

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592289

研究課題名(和文) 脊髄における5HTレセプターの疼痛修飾機能の役割を明らかにする

研究課題名(英文) Pain modulation of 5HT receptor in spinal cord

研究代表者

二階 哲朗(Tetsuro, Nikai)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号：20314643

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄における5HTレセプターの疼痛修飾機能の役割を明らかにするため、5HT_{1B}/1D/1F に関する実験を行った。5HT_{1B}/1D/1Fのアゴニストであるスマトリプタンのくも膜下投与が炎症性モデルに効果があったことより、マウス・ホルマリン試験においてスマトリプタンの抗侵害受容作用がそれぞれのアンタゴニストにより抑制されるか、またアゴニストが抗侵害受容作用を示すか実験を行った。単独では効果がないが、コンビネーションにおいて抗侵害効果が発揮することを見出した。また癌性疼痛モデルにおいてはスマトリプタンは抗侵害受容作用はなく、またシナプス後の作用ではないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Sumatriptan is widely used for the treatment of migraine. This drug targets the serotonin receptor subtypes 1B, 1D, and 1F. Although clinical use of sumatriptan is only for headache, we have previously shown that intrathecal sumatriptan has antinociceptive activity in mouse behavioral models of non-migrainous, somatic and visceral inflammatory pain. Purpose of experiments were to investigate the detail mechanism of serotonin receptor subtypes. Pharmacological experiments with agonist and antagonist of each receptor were performed with formalin tests in mice. The anti-hyperalgesic property of intrathecal sumatriptan in the formalin test is not mediated by a single receptor subtype but by the combined action of the serotonin receptor subtypes 1B and 1D. In further experiments, we found that sumatriptan exerts its antinociceptive effect on the site of post synapse in spinal cord and sumatriptan does not have anti-hyperalgesic effect in cancer pain model.

研究分野：医歯薬学

キーワード：セロトニン 片頭痛 脊髄 動物行動学実験 トリプタン マウス

1. 研究開始当初の背景

トリプタン製剤は片頭痛の治療薬として広く臨床使用されている。その作用は主に三叉神経におけるセロトニン受容体 5-HT(5-hydroxytryptamine) 1B, 1D, 1F 受容体を介する。しかしトリプタン製剤の片頭痛以外の痛みへの効果は明らかではない。しかしこれらのレセプターのうち 5-HT_{1D} は脊髄後角や一次求心性神経(脊髄後根神経節)に受容体が存在し(Sonja P. J Neurosci, 2003) 炎症刺激によりそのレセプターが増強されることが明らかとなった(Andrew HA. J Neurosci, 2006)。三叉神経に効果がある薬剤であるため、他の疼痛、特に同レセプターが存在する脊髄を介する薬剤は効果があると考え、我々はスマトリプタンが脊髄機序の強い炎症モデルにおいて抗侵害受容作用があることを見出した(T.Nikai, 2007, Pain)。しかしこの現象がどのレセプターのサブタイプを介するのか、またまたどのような修飾機能を有するのかは不明であり、また炎症以外の疼痛にも効果があるかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

そのため、本研究費を使用し、炎症モデルにおけるトリプタンがセロトニン受容体 5-HT(5-hydroxytryptamine) 1B, 1D, 1F のどのサブタイプの修飾を受けるのか、また神経細胞においてシナプス前・後どちらにおいてトリプタンは効果があるのか、また癌性モデル・皮膚切開モデルなど臨床に近い疼痛モデルにおいては抗侵害受容作用を発揮するのか実験を行った。

3. 研究の方法

1) スマトリプタンと各 5-HT_{1B, 1D} に選択性の高いアンタゴニストを混合した薬剤のくも膜下投与を行い、ホルマリン

テストにおける疼痛行動を観察した。使用薬剤にはスマトリプタン 0.06 µg、スマトリプタン 0.06 µg + SB224289 1 µg (5-HT_{1B} アンタゴニスト)、スマトリプタン 0.06 µg + BRL15572 1 µg (5-HT_{1D} アンタゴニスト)、スマトリプタン 0.06 µg + SB224289 1 µg + BRL15572 1 µg とし、ホルマリン試験を行う 10 分前に上記薬剤を投与、投与後 2%ホルマリンを足底部に投与し 60 分間のマウスが足底部を舐める時間を測定した。

