

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590715

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛発症における GPR103-26RFa, QRFP 系の役割

研究課題名(英文) Role of GPR103-26RFa-QRFP system in the development of neuropathic pain

研究代表者

棚平 千代子 (Tanahira, Chiyoko)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：20555776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：GPR103の内因性作動物質である26RFaを髄腔内・脳室内・脳内へ投与して、神経障害性疼痛・炎症性疼痛に対する効果を検討するとともに、神経障害の脊髄後根神経節におけるGPR103のもう一つの内因性作動物質であるQRFP発現に対する効果を検討した。

26RFaは、髄腔内・脳室内のいずれに投与しても、坐骨神経部分結紮モデル後に発症したアロディニアを軽減することが出来た。脳内を作用部位を検討するために、26RFaをRVMに選択的に投与したが、良好な鎮痛効果が得られ、この効果はオピオイド受容体を介さないことが示された。

免疫染色では、神経障害によりQRFP発現細胞数が増加することが示された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, the effects of intrathecal and intracerebroventricular application of 26RFa, on the level of mechanical allodynia induced by partial sciatic nerve ligation, were examined in rats. Intrathecal and intracerebroventricular injection of 26RFa attenuated the level of mechanical allodynia in a dose dependent manner. Immunohistochemical examination revealed that QRFP-like immunoreactivity (QRFP-LI) was expressed mainly in the small to medium sized neuronal profiles in the L5 dorsal root ganglion and that partial sciatic nerve injury increased the percentage of QRFP-LI positive neuronal profiles and made the cross-section area of the QRFP-LI positive neuronal profiles larger in the L5 dorsal root ganglion ipsilateral to the nerve injury.

Microinjection of 5 μg of 26RFa into RVM decreased the number of flinching behavior induced by paw formalin injection significantly as compared with saline injected rats. This effect of 26RFa was not antagonized by naloxone.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：GPR108 orphan receptor 神経障害性疼痛 炎症性疼痛 可塑性

1. 研究開始当初の背景

近年、痛みの基礎研究は大変進歩し、神経障害性疼痛の発症メカニズムは次第に明らかになってきている。しかしながら、基礎研究の進歩にもかかわらず神経障害性疼痛は有効性が高い標準治療が確立されていない。神経障害性疼痛の薬物治療成績の向上を目指すには、今までとは異なる視点に立った新しいクラスの治療薬の開発が必須である。

近年、分子生物学的手法により多くの orphan G-protein coupled receptor (作動物質が見つかっていない G タンパク共役型受容体) が発見されてきている。orphan G-protein coupled receptor は、新薬開発のターゲットとなる可能性が高いことから、注目されている。これらの orphan G-protein coupled receptor の中で、最近内因性の作動物質が発見された受容体に GPR103 がある。GPR103 の内因性作動物質は 26RFa, QRFP である。26RFa は、26 ケのアミノ酸残基からなり、N 末端に Arg-Phe を持つ RF-amide ペプチドである。QRFP は 43 ケのアミノ酸残基からなり、26RFa に 17 ケのアミノ酸が加わったものである。

RFamide-related peptide family には 26RFa, QRFP 以外に NPFF、prolactin-releasing peptide などが含まれ、侵害刺激伝達に関係していることが示唆されてきている。ラットを用いた結合試験では、26RFa は脊髄後角 I-II 層、locus coeruleus、dorsal raphe nucleus、periaqueductal gray など痛み刺激の伝導に強く関与している部位に結合することが報告されている。さらに、我々は QRFP が脊髄後根神経節の神経細胞に存在していること、また GPR103 が脊髄後角の I-II 層に存在していること報告してきた (Neuroscience 157 (2008) 214-222)。これらの解剖的特徴から、GPR103 - 26RFa, QRFP system は侵害刺激伝達に強く関与しており、新規の鎮痛薬のターゲットとなる高い可能性が考えられる。私は世界に先駆けてこれらの薬物を髄腔内、脳室内へ投与し、炎症性疼痛に対して鎮痛効果があることを見だしてきた (Neuroscience 157 (2008) 214-222; Peptides 30 (2009) 1683-1688)。今後さらに GPR103 が神経障害性疼痛の治療薬のターゲットとしての可能性を薬理学的のみならず形態学的、分子生物学的手法を用いて多角的に検討することにより今後の神経障害性疼痛治療の進歩につながると考えている。

2. 研究の目的

臨床で診る痛みには、炎症性疼痛と神経障害性疼痛がある。炎症性疼痛・神経障害性疼痛はいずれも、発症する原因、その程度などにより様々な症状を呈し、また治療薬に対する感受性も異なっている。炎症性疼痛・神経障害性疼痛の動物実験モデルも数多く存在し、各々のモデル間で症状・発症パターン・

薬物の感受性に違いが見られることが報告されている。今回の研究では、炎症性疼痛モデルの一つであるホルマリントレスト、また神経障害性疼痛モデルである部分神経障害モデルの2種類のモデルを用いて検討する。

