

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08960

研究課題名（和文）神経障害性疼痛制御における中枢神経スフィンゴシン1リン酸シグナル伝達系の役割

研究課題名（英文）The role of sphingosine-1-phosphate signaling pathway of the central nervous system in neuropathic pain.

研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・大学病院・特任教授

研究者番号：20331001

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：スフィンゴシン1リン酸(S1P)受容体アゴニストのFTY720とその構造類似体であるAAL-Rが脊髄で神経障害性疼痛を抑制するかラット坐骨神経絞扼モデルを使って調べた。FTY720とAAL-Rは共に髄腔内投与でラットに発現させた機械痛覚過敏と冷痛覚過敏を用量依存性に抑制した。高用量では運動機能を抑制したが活動性には影響を与えなかった。一方、S1P受容体サブタイプ2と3のアンタゴニストは疼痛閾値に影響を与えなかった。S1P受容体サブタイプ1は神経障害性疼痛における疼痛閾値を調節していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は慢性痛の主たる原因である。臨床応用されている薬物は有効性が低いことに加え、眠気、ふらつき、精神症状など重大な副作用が発現し、薬物治療をしばしば困難にしている。多くの患者は日常生活動作が損なわれ痛みの悪循環に陥る。したがって従来の治療薬と異なる作用機序を持つ副作用の少ない神経障害性痛治療薬の開発が望まれる。スフィンゴシン1リン酸(S1P)は痛みの伝達物質であるグルタミン酸の放出を促進して痛みを増強したり、神経障害性疼痛の発現と維持に関与すると考えられるが、本研究によりS1Pサブタイプ1受容体阻害薬が神経障害性疼痛治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated whether the sphingosine-1-phosphate (S1P) receptor agonist FTY720 and its structural analog AAL-R suppress neuropathic pain in the spinal cord using a rat sciatic nerve constriction model. Both FTY720 and AAL-R dose-dependently suppressed mechanical and cold hyperalgesia when administered intrathecally. High doses of these drugs inhibited the motor function, but not the locomotor activity. Conversely, antagonists of S1P receptor subtypes 2 and 3 did not affect the pain thresholds. It is suggested that the S1P receptor subtype 1 may regulate the pain thresholds of the neuropathic pain.

研究分野：疼痛治療学

キーワード：神経障害性疼痛 中枢神経系 スフィンゴシン1リン酸受容体

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は慢性痛の主たる原因である。臨床応用されている薬物は有効性が低いことに加え、眠気、ふらつき、精神症状など重大な副作用が発現し、薬物治療を困難にしている。多くの患者では日常生活動作が損なわれ痛みの悪循環に陥る。また慢性痛は高率に不安障害や抑うつ状態を引き起こすため治療効果が著しく低下し、破壊的思考を招くことで病態を複雑化させている。学習能力の低下を引き起こす場合もある。したがって従来の治療薬と異なる作用機序を持つ副作用の少ない神経障害性痛治療薬の開発が望まれている。副作用を軽減させるためには薬物が侵害受容伝達経路に選択的に作用する必要がある。

スフィンゴシン 1 リン酸 (S1P) は細胞膜の構成成分であるスフィンゴミエリンがスフィンゴミエリナーゼ活性化により代謝される経路とパルミトイル CoA とセリンの縮合に始まる *de novo* 合成経路により生成されたセラミドが、スフィンゴシンに分解された後、スフィンゴシンキナーゼによりリン酸化されて合成される。S1P は単なる細胞膜の構成成分ではなく、細胞増殖、分化、アポトーシスの制御、免疫機能の調節、神経伝達物質の調節など様々な生理活性を持つことが明らかになっている。S1P の生理作用の一つがグルタミン作動性神経伝達の調節で、S1P 受容体アゴニストはグルタミン酸を放出させる。S1P 受容体は侵害受容伝達経路である脊髄及び脳・脳幹に発現しており、アンタゴニストによりグルタミン酸の放出を抑制できる。S1P は神経細胞や免疫細胞を含む全ての細胞に存在する。これまでに 5 種類の S1P 受容体サブタイプ (S1P1-5) が同定されており、S1P4 受容体を除いて脳と脊髄に発現している。近年、S1P がグルタミン酸の放出を促進して侵害受容伝達を増強することや、神経障害性疼痛の発現と維持に関与することが示唆されている。

