

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 25 年 8 月 22 日現在

機関番号：32666

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791457

研究課題名（和文）GDNF による下行性ノルアドレナリン神経機能の強化を介した鎮痛の検討

研究課題名（英文）Analgesia mediated by enhancement of descending noradrenergic neuron with GDNF

研究代表者

坂井 敦（SAKAI ATSUSHI）

日本医科大学・医学部・助教

研究者番号：30386156

研究成果の概要（和文）：下行性ノルアドレナリン作動性神経の起始核である青斑核にサブスタンスPを投与することにより、NK₁受容体を介して神経障害性疼痛が緩和されることを示した。また、青斑核へのグリア細胞株由来神経栄養因子（GDNF）の投与は持続的に神経疼痛を緩和することを見出した。更に、これらの鎮痛効果はノルアドレナリンによる下行性抑制を介することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Administration of substance P into locus coeruleus, a nucleus constituting descending noradrenergic neurons, attenuated neuropathic pain via NK₁ receptor activation. In addition, administration of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) into the locus coeruleus persistently attenuated the neuropathic pain. These analgesic effects were mediated by noradrenergic descending inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経障害性疼痛、GDNF、下行性疼痛抑制、ノルアドレナリン

1. 研究開始当初の背景

- 1) 神経障害性疼痛は神経系に起因する難治性の慢性疼痛であり、有効な鎮痛薬の開発が早急に望まれている。
- 2) 青斑核に位置するノルアドレナリン作動性神経は、臨床上腺レナリン α_2 受容体作動薬やノルアドレナリン神経伝達を増強する抗うつ薬が鎮痛作用を發揮することから、神経障害性疼痛の緩和においてノルアドレナリンを標的とすることは有望である。しかしながら、アドレナリン

受容体は神経系を問わずあらゆる組織、臓器に発現し、特に血圧に対する有害作用が顕著であることから、既存のノルアドレナリンに関連する薬物は鎮痛効果を十分に發揮することができていない。

- 3) 我々は GDNF を脊髄髄腔内へ投与することにより神経障害性疼痛が緩和する分子基盤を明らかにしてきた。また、GDNF は後根神経節や脊髄後角で疼痛を抑えることを明らかにしてきたが、脳の痛覚情報処理における役割は全く明らかになって

いない。

2. 研究の目的

GDNF はノルアドレナリン神経機能に必須であることから、GDNF 及びその関連分子を青斑核へ投与し、下行性ノルアドレナリン神経機能の強化を介した神経障害性疼痛治療の可能性を検討する。

3. 研究の方法

1) 神経障害性疼痛モデルの作製と痛覚検査
全ての動物実験は International Association for the Study of Pain のガイドライン及び日本医科大学動物実験指針に基づいて、日本医科大学動物実験倫理委員会の承認の下に行った。7 週齢、雄性の Sprague-Dawley ラットを用いた。すべての手術はペントバルビタールの腹腔内投与による深麻酔下において行った。神経障害性疼痛モデルとして、坐骨神経を緩く結紮する慢性絞扼性傷害 (chronic constriction injury; CCI) モデルを作製した。痛覚の指標として、後肢足底に von Frey filament による機械的刺激及び Plantar test による熱刺激を行い、その刺激に対する回避行動を疼痛反応として観察した。

2) 薬物投与

青斑核への薬物投与は CCI モデル作製前に留置したガイドカニューレを通して行った。複数の濃度のサブスタンス P と GDNF を 0.5 μ l 投与した。サブスタンス P は CCI モデル作製後 7 日目に投与した。GDNF は 7 日から 9 日目にかけて 1 日 1 回投与した。NK₁ 受容体拮抗薬 (WIN 51708; 5 pmol) はサブスタンス P 投与の 15 分前に投与した。

アドレナリン α_2 受容体拮抗薬 yohimbine (20 μ g/10 μ l) は髄腔内カニューレを介して、サブスタンス P 投与 15 分前に投与した。カニューレは CCI モデルの作製前に小脳延髄槽から先端が脊髄腰膨大部に届くまで挿入した。チューブを挿入したラットは麻痺などの障害がないことを確認した上で、神経障害性疼痛モデルを作製した。

3) 蛍光免疫染色

ラットは PBS (pH 7.2) と 4% パラホルムアルデヒド (0.1 M PBS, pH 7.2) を順次心臓から全身灌流することで固定し、クリオスタットで厚さ 20 μ m に薄切した。ノルアドレナリン神経マーカーとしてチロシンヒドロキシラーゼや NK₁ 受容体、各種 GDNF 受容体に対する抗体を反応させた。Alexa Fluor 488 もしくは Alexa Fluor 594 標識二次抗体を反応させた。

