の増強, 減弱等は見られなかった。PAF 阻害薬は慢性投与しても蓄積作用や耐性などは出現しないことが明らかとなった。

(9) さらに, PAF 阻害薬の教期間持続する鎮痛効果の機序について詳細な検討を加え, PAF 阻害薬は投与直後は競合的拮抗阻害様式で PAF 受容体を阻害するが, その後非競合的な阻害様式の移行し, その機序に PAF 受容体のインターナリゼーション(内在化)が含まれることを明らかにした。

これらの成果より, PAF が脊髄で抑制性グリシン神経機能に影響して, 原因の異なる種々の病態生理学的疼痛の発症と維持機構に重要な役割を果たしており, PAF 阻害薬が顎顔面領域を含む各種疼痛疾患に普遍的に有効で副作用の少ない治療薬となる可能性を明らかにし, 鎮痛作用と抗炎症作用を併せ持つ新規治療薬開発の基礎的基盤を与えるものと期待される。

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 23 件)

1. 本山 直世・西村 英紀, 神経障害性疼痛発症における脊髄抑制性グリシン神経の変調機序に関する研究, 日本歯科保存学会2011年度秋季学術大会(第135回), 2011年10月20日, 大阪市
2. 本山 直世・森田 克也・北山 友也・西村 英紀・兼松 隆・土肥 敏博, 慢性難治性疼痛の発症と維持機構における血小板活性化因子(PAF)の役割, 第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2011年10月2日, 岐阜市
3. 本山 直世・森田 克也・西村 英紀・兼松 隆・土肥 敏博, 難治性疼痛の発症における血小板活性化因子(PAF)の関与, 第31回日本歯科薬物療法学会, 2011年6月25日, 千葉市
4. 本山 直世・森田 克也・北山 友也・西村 英紀・兼松 隆・土肥 敏博, グリシントランスポーター(GlyTs)の抗侵害作用発現機序に関する研究, 日本歯科保存学会2011年度春季学術大会(第134回), 2011年6月9日, 浦安市
5. 本山 直世・森田 克也・柏 典子・本山 智得・西村 英紀, 女性の痛み; 性ホルモンに

よる疼痛制御, 日本アンチエイジング歯科学会 第6回学術大会, 2011年5月22日, 札幌市

6. Motoyama N, Morita K, Kitayama T, Nishimura F, Kanemastu T, Dohi T. Anti-allodynia Effects of Glycine Transporter inhibitors in Neuropathic Pain Models. 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 21 Nov 2010, Kitakyushu

7. 神人友樹・本山直世・森田克也・北山滋雄・西村英紀・兼松隆, 三環系抗うつ薬の神経因性疼痛寛解作用における脊髄グリシン神経の関与, 日本歯科保存学会2010年度秋季学術大会(第133回)第12回日韓歯科保存学会学術大会, 2010年10月29日, 岐阜

8. 本山直世・森田克也・北山友也・西村英紀・兼松隆・土肥敏博, 神経因性疼痛発症時に認められるグリシンシグナルの変調機構, 第49回広島県歯科医学会・第94回広島大学歯学会, 2010年10月24日, 広島市

9. 本山直世・北山友也・西村英紀・兼松隆・森田克也・土肥敏博, 神経障害性疼痛発症における抑制性グリシンシグナルの変調機構に関する研究, 第52回日本歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 2010年9月21日, 東京

10. 本山直世・森田克也・北山友也・兼松隆・土肥敏博, グリシントランスポーターと神経障害性疼痛「トランスポーター研究の魅力を探る」 「シンポジウム: 神経伝達物質トランスポーターと神経疾患」, 第5回トランスポーター研究会年会(JTRA 2010) (招待講演), 2010年7月10日, 東京

11. 森田克也・本山直世・北山友也・兼松隆・土肥敏博, 疼痛治療ターゲットとしてのグリシントランスポーター 「シンポジウム: 疼痛治療の新しいターゲット」, 社団法人日本麻酔科学会第57回学術集会, 第13回アジア・オーストラレーシア麻酔科学会(招待講演), 2010年6月3日, 福岡市

12. Dohi T, Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Kanemastu T. Glycine transporter inhibitors as a novel drug discovery strategy for neuropathic pain. Third International Congress on Neuropathic Pain (NeuPSIG), 29 May 2010, Athens (Greece)

13. Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Jinnin Y, Nishimura F, Kanemastu T, Dohi T. Mechanisms of phase-dependent pain-relief activity of glycine transporter inhibitors after nerve injury. Third International Congress on Neuropathic Pain (NeuPSIG), 29 May 2010, Athens (Greece)