2. 研究の目的

組織損傷により神経障害性疼痛が発生する過程で、グリア細胞の活性化とグルタミン酸による中枢神経可塑化が重要な役割を持つ。S1P 受容体は S1P4 受容体を除いて中枢神経系で神経細胞とグリア細胞に発現し、様々な細胞応答やグルタミン酸放出に関与していることからその阻害薬は疼痛緩和のみならず損傷初期において病態の進展も抑制する可能性がある。また海馬の S1P3 受容体が空間記憶や学習に関与していることが報告されており、副作用軽減の観点から重要である。S1P 受容体阻害によるグルタミン酸神経伝達の間接的な抑制はグルタミン酸受容体阻害薬と比較して副作用である精神症状が発現しにくい利点がある。サブタイプに選択的な作動薬と阻害薬が合成されているため、侵害受容伝達に特異的に関与しているサブタイプを同定できればより副作用の少ない治療薬の開発に繋がることが期待できる。

慢性痛患者の多くは不安障害や抑うつ状態により治療効果が低下し、日常生活動作 (ADL) が損なわれるため痛みの悪循環に陥る。神経障害性痛患者の治療において、疼痛緩和と同時に不安や抑うつ症状に対するケアや学習能力への影響を考慮することが患者の ADL を向上させるために重要となる。本研究では不安・抑うつ反応における S1P 受容体作用薬の薬理作用についても検討する。新規鎮痛薬が臨床応用されるためには侵害受容伝達に対する鎮痛作用だけでなく、鎮静・催眠、学習・記憶障害、運動機能障害などの重大な副作用についての詳細な行動実験による検討が不可欠である。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性痛モデルの作製 (担当: 原・原西・寺田)

Bennett and Xie の方法 1) により雄 Sprague-Dawley (SD) ラットをセボフルラン麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開し、片側の坐骨神経を 4.0-silk 糸で 4 箇所緩く結紮した [坐骨神経絞扼 (CCI) モデル]。坐骨神経損傷の影響を確認するため、坐骨神経を剥離・露出のみを行う sham 手術を施した。Ugo Basile 社製圧刺激疼痛閾値測定装置 model: 37215 で痛覚過敏を認めたラットを用いて実験を行った。

(2) 髄腔内カテーテルの留置 (担当: 原・原西・寺田)

セボフルラン麻酔下に脳定位固定装置を用いて、Yaksh and Rudy の方法 2) により SD ラットの大槽から尾側に向かってポリエチレンカテーテル (PE-10) を 8.5 cm 挿入した。薬物または溶媒 (50% DMSO: 対照群) 10 μ l を PE-10 に接続した 30G マイクロシリンジで緩徐に注入した。この処置を坐骨神経の結紮に続いて行う。<参考文献> 1) Bennett and Xie, Pain 1988;33:87 2) Yaksh and Rudy, Physiol. Behav. 1976;17:1031

上記処置から 1 週間後に神経障害性疼痛ラットに S1P 受容体アゴニスト (サブタイプ 1 機能的アンタゴニスト) の FTY720 (fingolimod) と構造類似体の AAL-R (50, 100, 150 μ g/10 μ l/rat)、S1P2 受容体アンタゴニストの JTE-013 (100, 200, 500 μ g)、S1P3 受容体アンタゴニストの CAY10444 (50, 100, 200 μ g) と CMY5541 (50, 100, 200 μ g) を髄腔内に投与し、以下の疼痛閾値試験、運動機能試験、不安/抑うつ・学習関連行動試験を行い定量評価した。

(3) 機械刺激および冷刺激過敏性への作用を調べる実験 (担当: 原・原西)

Electronic von Frey test (機械痛覚過敏に対する作用)

IITC Life Science 社製 model:2391C を用いた。患肢足底に上向きの力がかかるように filaments を押し当て、逃避反応(患肢を引き上げる)が起こる閾値(g)を測定した。

Cold plate test (冷痛覚過敏に対する作用)

Ugo Basile 社製 Hot/Cold plate model:35100 を用いた。神経障害性疼痛に発現頻度が高く特徴的な冷刺激に対する痛覚過敏を評価した。2 の冷板にラットを乗せ逃避反応(後肢を舐める・引き上げる・振り回す)が起こるまでの潜時を測定した。

(4) 運動・学習機能・不安・抑うつへの作用を調べる実験 (担当: 原・原西・寺田)

