様　式　C－19、F－19－1、Z－19　(共通)

# 科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　6 年　6 月　8 日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：２１Ｋ１００８１

研究課題名（和文）慢性痛の誘発と制御において脳内のorexin受容体subtypeが果たす役割

研究課題名（英文）Studies on the roles of brain orexin receptors in regulation of chronic pain

研究代表者
三枝　禎（SAIGUSA, Tadashi）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：５０２７７４５６

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）：中脳辺縁系dopamine（DA）神経系の投射領域の側坐核にはorexin神経が入力し，OX1, OX2受容体が分布する。本研究はラットを用い，これらのorexin受容体が側坐核のDA放出の制御で果たす役割と慢性痛の影響を分析した。これは慢性痛でc線維へ入力するorexin神経の活動が低下するほか，脳内のDA神経伝達が痛みで変化する可能性があるためである。さらに，アナボリックステロイドのnandroloneの反復投与の側坐核のDA放出への影響と，歯周疾患の進行に関与するP. gingivalis由来のリポ多糖が、中脳辺縁系DA神経の活動促進が誘発するマウスの活動亢進に及ぼす効果も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義
中脳辺縁系DA神経の投射する側坐核でOX2受容体はDA放出を抑制するが，この抑制の慢性痛による変化を報告できた。つまりorexin類の脳内での作用を慢性の痛みとの関連から新たに示せた。また，思春期に相当する時期のnandroloneの反復投与は中脳辺縁系DA神経活動を高めないが，nandroloneと併用して乱用されるopioidによるDA神経活動の賦活化を低下させた。即ち，nandroloneの反復投与が依存につながるopioidの過剰摂取の誘因となる危険を指摘できた。また，新環境でのマウスの活動亢進はP. gingivalis由来のリポ多糖の全身投与の影響は受けないことが示された。

研究成果の概要（英文）：The nucleus accumbens, a terminal area of the mesolimbic dopaminergic (DAergic) system, contains orexinergic neural inputs and OX1 and OX2 receptors (-Rs). We analyzed the roles of these orexin-Rs in regulating accumbal dopamine (DA) efflux in rats with or without experimentally induced chronic pain, as chronic pain has been shown to affect orexin-R-mediated orexinergic neural activity on the c-fibers and brain DAergic neural transmission might be altered by pain. Additionally, we studied the effects of repeated administration of nandrolone, an anabolic androgenic steroid, on accumbal DA efflux in rats, since drugs of abuse activate mesolimbic DAergic neurons, and nandrolone has been suspected of inducing dependence. Finally, we analyzed the effects of lipopolysaccharides from Porphyromonas gingivalis, known to be involved in the progression of periodontal disease, on novel-environment-induced locomotion in mice, which is known to be induced by increased mesolimbic DAergic activity.

研究分野：薬理学

キーワード：Orexin　Dopamine　行動薬理学　脳　ラット　マウス

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１（共通）

## １．研究開始当初の背景

Orexin-A と orexin-B は，睡眠覚醒サイクルと摂食の調節に関与する神経ペプチドで，$OX_1$ と $OX_2$ の 2 種類の orexin 受容体 subtype を介して作用する。Orexin 受容体は中枢神経系に広く分布しており，orexin-A は $OX_1$，$OX_2$ の両受容体へ同程度の親和性があり，orexin-B は $OX_1$ に比べ $OX_2$ 受容体へ高い親和性を示す。Orexin 類は，摂食とエネルギー恒常性維持の面では促進的な役割を果たす一方で，実験的な慢性痛を起こした動物の脳室または髄腔内へ投与すると鎮痛様の効果を示すが（Bingham et al., Pain 92, 2001），この痛みの抑制メカニズムの詳細は不明の点が少なくない。これまで我々のグループでは知覚神経細胞を用いた研究から ① orexin-A は $OX_2$ 受容体を介して痛みを伝える C 線維の興奮を抑制することと，② 慢性痛の存在下では C 線維へ入力する orexin 神経の活動低下が起こる可能性を指摘してきた（Ishikawa et al., Journal of Oral Science 59, 2017; Yamaguchi et al., Neuropsychopharmacology Reports 40, 2020）。