- 2) 5-HT_{1B, 1D, 1F} に対する選択性の高いアゴニストを単独、または組み合わせ、くも膜下投与し、ホルマリンテストにおける疼痛行動を観察した。使用した薬剤は・生理食塩液・CGS12066B 0.3, 1, 3 µg (5-HT_{1B} アゴニスト)・PNU142633 0.1, 0.3, 1 µg (5-HT_{1D} アゴニスト)・LY0.3, 1.0 µg (5-HT_{1F} アゴニスト)、CGS12066B 0.3 µg + PNU142633 0.1 µg, CGS12066B 1 µg + PNU142633 1 µg とし、実験 1 と同様のスケジュールにてマウス・ホルマリン試験を行った。
- 3) 5-HT_{1B, 1D} それぞれのアゴニスト・アンタゴニストを混合してくも膜下投与し、ホルマリンテストにおける疼痛行動を観察した。くも膜下に CGS12066B 3 µg (5-HT_{1B} アゴニスト)、CGS12066B 3 µg + SB224289 1 µg (5-HT_{1B} アンタゴニスト)、PNU142633 1 µg (5-HT_{1D} アゴニスト)、PNU142633 1 µg + BRL15572 1 µg (5-HT_{1D} アンタゴニスト) 投与し、実験 1) 2) と同様のスケジュールにてマウスホルマリン試験を行った。
- 4) サブスタンス P の足底投与および NMDA のくも膜下投与を行い、疼痛を誘発、同時にスマトリプタンの投与を行い、疼痛行動が抑制されるか実験を行った。
- 5) C3H/HeN 系マウス由来骨肉腫細胞 (NCTC-2472) を C3H/HeJ 系マウスの左大

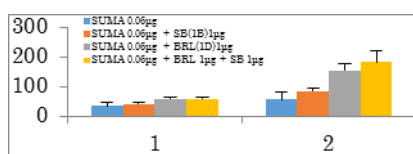
腿骨内に移植し、骨がん性疼痛モデルマウスを作製した。がんの骨転移による後肢の痛みを評価するため、がん細胞移植前、移植後1週間おきに4週間後まで痛みの評価を行った。がん細胞を含まない培養液のみを移植した群を対照群とした。測定には、フィラメントで後肢裏を刺激し、逃避反応で痛みの閾値を測定するフォンフライテストを行った。がん細胞移植後2週間後、炎症モデルにて効果のあったスマトリプタン0.06 および0.6 μ g のくも膜下投与を行い、アロディニアの効果を行った。

6) マウス足底部に切開を行う incision モデルを作成し、癌性疼痛モデル同様スマトリプタン 0.06 および 0.6 μ g のくも膜下投与を行い、フィラメントによるアロディニアの効果を行った

7) トリプタンはセロトニン系の薬剤であるため、情動行動にも変化を及ぼす可能性がある。癌性モデルにおいて疼痛が情動などに変化を及ぼす可能性がないか癌移植後2週間後、open field test, 明暗試験、社交性試験を行い疼痛関連行動の観察を行った。

