

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590718

研究課題名(和文) 脊髄における神経障害性疼痛の発症機構の解明とその特異的治療法の開発

研究課題名(英文) Investigation for the mechanism of neuropathic pain on spinal pain transmission.

研究代表者

渡辺 千寿子(WATANABE, Chizuko)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：90296020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：難治性疼痛とされている神経障害性疼痛の詳細な発現機構を解明するため、脊髄神経伝達物質およびその受容体に焦点を絞り検討を行った。その結果、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現には、中枢神経系および末梢神経系の様々な神経伝達物質が複合的に関与し、さらにそれらの伝達物質はアロディニアの発現・維持に異なる役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is one of the serious painful syndrome in clinic. However, its mechanism is still unknown. In this project, to describe the mechanism of the neuropathic pain involvement of various neurotransmitters and its receptors on the central and peripheral nervous system was investigated in the animal model for the nerve-injured neuropathy. As the results, it was found that various neurotransmitters may play a different role for the expression and maintenance of allodynia in the neuropathic pain state.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：神経障害性疼痛 脊髄 疼痛伝達物質 受容体 マイクログリアリシス

## 1. 研究開始当初の背景

近年臨床の現場では、morphine 等の麻薬性鎮痛薬によっても緩和することが困難な難治性疼痛が大きな問題となっている。なかでも代表的難治性疼痛である神経障害性疼痛は、中枢神経あるいは末梢神経が障害されることに起因する痛みであり、自発痛、アロディニア、痛覚過敏などを主症状とする慢性的難治性疼痛である。その発症機構を解明すべく多くの研究が行われているが、未だ神経障害性疼痛の発現機構は解明されておらず、その特異的治療法も確立されていない。これまでに我々は、神経障害性疼痛動物モデルを用いて、脊髄疼痛伝達経路における、神経障害性疼痛の発現機構の解明を行ってきた。その結果、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおいては、脊髄疼痛伝達物質に対する感受性が亢進し、正常マウスでは反応を示さない極めて低用量の脊髄疼痛伝達物質を脊髄クモ膜下腔内へ投与することによっても、疼痛関連行動が発現することを明らかにしている。また興味深いことに、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおいて発現する疼痛関連行動は、正常マウスにおける疼痛関連行動と、その発現機構が著しく異なることも明らかにしている。このように、神経障害性疼痛時には脊髄疼痛伝達経路（一次知覚神経-脊髄）に機能変化が発現している可能性が示唆されているが、その全容ならびに詳細な機構については未だ不明のままである。

## 2. 研究の目的

難治性疼痛である神経障害性疼痛の発現には、中枢神経系の機能変化が深く関与していることが示唆されているが、詳細な発現機構については不明な点が多く、それゆえに未だ有効な治療法が確立されていない。

本研究課題では、脊髄疼痛伝達機構に焦点をあて、一次知覚神経障害による各神経系の可塑的变化を、行動薬理学的ならびに生理学的側面の双方から解明することにより、神経障害性疼痛の発現機構を明らかにし、その有効な治療法の確立を試みる。

## 3. 研究の方法

主な脊髄疼痛伝達物質（興奮性アミノ酸およびタキキニン類）およびその受容体に焦点を絞り、神経障害性疼痛時の脊髄疼痛伝達機構における機能的変化を解明すると共に、その情報を基に神経障害性疼痛に対する特異的治療法の開発を試みる。まず、(1) 神経障害性疼痛時における脊髄疼痛伝達物質の反応性の変化を、行動薬理学的に検討する。(2) 得られた結果を基に、神経障害性疼痛時に反応性が亢進している疼痛伝達物質の前駆体あるいは産生酵素の発現量の変化を、RT-PCR法により経日的に測定すると共に、その作用する受容体の発現量ならびにタンパク量の変化を、ウエスタンブロット法により経日的に測定する。また、神経障害性疼痛時に反応性が亢進している疼痛伝達物質ならびにその受容体の分布の変化を、免疫学的組織化学染色法により経日的に測定する。(3) さらに、神経障害性疼痛時における脊髄疼痛伝達物質の遊離量の変化を、マウス脊髄マイクロダイアリシス法を用いて経日的に測定する。(4) 神経障害性疼痛時にその機能が亢進していることが明らかとなった、脊髄疼痛伝達物質の抗体およびその作用する受容体の拮抗薬を用い、神経障害性疼痛の特異的治療法を開発する。