Rotarod test

Ugo Basile 社製 model:477000 を用いた。5 分間で 4 rpm から 40 rpm まで加速しながら回転するドラムの上にラットを乗せ、落下するまでの潜時を測定した。薬物投与前に 1 時間間隔で 3 回訓練を行うと学習能力により潜時が延長した。

Open field 試験 (不安・抑うつの評価)

ラットを高さ 40cm の壁で囲まれた 80cm 四方のオープンフィールドの中央に置き、5 分間自由に探索させた。ビデオ行動解析システム(Stoelting 社製 ANY-maze)で FTY720(50, 100, 150 μ g/10 μ l/rat) 髄腔内投与 30 分後の総移動距離 locomotor activity を定量評価した。

(5) 測定データの統計解析 (担当: 原・原西・寺田)

結果は、平均 \pm 標準偏差で表した。薬物群の比較は one-way ANOVA または two-way repeated measures ANOVA followed by Tukey 's post hoc test、CCI ラットと sham ラットの基準閾値の比較は Student's two-sample t-test(electronic von Frey test)または the Mann-Whitney U test (cold plate test)で統計解析し、 $P < 0.05$ を有意とした (各群 6 匹) † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$, ††† $p < 0.001$ and § $p < 0.0001$ compared with 50%DMSO

4. 研究成果

(1) CCI ラットにおける FTY720 髄腔内投与の機械および冷痛覚過敏に対する作用

Electronic von Frey test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応閾値が低下した。(p<0.0001)(図 1) FTY720 投与から 30, 60, 90, 120, 180, 240 分後の逃避行動閾値を測定した。FTY720 は機械痛覚過敏に対して用量依存性に閾値を増加した。Cold plate test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応潜時が減少した。(p<0.0001) (図 2) FTY720 投与から 30, 60, 90, 120, 180, 240 分後の逃避行動潜時を測定した。FTY720 は冷痛覚過敏に対して用量依存性に潜時を増加した。

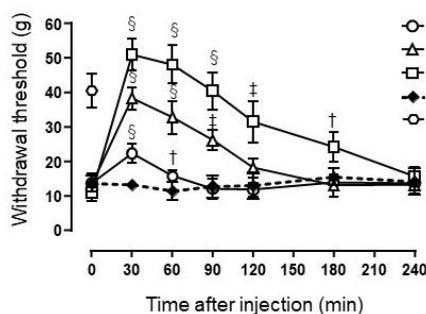


図 1

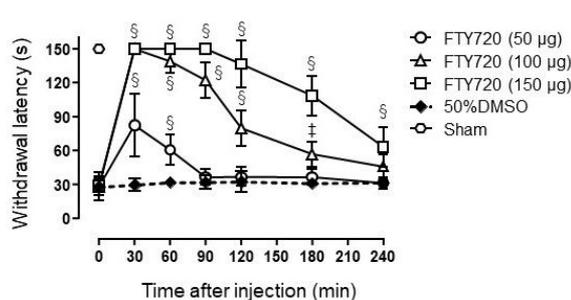


図 2

(2) CCI ラットにおける AAL-R 髄腔内投与の機械および冷痛覚過敏に対する作用

Electronic von Frey test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応閾値が低下した。(p<0.0001)(図 3) FTY720 投与から 30, 60, 90, 120, 180, 240 分後の逃避行動閾値を測定した。FTY720 は機械痛覚過敏に対して用量依存性に閾値を増加した。Cold plate test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応潜時が減少した。(p<0.0001) (図 4) FTY720 投与から 30, 60, 90, 120, 180, 240 分後の逃避行動潜時を測定した。FTY720 は冷痛覚過敏に対して用量依存性に潜時を増加した。

(3) CCI ラットにおける FTY720、AAL-R 髄腔内投与の運動機能に対する作用

臨床応用の可能性を探るため、鎮痛薬の重大な副作用の一つである運動機能への作用を調べた。FTY720、AAL-R の投与から 30, 60, 120, 180 分後の閾値を測定した。FTY720 と AAL-R は高用量(150 μ g)では投与 30, 60 分後の潜時を有意に減少させた。(図 5, 6) AAL-R は 100 μ g でも投与 30 分後の運動機能を抑制した。