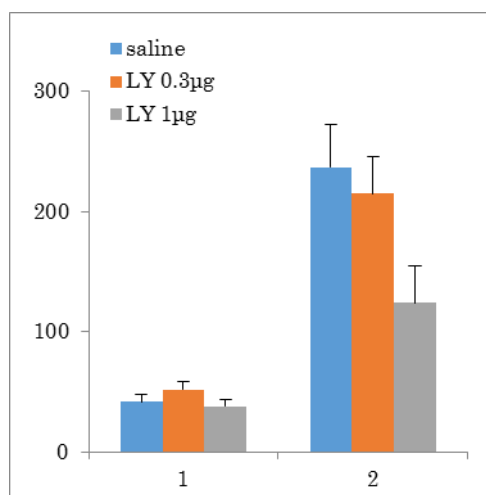
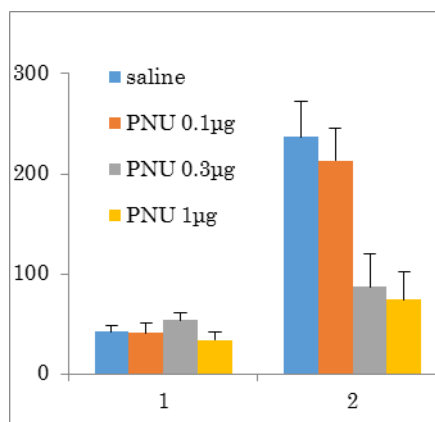
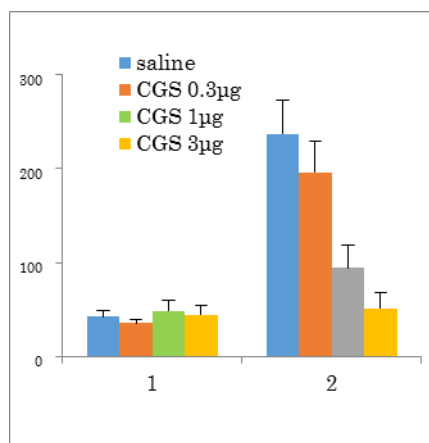
4. 研究成果

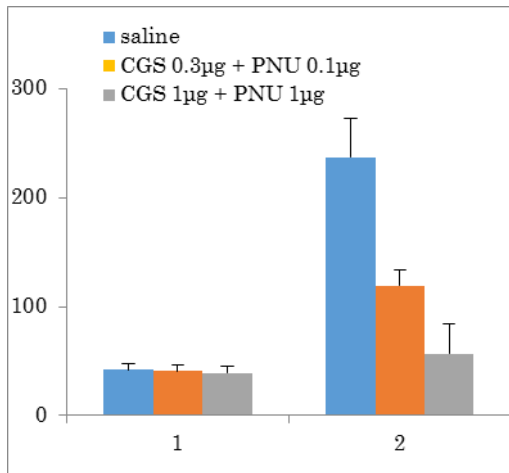
(1) マウス足底部にホルマリン投与することで2相性に下肢を舐める行動が観察されるが、Phase1 では認めなかったが、Phase 2 おいて 5-HT_{1B}, 1D のアンタゴニストはスマトリプタンの疼痛行動抑制効果を減弱させ、1B と 1D のアンタゴニストを混合すると有意にその効果を拮抗が観察された。



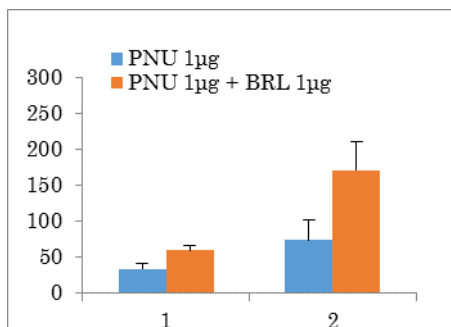
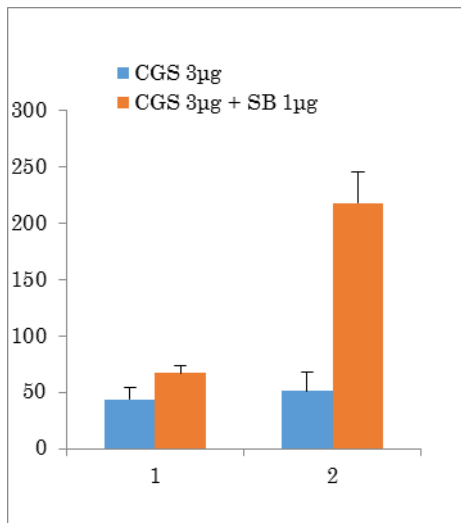
(2) 5-HT_{1B} アゴニストはくも膜下投与