GPR103 の内因性作動物質である 26RFa, を髄腔内・脳室内・脳内へ投与し、炎症性疼痛モデルと神経障害性疼痛モデルに対する有効性を検討する。どのような痛みに対して GPR103-26RFa, QRFP system が有効であるかについて検討できる。さらに、QRFP の免疫染色を行い、脊髄での発現パターンを検討する。これらの結果を総合することにより、GPR103-26RFa, QRFP system がどのような神経系の状況下で鎮痛効果を発揮するかを解析できる。脳室内投与にて有効性が確認された場合は、脳定位手術の手法を用いて脳内の作用部位を特定する。

3. 研究の方法

薬物は、髄腔内・脳室内・脳内へ行う。髄腔内投与は、Yaksh らの方法により atlanto-occipital membrane よりカテーテルを腰膨大部まで挿入し、このカテーテルを用いて行う。脳室内投与・脳内投与は、定位脳手術の方法を用いてカニューラを留置し、このカテーテルを介して行う。脳内投与は rostral ventromedial medulla (RVM) を目標部位として行う。神経障害性疼痛モデルでは、神経損傷後 1 週で allodynia が十分に発症した後に薬物を単回投与し、allodynia に対する効果を検討する。

髄腔内・脳室内へは、3 - 30 μ g の 26RFa を、RVM へは、5 μ g の 26RFa を投与した。

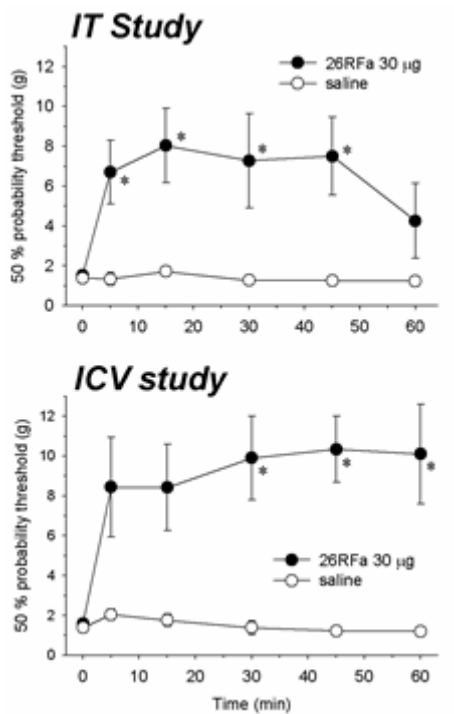
免疫染色は、1 次抗体には Phoenix Pharmaceuticals Inc 社製の QRFP に対する抗体を用いた。免疫染色では、特に神経損傷側の後根神経節を対象に行った。

4. 研究成果

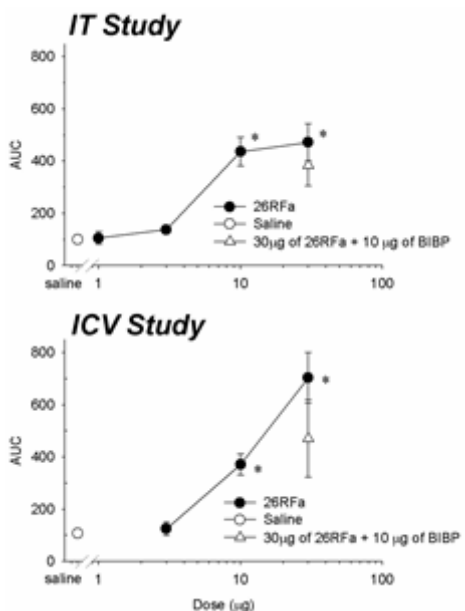
神経障害性疼痛モデル (部分神経障害モデル) に対する効果

部分神経損傷モデルを作成すると、逃避反応の閾値が 15 g 2g に減少した。このことは、神経損傷によりアロディニアが発症していることを示している。髄腔内・脳室内へ 26RFa を 30 μ g 投与すると、同様に逃避反応の閾値が 8 g 程度に増加した。このことは、26RFa は脊髄・脳内のいずれに作用しても抗アロディニア効果があることを示している。

3 ~ 30 μ g の範囲で、投与量依存性の抗アロディニア効果が示された。



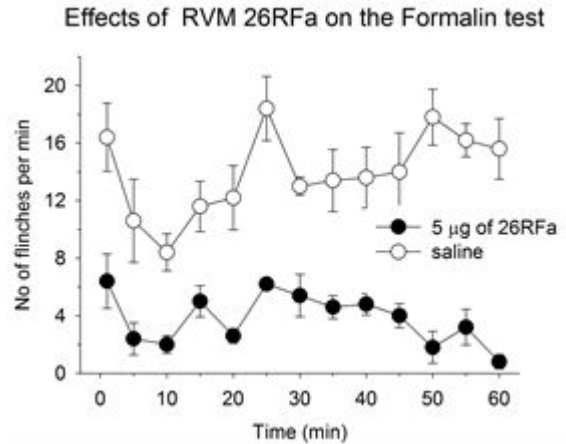
26RFa 30 µg 髄腔内投与 (IT)・脳室内投与 (ICV) の効果。髄腔内投与では投与後 5 分で効果が得らるが、脳室内投与では 30 分後から有意な効果が得られた。