側坐核は，脳内の dopamine（DA）神経のうち，中脳腹側被蓋野を起始核とする中脳辺縁系 DA 神経が投射する領域である。視床下部外側野を起始核とする orexin 神経は側坐核にも投射しており，同部位には $OX_1$ と $OX_2$ 受容体が発現している。しかし，前述の通り orexin 神経活動が低下する可能性のある慢性痛下において $OX_2$ 受容体が側坐核の DA 神経の活動性の制御で果たす役割は明らかでない。そこで本研究では，炎症性疼痛または神経障害性疼痛が $OX_2$ 受容体を介した側坐核の DA 神経活動の抑制的制御に及ぼす影響について，*in vivo* 脳微小透析法により同部位から回収した細胞外液中に含まれる DA 量を指標として検討することにした。

さらに，中脳辺縁系 DA 神経活動の特徴について (1) 成長期の中脳辺縁系 DA 神経活動に対するタンパク同化ステロイドと morphine の投与の影響，(2) この DA 神経活動の亢進が関わると考えられている新環境誘発性の自発運動の増加に対してリポ多糖（LPS）の全身投与が及ぼす影響の面からそれぞれ実験動物を用いた基礎実験により解明に取組んだ。

## ２．研究の目的

実験動物を用い，側坐核の DA 放出の制御において同部位の orexin 神経が果たす役割を orexin 受容体 subtype の関与の面から明らかにすることを目指した。この検討は生理的な条件下だけでなく，炎症性疼痛または神経障害性疼痛様の行動を惹起する起炎物質の carrageenan の足底への投与または坐骨神経の部分結紮処置と機械的刺激の条件を確立し，実験的な慢性痛の存在下でも行った。さらにタンパク同化ステロイドのひとつで，世界アンチドーピング機構の使用禁止リストにも含まれる nandrolone の成長期における反復投与の開始時期が中脳辺縁系 DA 神経活動に及ぼす影響についても側坐核の DA 放出を指標として解析した。最後に歯周疾患の発症に関わるグラム陰性桿菌の *Porphyromonas gingivalis*（*Pg*）の細胞壁の構成成分の LPS の *Pg*-LPS の全身投与の作用について中脳辺縁系 DA 神経活動が関わることが知られている実験動物の行動活性のほか，血液に含まれるサイトカインのうち炎症を促進すると想定されている IL-6 と TNF-alpha，炎症を抑制すると想定されている IL-10 の量への影響の面から検討を加えた。比較の目的で代表的なグラム陰性桿菌の *Escherichia coli*（*Ec*）由来の LPS の *Ec*-LPS の全身投与実験も行った。

## ３．研究の方法

Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い，(1) orexin 受容体リガンドの側坐核への局所投与が同部位の細胞外 DA 量に及ぼす影響を指標とし，側坐核の基礎的な DA 放出の制御において $OX_1$ および $OX_2$ 受容体が果たす役割について *in vivo* 脳微小透析法により検討した。さらに(2) 成長期のうち思春期に相当する 6 から 10 週齢と，青年期に相当する 10 から 14 週齢において，筋力の指標のひとつである握力に対する nandrolone の反復投与の効果を体重に対する効果と比較して系統的に分析した。また，nandrolone の反復投与が側坐核の基礎的な dopamine 放出と morphine の投与が側坐核の dopamine 放出に及ぼす影響について *in vivo* 脳微小透析法により検討を加えた。また，(3) ddY 系雄性マウスを用い，全身投与した *Pg*-LPS の作用の特徴を *Ec*-LPS と比較して，底面が縦 30 cm×横 30 cm で高さ 20 cm のアクリル製の透明ケージ内の移所行動をデジタルビデオカメラで 30 分間記録し移動距離をビデオ画像行動解析装置で測定する open field test と，採血用ランセットを用いて採取した静脈血に含まれる炎症性サイトカイン量をビーズ法で定量する生化学的解析を行った。

## ４．研究成果

(1)　側坐核の DA 放出の制御において同部位の orexin 受容体 subtype が果たす役割

Orexin 受容体リガンドの側坐核への局所投与が，同部位の DA 量に及ぼす影響を観察した。その結果，$OX_1$ および $OX_2$ 受容体の非選択的なアゴニストである orexin-A，$OX_2$ 受容体の選択的なアゴニストの orexin-B の投与は，側坐核の DA 量に目立った変化を起こさなかったが，$OX_1$ および $OX_2$ 受容体の非選択的アンタゴニストの MK-4305 の投与では DA 放出を促進させた。微小透析膜を介した tetrodotoxin の側坐核の灌流投与または orexin-A の併用投与は，MK-4305 が誘発した側坐核の DA 放出を強く抑制した。$OX_2$ 選択的アンタゴニストの EMPA の投与は DA 放出を