4. 研究成果

1) 青斑核ノルアドレナリン作動性神経活性化による鎮痛効果

青斑核の賦活が神経障害性疼痛に対して鎮痛効果を及ぼすか確認するために、留置カニューレを介して薬物投与を行った。青斑核ノルアドレナリン神経には NK₁ 受容体が強く発現していることから、そのリガンドであるサブスタンス P を投与した。神経障害性疼痛発症後、NK₁ 受容体を活性化することにより機械的アロディニア及び熱性痛覚過敏の両方を緩和できる事を明らかにした (図 1)。この鎮痛作用は神経障害側と同側の青斑核を刺激する事により得られた。留置カニューレを介して微量投与を行うことにより青斑核特異的に薬物を作用させることが可能であることを確認した。この作用は脊髄におけるノルアドレナリン神経伝達を介していた。

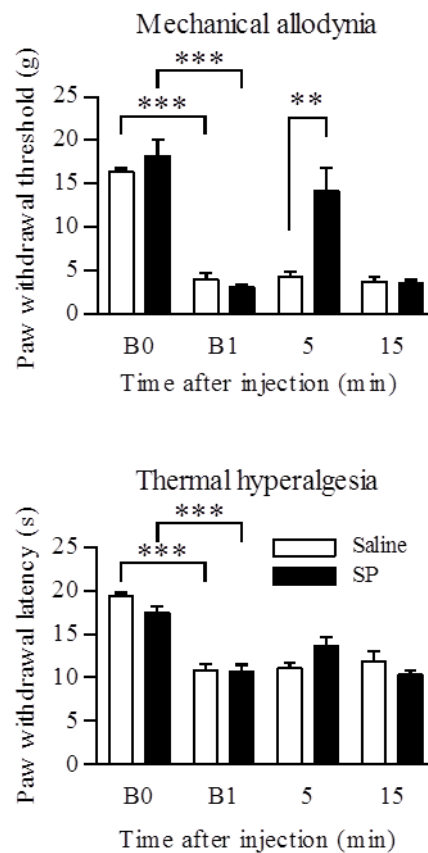


図 1 傷害側青斑核へのサブスタンス P 投与による神経障害性疼痛緩和効果。

2) 青斑核への GDNF 投与による鎮痛効果
グリア細胞株由来神経栄養因子 (GDNF) 及びその family に属するリガンドの青斑核における効果を検討した。GDNF family のリガンドの効果を様々な用量において検討した。GDNF はあらかじめ神経障害側と同側の青斑核を標的として留置したカニューレを介して微量投与し、青斑核特異的な作用を検討し

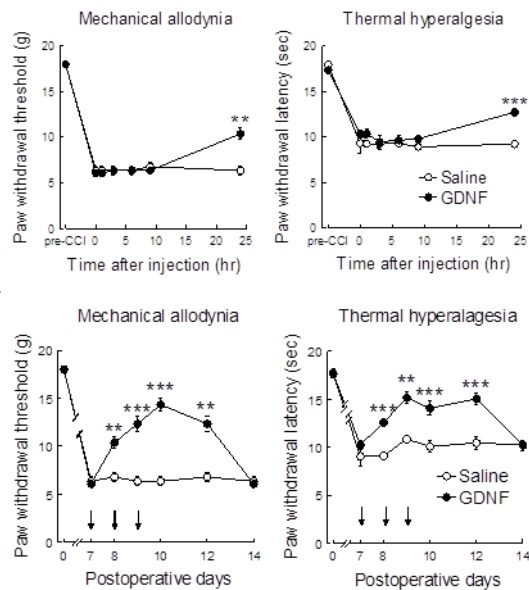


図2 青斑核へのGDNF投与による神経障害性疼痛緩和作用

た。神経障害性疼痛の指標としては機械的アロディニア及び熱性痛覚過敏を調べた。疼痛発症後、青斑核へGDNFを微量投与することにより、用量依存的に神経障害性疼痛が緩和した。この鎮痛効果の作用発現には時間がかかる一方で、GDNF投与を終了した後もしばらく持続していた(図2)。

3) GDNFによる鎮痛効果のメカニズム検討

GDNFの鎮痛効果はアドレナリン α_2 受容体拮抗薬であるヨヒンビン(ヨヒン)を脊髄髄腔内に投与することにより消失した(図3)。すなわち、脊髄へのノルアドレナリン神経伝達を介することが明らかになった。更に、GDNFには様々な受容体-細胞内情報伝達系を介して細胞機能に影響を与えることから、免疫蛍光染色により青斑核における受容体発現を解析し、GDNFの鎮痛効果に重要な細胞内情報伝達経路を検討した。