26RFa 髄腔内投与 (IT)・脳室内投与 (ICV) の効果 (投与量依存性)

ホルマリンテストに対する効果

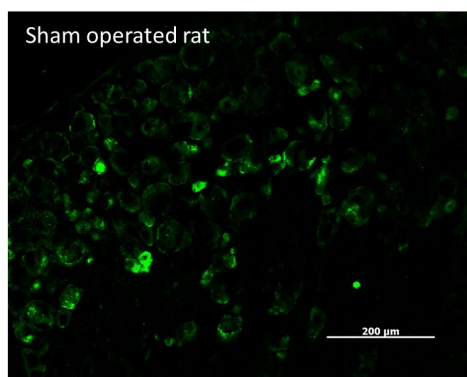
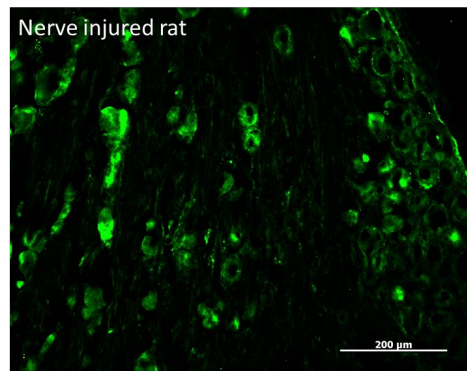
オピオイド鎮痛に重要であると考えられている RVM に選択的に 5 µg の 26RFa を投与すると、良好な鎮痛効果が得られた。この効果は、ナロキソン 1mg/kg により拮抗されることはなかった。従って、RVM での 26RFa の効果はオピオイド受容体を介さないことが示された。



免疫染色

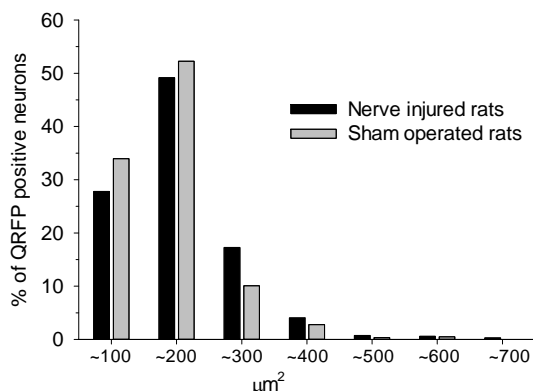
神経損傷側の L5 後根神経節で検討を行った。

シャム手術を行ったラットの後根神経節では、16.2%の神経細胞で QRFP が発現していた。一方、神経を損傷したラットの後根神経節では 21.1%の神経細胞で QRFP が発現していた。神経障害により有意に QRFP 発現神経細胞が増加することが分かった。



神経障害ラットとシャム手術ラットでの QRFP 発現の違い

さらに、QRFP が発現している神経細胞は、コントロールラットでは小型から中型細胞であったら、神経を障害すると有意に発現細胞が大型化した。



神経損傷ラットとシャム手術ラットでのQRFP発現神経細胞の大きさの分布

これらの結果から、GPR103-26RFa, QRFP system が、脊髄・脳内で侵害刺激伝達に関与していることが示唆された。特に、脳内ではRVMが重要な部位であった。また神経障害により、QRFP発現に変化が生じることもわかり、神経障害性疼痛の発症との関わりが示唆された。

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 1件)

1. Yamamoto T, Miyazaki R, Yamada T, Shinozaki T (2011) Anti-allodynic effects of intrathecally and intracerebro-ventricularly administered 26RFa, an intrinsic agonist for GRP103, in the rat partial sciatic nerve ligation model. Peptides 32,1262-1269. (査読あり)

〔学会発表〕(計 2件)

1. Takahiro Nonaka, Toshihiko Yamada, Miki Araki, Tatsuo Yamamoto: Microinjection of Neuropeptide W, an

endogenous ligand for GPR7 and 8, into rostral ventromedial medulla (RVM) produces an analgesic effect in the rat formalin test. Neuroscience 2014 Washington DC, アメリカ 2014年11月15~19日

2. Miki Araki, Takahiro Nonaka, Toshihiko Yamada, Tatsuo Yamamoto: Microinjection of 26RFa, an endogenous ligand for GPR103, into rostral ventromedial medulla (RVM) produces an analgesic effect in the rat formalin test. Neuroscience 2014 Washington DC, アメリカ 2014年11月15~19日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
棚平 千代子 (TANAHIRA Chiyoko)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：20555776

(2)研究分担者
山本 達郎 (YAMAMOTO Tatsuo)
熊本大学・大学院生命科学研究部・教授
研究者番号：20200818