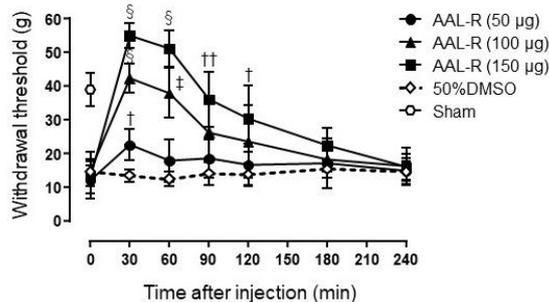


図 3

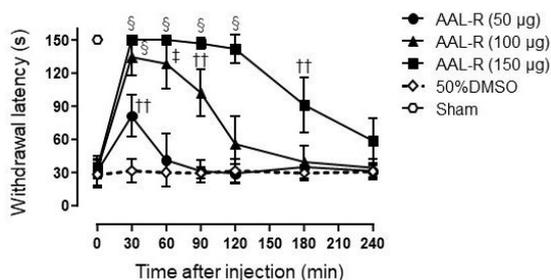


図 4

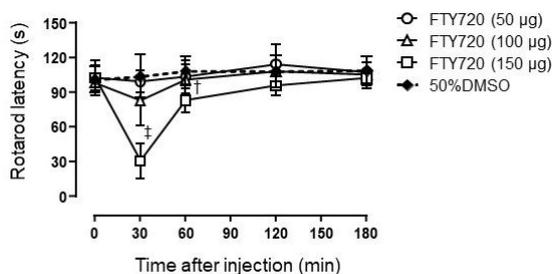


図 5

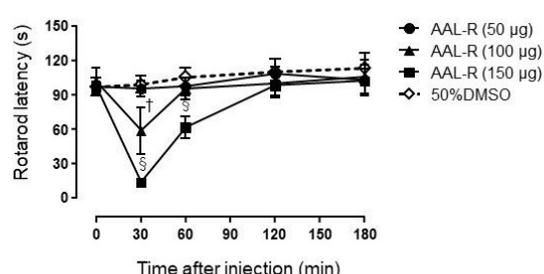


図 6

(4) CCI ラットにおける S1P 受容体サブタイプ 2 および 3 アンタゴニストの髄腔内投与の機械および冷痛覚過敏に対する作用

S1P2 受容体および S1P3 受容体の CCI モデルにおける機械および冷痛覚閾値に対する関与を調べるため、S1P2 受容体アンタゴニストの JTE-013(100, 200, 500 µg)、S1P3 受容体アンタゴニストの CAY10444 (50, 100, 200 µg)と CMY5541(50, 100, 200 µg)を髄腔内投与して Electronic von Frey test と Cold plate test を行った。その結果、JTE-013、CAY10444、CMY5541 はいずれも高用量でも機械および冷痛覚閾値に影響を与えなかった。(図 7, 8) また、Rotarod test を用いた運動機能の評価でも作用が見られなかった。(data not shown)

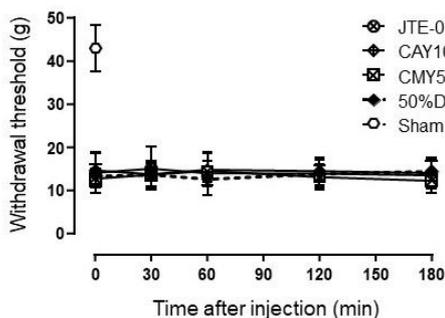


図 7

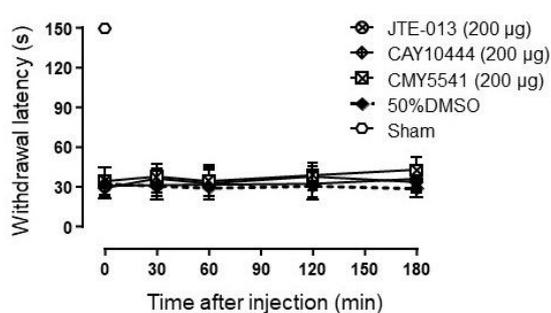


図 8

(5) CCI ラットにおける FTY720 髄腔内投与の locomotor activity に対する作用

不安・抑うつ指標として locomotor activity に対する FTY720 の作用を調べるため、投与 30 分後にオープンフィールド試験を行った(図 9)。FTY720 は CCI ラットの 5 分間の総移動距離に有意な影響を与えなかった。(図 10)