増加させたが，この EMPA が誘発した側坐核の DA 放出は同部位への tetrodotoxin の灌流投与により消失した。$OX_1$ 受容体の選択的アンタゴニストの SB334867 の投与では DA 放出に変化が認められなかった。Orexin-B の併用投与は，EMPA または MK-4305 が誘発した DA 放出の増大を抑制した。一方，MK-4305 の腹腔投与では，側坐核の DA 放出に目立った変化は見られなかった。これらの実験から，側坐核においては $OX_1$ ではなく $OX_2$ 受容体が基礎的な DA 放出を抑制的に制御していることと，無麻酔非拘束ラットの側坐核の $OX_2$ 受容体の遮断は同部位の DA 放出を促進することを示す神経薬理学的な証拠が *in vivo* の条件下で提供できた（Kawashima et al., European Journal of Neuroscience 55, 2022）。また，生理的な状態の個体と比べ炎症性疼痛または神経障害性疼痛様の徴候を示す個体では，側坐核の基礎的な DA 放出には目立った変化は見られなかったが，MK-4305 または EMPA の側坐核への投与が誘発した同部位の DA 放出促進作用は低下した。これらのことから，本研究の実験的な慢性疼痛下では側坐核の $OX_2$-R を介した DA 放出の抑制は弱まることが考えられた。

(2)　Nandrolone の成長期における反復投与の開始時期が中脳辺縁系 DA 神経活動に及ぼす影響

はじめに 6 週齢および 10 週齢の個体に nandrolone の反復投与を 4 週間行い，この投与が握力と体重の増加に及ぼす影響を観察した。Nandrolone または溶媒の sesame oil は，1 日 1 回 1 週間のうち 6 日の連続投与を 3 週間行った後，1 日 1 回 4 日連続して投与した。その結果，nandrolone は 10 週齢ではなく 6 週齢の個体で握力の増大を促進したが，いずれの週齢のラットでも体重の増加には殆ど影響がなかった。そこで 6 週齢の個体に 4 週間の nandrolone を投与したのちに *in vivo* 脳微小透析実験を行ったところ，側坐核の基礎 DA 放出に変化はなかったが morphine の皮下投与が誘発した DA 放出の促進作用は低下した。以上のことから，nandrolone の反復投与が体重増加に影響を与えずに筋力の増加を促進する臨界期のひとつは思春期である証拠を *in vivo* の実験条件下で示すことができた。この思春期の時期の nandrolone の反復投与は，中脳辺縁系 DA 神経活動を活性化しないものの，nandrolone と最も併用して乱用される薬物である opioid によるこの神経活動の賦活化は低下させることが示唆された（Kawashima et al., Synapse 77, 2023）。

(3)　*Pg*-LPS の作用の行動学的および生化学的解析

はじめに被験個体への新環境の提示が誘発した移所運動量の増加に対する *Pg*-LPS の全身投与の影響を *Ec*-LPS と比較して open field test を行って検討した。その結果，新環境下での移所運動量は，*Pg*-LPS 処置では目立った変化が認められなかったが，*Ec*-LPS の投与で著しく減少した。この *Ec*-LPS による運動量の減少は TLR4 のアンタゴニストの TAK-242 の併用投与で打ち消されたほか，*Pg*-LPS の併用投与でも抑制される傾向が見られた。次に *Pg*-または *Ec*-LPS 処置が血中のサイトカイン量に及ぼす影響について観察したところ，IL-6，TNF-alpha，IL-10 の量はいずれも *Ec*-LPS の投与で顕著に増加したが *Pg*-LPS の投与では顕著な変化は認められなかった。TAK-242 の併用投与の結果，TNF-alpha とは異なり IL-6 と IL-10 の *Ec*-LPS 処置による増加は強く抑制された。*Pg*-LPS の併用投与では，IL-6 と TNF-alpha とは異なり IL-10 の *Ec*-LPS 処置による増加が顕著に抑制された。以上の結果から，*Pg*-LPS とは異なり *Ec*-LPS の全身投与は TLR4 を介して新環境が誘発した行動量の増加を抑制すると共に，血中の IL-6 と IL-10 を増加させることが示された。また，併用投与実験で TAK-242 により抑制される一方で *Pg*-LPS の影響を受けないという行動学および生化学的解析で見られた特徴から，*Ec*-LPS の全身投与が誘発した移所行動量の抑制には血中の IL-6 の増加が関わったことが考えられた（Aono et al., PLOS ONE, in press）。