14. 森田克也・本山直世・北山友也・西村英

紀・兼松隆・土肥敏博, 神経障害性疼痛発症とグリシンシグナルの変調, 第83回日本薬理学会年会, 2010年3月16日, 大阪市

15. 北山友也・本山直世・森田克也・西村英紀・兼松隆・土肥敏博, 神経因性疼痛初期疼痛におけるクロライドイオン輸送体発現制御機構に関する研究, 第19回神経行動薬理若手研究者の集い, 2010年3月15日, 岡山市

16. 神人友樹・森田克也・本山直世・北山友也・北山滋雄・西村英紀・兼松隆・土肥敏博, 三環系抗うつ薬の抗アロディニア作用におけるグリシン神経の関与, 第19回神経行動薬理若手研究者の集い, 2010年3月15日, 岡山市

17. 本山直世・森田克也・北山友也・西村英紀・兼松隆・土肥敏博, 慢性難治性疼痛の発症と維持におけるグリシン神経の役割, 第19回神経行動薬理若手研究者の集い シンポジウム発表, 2010年3月15日, 岡山市

18. 本山直世・貴船幸基・森田克也・北山友也・神人友樹・西村英紀・兼松隆・土肥敏博, 痛み発症における血小板活性化因子(PAF)受容体の関与, 第131回日本歯科保存学会2009年度秋季学術大会, 2009年10月29日, 仙台市

19. 貴船幸基・本山直世・北山友也・西村英紀・兼松隆・森田克也・土肥敏博, 慢性・難治性疼痛管理における血小板活性化因子(PAF)受容体阻害薬の有用性について, 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2009年9月11日, 新潟市

20. 本山直世・北山友也・神人友樹・西村英紀・兼松隆・森田克也・土肥敏博, 糖尿病性疼痛モデルにおけるグリシントランスポーター阻害薬の抗アロディニア作用, 第51回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2009年9月11日, 新潟市

21. 北山友也・本山直世・西村英紀・兼松隆・森田克也・土肥敏博, ストレプトゾトシン誘発痛性糖尿病モデルに対するグリシントランスポーター(GlyT)阻害薬の寛解作用, 第115回日本薬理学会近畿部会, 2009年6月26日, 金沢市

22. 本山直世・森田克也・西村英紀・兼松隆, 神経因性疼痛治療薬としてのグリシントランスポーター阻害薬の可能性, 第29回日本歯科薬物療法学会, 2009年6月20日, 大阪市

23. 本山直世・森田克也・北山友也・西村英紀・土肥敏博, 血小板活性化因子(PAF)の脊髄腔内投与によるアロディニア発症へのグリシン受容体 $\alpha 3$ の関与, 第130回日本歯科保存学会2009年度春季学術大会, 2009年6月11日, 札幌市

〔図書〕（計2件）

1. 森田克也・本山直世・北山友也・兼松隆・土肥敏博, 株式会社金芳堂, 実験薬理学 実践行動薬理学 第3章「グリシントランスポーターを標的とした難治性疼痛治療薬の創薬戦略」, 2010, 233-241
2. Morita K, Motoyama N, Kitayama T, Kanemastu T, Dohi T. Editografica・Bologna (Italy), Mechanisms of phase-dependent pain-relief activity of glycine transporter inhibitors after nerve injury; in MEDIMOND-Monduzzi Editore International Proceeding Division, 3rd International Congress on Neuropathic Pain NeuPSIG, Athens (Greece), 2010. International Association for the Study of Pain (IASP) working together for pain relief (Christopher D Wells, Editors), pp213-pp216, 2010

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：疼痛を処理するための組成物およびその利用

発明者：森田克也, 土肥敏博, 本山直世, 北山友也, 兼松隆, 白石成二  
権利者：国立大学法人広島大学, 独立行政法人国立がん研究センター  
種類：特許  
番号：PCT/JP2011/078508  
出願年月日：2011年12月9日  
国内外の別：国際

名称：疼痛を処理するための組成物およびその利用

発明者：森田克也, 土肥敏博, 本山直世, 北山友也, 兼松隆, 白石成二  
権利者：国立大学法人広島大学, 独立行政法人国立がん研究センター  
種類：特許  
番号：特願2010-274581  
出願年月日：2010年12月9日  
国内外の別：国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本山直世 (MOTOYAMA NAOYO)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：70509661

### (2) 研究分担者

森田克也 (MORITA KATSUYA)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授  
研究者番号：10116684

### (3) 連携研究者

土肥敏博 (DOHI TOSHIHIRO)  
日本薬科大学・薬学部・教授  
研究者番号：00034182

西村英紀 (NISHIMURA FUSANORI)  
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：80208222