## 4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛の発現には、種々の神経伝達物質および各種受容体の関与が示唆されているが、末梢性の受容体の関与についての検討は少ない。そこで、興奮性アミノ酸であるグルタミン酸の受容体である NMDA 受容体およびカプサイシンに高感受性を示し一次知覚神経 C 線維に特異的に発現する TRPV1 チャンネルの関与について検討を行った。その結果、正常なマウスにおいて疼痛関連行動 (SBL 行動; scratching, biting, licking) を発現しない極めて低用量のグルタミン酸およびカプサイシンを、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスの右後肢足蹠内へ投与したところ、有意な SBL 行動が発現した。さらに、それぞれの拮抗薬の投与により、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマ

ウスにおいて、一過性のアロディニアの回復が認められた。これらの結果から、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現には、末梢性 NMDA 受容体および TRPV1 チャンネルの関与が示唆された。(2) 坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスでは、モデル作成後 3 日目以降において有意なアロディニアの発現が認められ、このアロディニアは 7~14 日後をピークとし、約 2 ヶ月にわたり維持されることを確認している。そこで、末梢性の関与が示唆されたグルタミン酸および一次知覚神経 C 線維における主要な神経伝達物質であるサブスタンス P およびヘモキニン-1 について、アロディニアの発現に対する経日的な関与を検討した。脊髄内におけるグルタミン酸の遊離量についてマイクロダイアリシス法を用いて検討したところ、アロディニアの形成過程において一時的な遊離量の増加が認められた。さらに、サブスタンス P およびヘモキニン-1 については、前駆体ペプチドの mRNA 発現量を RT-PCR 法を用いて定量した結果、両者の発現量に固有の変化が認められた。これらの結果から、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現には、複数の神経伝達物質がそれぞれ異なった役割を担っていることが示唆された。(3) 2000 年に新規タキキニン類として発見されたヘモキニン-1 は、サブスタンス P と極めて類似のアミノ酸配列を有し、中枢神経系および末梢神経系に広く分布し、さらにサブスタンス P と同様に NK1 受容体に極めて高い親和性を有することが明らかとなっている。また、脊髄クモ膜下腔内投与により、両者ともに特異的な SBL 行動を発現することを確認している。しかしながら、ヘモキニン-1 の疼痛制御機構における詳細な役割については未だ不明な点が多く残されたままである。上記(2)の結果から、ヘモキニン-1 が坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現に関与していることが示唆されたことから、ヘモキニン-1 の脊髄内における分布について免疫組織化学染色法を用いて検討を行った。その結果、正常マウスおよび坐骨神経部分結紮神経

障害性疼痛モデルマウスにおいて、サブスタンス P とは異なる変化が認められた。この結果から、極めて類似性が高いとされていた両者のタキキニンは、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現においては、異なる役割を果たしていることが示唆された。

以上の結果から、坐骨神経部分結紮神経障害性疼痛モデルマウスにおけるアロディニアの発現には、中枢神経系あるいは末梢神経系の種々の神経伝達物質が関与していることが明らかとなった。さらに、それらの伝達物質は、アロディニア発現においてそれぞれ異なる役割を果たし、それらが複合的に作用することによってアロディニアの発現・維持が行われていることが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

Hirokazu Mizoguchi, Takaaki Komatsu, Yoko Iwata, Chizuko Watanabe, Hiroyuki Watanabe, Tohru Orito, Soh Katsuyama, Akihiko Yonezawa, Kenji Onodera, Tsukasa Sakurada, Shinobu Sakurada  
Partial involvement of NMDA receptors and glial cells in the nociceptive behaviors induced by intrathecally administered histamine.