＜引用文献＞


①　Bingham et al., Pain 92, 2001, 81-90

②　Ishikawa et al., Journal of Oral Science 59, 2017, 557-564

③　Yamaguchi et al., Neuropsychopharmacology Reports 40, 2020, 30-38

④　Kawashima et al., European Journal of Neuroscience 55, 2022, 733-745

⑤　Kawashima et al., Synapse 77, 2023, e22262

⑥　Aono et al., PLOS ONE, in press

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　1件）

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Hiroki Kawashima, Yuri Aono, Yuriko Watanabe, John L. Waddington and Tadashi Saigusa | ４．巻<br>55 |
| ２．論文標題<br>In vivo microdialysis reveals that blockade of accumbal orexin OX2 but not OX1 receptors enhances dopamine efflux in the nucleus accumbens of freely moving rats | ５．発行年<br>2022年 |
| ３．雑誌名<br>European Journal of Neuroscience | ６．最初と最後の頁<br>733-745 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/ejn.15593 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Hiroki Kawashima, Yuri Aono, Shigeki Shimba, John L. Waddington, Tadashi Saigusa | ４．巻<br>77 |
| ２．論文標題<br>Adolescence as a critical period for nandrolone-induced muscular strength in relation to abuse liability, alone and in conjunction with morphine, using accumbal dopamine efflux in freely moving rats. | ５．発行年<br>2023年 |
| ３．雑誌名<br>Synapse | ６．最初と最後の頁<br>e22262 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/syn.22262. Epub 2023 Jan 24. | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する |

| | |
|---|---|
| １．著者名<br>Yuri Aono, Koji Saito, Hiroki Kawashima, Arata Watanabe, Tetsuro Kono, Tomomi Hashizume-Takizawa, Hiroyuki Okada, Yasuhiro Kosuge, Hidenobu Senpuku, John L. Waddington, Tadashi Saigusa | ４．巻<br>in press |
| ２．論文標題<br>Lipopolysaccharides derived from Porphyromonas gingivalis and Escherichia coli: differential and interactive effects on novelty-induced hyperlocomotion, blood cytokine levels and TLR4-related processes | ５．発行年<br>2024年 |
| ３．雑誌名<br>PLoS ONE | ６．最初と最後の頁<br>in press |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1371/journal.pone.0292830 | 査読の有無<br>有 |
| オープンアクセス<br>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<br>該当する |

〔学会発表〕　計5件（うち招待講演　0件／うち国際学会　0件）

| |
|---|
| 1．発表者名<br>三枝　禎 |
| 2．発表標題<br>δ1またはδ2受容体刺激によるラットの側坐核のdopamine放出の促進へ関与するGABA受容体subtypeの検索 |
| 3．学会等名<br>第42回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム |
| 4．発表年<br>2023年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>川島央暉、三枝　禎 |
| 2．発表標題<br>神経障害性疼痛モデルラットの側坐核のdopamine放出へorexin受容体拮抗薬が及ぼす影響 |
| 3．学会等名<br>第148回日本薬理学会関東部会 |
| 4．発表年<br>2023年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>三枝　禎、川島央暉、青野悠里 |
| 2．発表標題<br>両後肢足底へcarrageenanを投与したラットの疼痛関連行動へmeloxicamおよびmorphineが及ぼす効果 |
| 3．学会等名<br>第96回日本薬理学会年会 |
| 4．発表年<br>2022年 |

| |
|---|
| 1．発表者名<br>川島央暉、青野悠里、三枝　禎 |
| 2．発表標題<br>慢性炎症性疼痛モデルラットの側坐核のdopamine放出へorexin受容体ligandが及ぼす効果 |
| 3．学会等名<br>第144回日本薬理学会関東部会 |
| 4．発表年<br>2021年 |

| |
|---|
| １．発表者名<br>川島央暉、青野悠里、三枝　禎 |
| ２．発表標題<br>炎症性疼痛がラットの側坐核のOX2受容体遮断を介したdopamine放出促進に及ぼす影響 |
| ３．学会等名<br>第22回応用薬理シンポジウム |
| ４．発表年<br>2021年 |

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

－

６．研究組織

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究分担者 | 小菅　康弘<br>(KOSUGE Yasuhiro)<br>(70383726) | 日本大学・薬学部・教授<br>(32665) | |

| | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号） | 備考 |
|---|---|---|---|
| 研究協力者 | 川島　央暉<br>(KAWASHIMA Hiroki)<br>(10981897) | 日本大学・松戸歯学部・専修研究員<br>(32665) | |
| 研究協力者 | 青野　悠里<br>(AONO Yuri)<br>(50508497) | 日本大学・松戸歯学部・助教<br>(32665) | |

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 |
|---|---|