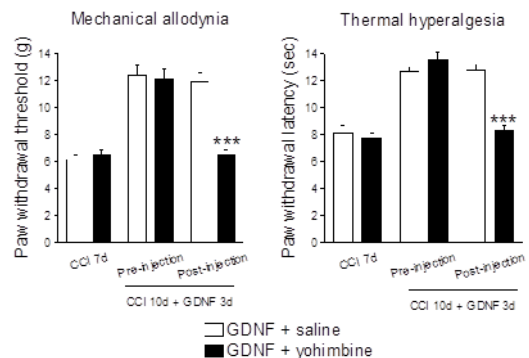


図3 GDNF鎮痛効果における脊髄ノルアドレナリン神経伝達の関与

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10件)

- 1) Sakai A, Saitow F, Miyake N, Miyake K, Shimada T, Suzuki H. miR-7a alleviates chronic neuropathic pain through regulation of neuronal excitability. *Brain*, in press. 査読有
- 2) Sakai A, Suzuki H. Nerve injury-induced upregulation of miR-21 in the primary sensory neurons contributes to neuropathic pain in rats. *Biochem Biophys Res Commun*, in press. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.04.089
- 3) Muto Y, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. Activation of NK₁ receptors in the locus coeruleus induces analgesia through noradrenergic-mediated descending inhibition in a rat model of neuropathic pain. *Br J Pharmacol* 166, 1047-1057 (2012). 査読有
DOI:10.1111/j.1476-5381.2011.01820.x
- 4) Makino A, Sakai A, Ito H, Suzuki H. Involvement of tachykinins and NK₁ receptor in the joint inflammation with collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice. *J Nippon Med Sch* 79, 129-138 (2012). 査読有
DOI: 10.1272/jnms.79.129
- 5) Sakai A, Takasu K, Sawada M, Suzuki H. Hemokinin-1 gene expression is upregulated in microglia activated by lipopolysaccharide through NF- κ B and p38 MAPK signaling pathways. *PLoS ONE* 7, e32268 (2012). 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0032268
- 6) Akasaka Y, Sakai A, Takasu K, Tsukahara M, Hatta A, Suzuki H, Inoue H. Suppressive effects of glycyrrhetic acid derivatives on tachykinin receptor activation and hyperalgesia. *J Pharmacol Sci* 117, 180-188 (2011). 査読有
DOI: 10.1254/jphs.11116FP
- 7) Uematsu T, Sakai A, Ito H, Suzuki H. Intra-articular administration of tachykinin NK₁ receptor antagonists reduces hyperalgesia and cartilage destruction in the inflammatory joint in rats with adjuvant-induced arthritis. *Eur J Pharmacol* 668, 163-168 (2011). 査読有

- DOI: 10.1016/j.ejphar.2011.06.037
- 8) Takasu K, Sakai A, Hanawa H, Shimada T, Suzuki H. Overexpression of GDNF in the uninjured DRG exerts analgesic effects on neuropathic pain following segmental spinal nerve ligation in mice. J Pain 12, 1130-1139 (2011). 査読有
DOI: 10.1016/j.jpain.2011.04.003
 - 9) Mase H, Sakai A, Sakamoto A, Suzuki H. A subset of μ -opioid receptor-expressing cells in the rostral ventromedial medulla contribute to thermal hyperalgesia in experimental neuropathic pain. Neurosci Res 70, 35-43 (2011). 査読有
DOI: 10.1016/j.neures.2011.01.003
 - 10) Toda S, Sakai A, Ikeda Y, Sakamoto A, Suzuki H. A local anesthetic, ropivacaine, suppresses activated microglia via a nerve growth factor-dependent mechanism and astrocytes via a nerve growth factor-independent mechanism in neuropathic pain. Mol Pain 7, 2 (2011). 査読有
DOI: 10.1186/1744-8069-7-2

[学会発表] (計 14 件)

1. 武藤友美. 青斑核におけるNK-1受容体の活性化は下行性抑制を介して神経障害性疼痛を緩和する. 第34回日本神経科学大会. 2011年9月17日. パシフィコ横浜.
2. 武藤友美. 神経障害性疼痛モデルラットにおける青斑核へのサブスタンスP投与による鎮痛効果. 日本麻酔科学会 第58回学術集会. 2011年5月20日. 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場.
3. 坂井敦. サブスタンスPの青斑核への投与は神経障害性疼痛を抑制する. 第84回日本薬理学会年会. 2011年3月. 誌上開催.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂井 敦 (SAKAI ATSUSHI)
日本医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30386156

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者