Neuroscience Letters 495, 2011, p.83-87, 査読有

DOI:10.1016/j.neulet.2011.02.038

Hirokazu Mizoguchi, Chizuko Watanabe, Tsukasa Sakurada, Shinobu Sakurada  
New vistas in opioid control of pain.

Current Opinion in Pharmacology 12, 2011, p.87-91, 査読有

DOI:10.1016/j.coph.2011.10.020

Chizuko Watanabe, Hirokazu Mizoguchi, Giacinto Bagetta, Shinobu Sakurada  
The involvement of the spinal release of glutamate and nitric oxide in peripheral noxious stimulation-induced pain-related behaviors -Study in mouse spinal microdialysis.

Neuroscience Letters 515, 2012, p.111-114,

査読有

DOI:10.1016/j.neulet.2012.02.091

Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Takayuki Higashiya、Satoshi Takeda、Kaori Moriyama、Akihiko Yonezawa、Takashi Kon-no、Hirokazu Takagi、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Distinct physiological role of amidino-TAPA- sensitive and DAMGO-insensitive  $\mu$ -opioid receptor splice variants in the mouse spinal cord. *European Journal of Pharmacology* 711, 2013, 80-86, 査読有

DOI:10.1016/j.ejphar.2013.04.014

Hirokazu Mizoguchi、Takashi Kon-no、Hiroyuki Watanabe、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Takumi Sato、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Involvement of spinal release of -neo-endorphin on the antinociceptive effect of TAPA.

*Peptides* 50, 2013, 139-144, 査読有

DOI:10.1016/j.peptides.2013.10.003

Hirokazu Mizoguchi、Hirokazu Takagi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Takumi Sato、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Involvement of multiple  $\mu$ -opioid receptor subtypes on the presynaptic or postsynaptic inhibition of spinal pain transmission.

*Peptides* 51, 2014, 15-25, 査読有

DOI:10.1016/j.peptides.2013.10.012

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Differential alternation of the antinociceptive effect of narcotic analgesics on the inflammatory pain state. *Neuroscience Letters* 560, 2014, 122-125, 査読有

DOI:10.1016/j.neulet.2013.12.020

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Kumiko Takeda、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Potential involvement of  $\mu$ -opioid receptor dysregulation on the reduced antinociception of morphine in the inflammatory pain state in mice.

*Journal of Pharmacological Sciences* 124, 2014, 258-266, 査読有

DOI:10.1254/jphs.13242FP

〔学会発表〕(計 29 件)

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Mechanism of reduced morphine analgesia in inflammatory pain state.

Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences (2011 年 9 月、仙台)

Asuna Otsuki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Different effectiveness of narcotic analgesics on multiple sclerosis-related chronic pain.

Italian-Japanese International Seminar for Neurosciences (2011 年 9 月、仙台)

青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

炎症性慢性疼痛時における morphine の鎮痛作用減弱について

第 5 回日本緩和医療薬学会年会(2011 年 9 月、千葉)

大槻明日奈、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

多発性硬化症疼痛に対する麻薬性鎮痛薬の効果

第 5 回日本緩和医療薬学会年会(2011 年 9 月、千葉)

青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

炎症性慢性疼痛時における morphine 鎮痛作用の減弱機構

第 62 回日本薬理学会北部会(2011 年 9 月、仙台)

青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

Involvement of altered  $\mu$ -opioid

receptors in spinal cord on the reduced morphine analgesia in inflammatory pain state.

第 85 回日本薬理学会年会 (2012 年 3 月、京都)

渡辺千寿子、溝口広一、米澤章彦、櫻田忍

化学的侵害刺激による脊髄内神経伝達物質の遊離量の変化 -マウス脊髄マイクロダイアリシス法による検討-

平成 24 年度東北薬科大学創薬センターシンポジウム (2012 年 5 月、仙台)

青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

炎症性慢性疼痛下における morphine の鎮痛作用減弱機構

平成 24 年度東北薬科大学創薬センターシンポジウム (2012 年 5 月、仙台)

小田桐遼、青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

難治性疼痛に対する脊髄 endomorphins の効果

第 63 回日本薬理学会北部会 (2012 年 9 月、新潟)

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Phosphorylation of mu opioid receptor reduced morphine analgesia in inflammatory pain state.