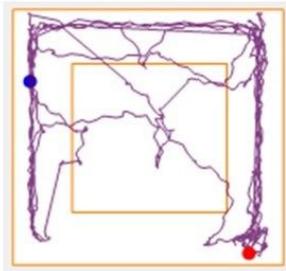


図 9

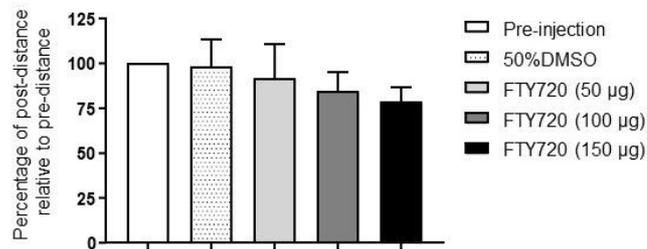


図 10

以上の結果から、髄腔内に投与した FTY720 と AAL-R は、CCI ラットに発現した機械痛覚過敏と冷痛覚過敏に対して強力な鎮痛作用を示した。高用量の作用は私達が過去の研究で示した、国際疼痛学会の薬物治療ガイドラインで第一選択薬に含まれる gabapentin の中等量の作用と同程度であった。また同時に、脊髄の S1P 受容体は神経障害性疼痛の病態に関与していることが示唆された。FTY720 (fingolimod) は免疫抑制剤として多発性硬化症の治療薬として臨床使用されている。FTY720 は S1P 受容体の非特異的アゴニストであるが、リンパ球の S1P1 受容体を内在化させて機能的にはアンタゴニストとして働くことが免疫抑制作用の機序と考えられている。また、カンナビノイド受容体 1 (CB1) のアゴニスト作用も報告されている。AAL-R は FTY720 の構造類似体であり、抗痛覚過敏作用が同程度であることから、同じ鎮痛作用機序であると考えられる。続いて脊髄の S1P2 受容体および S1P3 受容体が神経障害性疼痛の病態に関与しているか調べるため、それぞれのアンタゴニストを髄腔内に投与したところ、疼痛閾値に影響を与えなかったことからこれらの受容体はほとんど関与していないことが分った。さらに FTY720 (150 µg) の抗痛覚過敏作用は JTE-013 (200 µg)、CAY10444 (200 µg) の前処置によって有意な影響を受けなかった。(data not shown) このことから、FTY720 (150 µg) の抗痛覚過敏作用には S1P2 受容体および S1P3 受容体へのアゴニスト作用が関与していないことが示唆された。FTY720 と AAL-R はともに用量依存性に Rotarod test で運動機能を抑制したがその作用は抗痛覚過敏作用よりも短時間であった。FTY720 は高用量でも投与 30 分後の locomotor activity に影響を与えなかった。したがって Rotarod test で認められた運動機能抑制作用よりも、移動距離で評価した活動性に対する影響は小さいことが分った。FTY720 は既に臨床使用されていることから、副作用に関して安全性が高く、AAL-R と共に新たな神経障害性疼痛治療薬になる可能性がある。しかし、鎮痛作用についてはまだ機序が十分に分っていないことや免疫抑制作用があることから鎮痛薬としての臨床応用には今後更なる研究が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hara K, Haranishi Y, Terada T	4. 巻 26(6)
2. 論文標題 Verbascoside administered intrathecally attenuates hyperalgesia via activating mu-opioid receptors in a rat chronic constriction injury model.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 European Journal of Pain	6. 最初と最後の頁 1322-1332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ejp.1952.	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 -

1. 著者名 Haranishi Y, Hara K, Terada T	4. 巻 76(1)
2. 論文標題 Analgesic potency of intrathecally administered punicalagin in rat neuropathic and inflammatory pain models.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Natural Medicine	6. 最初と最後の頁 314-320
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11418-021-01576-0.	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 原西 保典、原 幸治、寺田 忠徳
2. 発表標題 植物由来ベルバスコシドの鎮痛作用機序に関する研究：カフェイン酸、ヒドロキシチロソールの抗痛覚過敏作用の検討
3. 学会等名 日本麻酔科学会第68回学術集会
4. 発表年 2021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	寺田 忠徳 (TERADA Tadanori) (10399206)	産業医科大学・医学部・准教授 (37116)	

6. 研究組織（つづき）

	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	原西 保典 (HARANISHI Yasunori) (90449942)	産業医科大学・医学部・非常勤医師 (37116)	

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