した場合、Phase 2 において用量依存性に疼痛行動を抑制した。また 5-HT_{1D} アゴニストも用量依存性にホルマリンテスト Phase 2 の疼痛行動を抑制した。続いて行った 1B + 1D のコンビネーションにおいても、単独では効果を認めなかった用量にて phase2 において抗侵害受容作用の増強が観察された。





- (3) 5HT_{1B,1D} 両受容体のアゴニストはそのアンタゴニストと同時に投与することによりその効果が拮抗された。



- (4) スマトリプタンはサブスタンスPによる疼痛行動は抑制したが、NMDA 脊髄投与における疼痛行動の抑制は認めなかった。
- (5) 癌性モデルにおけるアロディニアにはスマトリプタンのくも膜下投与は効果を認めなかった。
- (6) 皮膚切開モデルにおいては、有意な

変化は認めなかったがスマトリプタン 0.06 および 0.6 µ のくも膜下投与の抗侵害作用が明らかとなった。

- (7) OF テストでは、sarcoma 群では、がん細胞移植前に比較し移植後 14 日目は運動量、立上り回数は有意に減少し、滞在時間においては、移植後は外側エリアでの滞在時間が有意に増加した。

明暗テストでは、sarcoma 群の明箱での運動量が、移植前と比較して移植後有意に低下した。

社交性テストでは、sarcoma-sarcoma 群の接触した回数が、移植前と比較して移植後有意に低下した。

これらの試験結果から疼痛治療薬の評価には機械的、熱に対する閾値の変化を見るだけでなく、情動などの疼痛関連行動の観察の必要性を強く示唆するものであり、トリプタンもまたセロトニン系の薬剤であるため、フィラメントでは効果はなかったが、今後違う実験系を用い抗侵害作用の実験を行う予定である。トリプタンは単独では癌の痛みにも効果がなかったことよりモルヒネ等の薬剤の補助鎮痛剤の使用が期待される。動物実験ではモルヒネは機械的、または熱に対する閾値は低下させるが自発行動や疼痛関連行動に対しての効果が少ないことが我々の実験からも明らかになってきた。そのため今回予定していたが、施行なかったがコンビネーションの実験も行っていく予定である。このような動物実験は今後のヒトにおける臨床使用への応用につながると期待している。

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 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

二階哲朗, 勝部由貴子, 太田淳一, 齊藤洋司: マウス骨癌性疼痛モデルにおける自発痛および疼痛関連行動の検討. 日本麻酔科学会第 61 回学術集会, 2014 年 5 月 15 日 ~ 17 日, パシフィコ横浜(横浜).

Katsube Y, Nikai T, Ota J, Saito Y: Characteristics of pain-related behavior in chronic inflammatory model and cancer pain model in mice. 米国麻酔科学会, 2013 年 10 月 12 日 ~ 16 日, サンフランシスコ (アメリカ).

Ota J, Nikai T, Imamachi N, Ahn AH, Saito Y: 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors contribute to the pain modulation in the spinal cord of mice. 14th World Congress on Pain, ISAP, 2012 年 8 月 27 日 ~ 31 日, ミラノ (イタリア).

太田淳一, 二階哲朗: スマトリプタンによる抗侵害受容作用はセロトニン受容体各サブタイプが複合して発揮する. 日本麻酔学会総会, 2012 年 6 月 7 日 ~ 9 日, 神戸ポートピアホテル・神戸国際展示場(神戸)

太田淳一, 二階哲朗, 勝部由貴子, 齊藤洋司: 5-HT_{1B}, 1D 受容体の脊髄における抗侵害受容への関与とトリプタンの脊髄鎮痛作用の検討. 第 34 回日本疼痛学会, 2012 年 7 月 20 日 ~ 21 日, 熊本市国際交流会館 (熊本).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 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 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

二階 哲朗 (NIKAI Tetsuro)
島根大学・医学部・准教授
研究者番号: 20314643