International Symposium for Neurosciences 2013 (2013 年 2 月、仙台)

Yuriko Endo、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Involvement of peripheral TRPV1 receptor in neuropathic pain.

International Symposium for Neurosciences 2013 (2013 年 2 月、仙台)

Ryo Odagiri、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Spinal antinociceptive effect of endomorphins in inflammatory pain and neuropathic pain.

International Symposium for Neurosciences 2013 (2013 年 2 月、仙台)

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Involvement of phosphorylation of  $\mu$ -opioid receptors on the bilateral reduction of morphine analgesia in inflammatory pain state.

第 86 回日本薬理学会年会 (2013 年 3 月、福岡)

溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

多発性硬化症疼痛に対する麻薬性鎮痛薬の効果

平成 25 年度東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム (2013 年 5 月、仙台)

青木祐太、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

$\mu$  受容体作動薬 ADAMB の脊髄における抗侵害作用発現機序

平成 25 年度東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム (2013 年 5 月、仙台)

Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Phosphorylation of mu opioid receptor reduced morphine analgesia in inflammatory pain state.

International Narcotic Research Conference (2013 年 7 月、Cairns (Australia))

Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Tsukasa Sakurada、Shinobu Sakurada

Effectiveness of amidino-TAPA against morphine-resistant neuropathic pain.

International Narcotic Research Conference. (2013 年 7 月、Cairns (Australia))

溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、長瀬博、櫻田司、櫻田忍

多発性硬化症疼痛に対する麻薬性鎮痛薬の効果

第 33 回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポ

ジウム (2013 年 9 月、神戸)

高木宏和、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

脊髄疼痛伝達機構に対する  $\mu$  受容体サブクラスの多樣的制御の解析

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

今野崇、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

デルモルフィン誘導体 TAPA の脊髄鎮痛作用発現機構

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

⑳ 菅原陵、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、菅野秀一、石川正明、櫻田忍

神経絞扼性癌性疼痛における麻薬性鎮痛薬の効果

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

㉑ 遠藤有里子、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

神経障害性疼痛における末梢性 TRPV1 受容体及び NMDA 受容体の関与

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

㉒ 角貴祐、溝口広一、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田忍

神経障害性疼痛における各種麻薬性鎮痛薬の効果

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

㉓ 長岡高史、勝山壮、溝口広一、小松生明、渡辺千寿子、米澤章彦、櫻田司、櫻田忍

CB1 受容体拮抗薬 AM251 は ERK の活性化を介して疼痛関連行動を起こす

第 52 回日本薬学会東北支部大会 (2013 年 10 月、仙台)

㉔ 渡辺千寿子

脊髄における疼痛伝達とその制御機構の解明

第 35 回東北薬学セミナー (2013 年 11 月、仙台)

㉕ Yuta Aoki、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Antinociceptive effect of narcotic analgesics against mechanical allodynia in inflammatory pain state.

第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月、仙台)

㉖ Ryou Sugawara、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Syu-ichi Kanno、Masaaki Ishikawa、Hiroshi Nagase、Shinobu Sakurada

The antinociceptive effect of opioid analgesics in neuropathic cancer pain.

第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月、仙台)

㉗ Takahiro Sumi、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Shinobu Sakurada

Antinociceptive effect of narcotic analgesics in neuropathic pain state.

第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月、仙台)

㉘ Takahiro Niida、Hirokazu Mizoguchi、Chizuko Watanabe、Akihiko Yonezawa、Hiroshi Nagase、Shinobu Sakurada

Antipruritic effect of kappa-opioid receptor agonist in mice.

第 87 回日本薬理学会年会 (2014 年 3 月、仙台)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺 千寿子 (WATANABE, Chizuko)

東北薬科大学・薬学部・講師

研究者番号: 90296020

### (2) 研究分担者

櫻田 忍 (SAKURADA, Shinobu)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 30075816

溝口 広一 (MIZOGUCHI, Hirokazu)

東北薬科大学・薬学部・准教授

研究者番号: 30360069