

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26460700

研究課題名（和文）上位中枢におけるプレガバリン・ガバペンチンによる鎮痛発現機序

研究課題名（英文）Analgesic mechanism of gabapentinoid in the brain

研究代表者

山本 達郎（YAMAMOTO, TATSUO）

熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・教授

研究者番号：20200818

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,900,000円

研究成果の概要（和文）：プレガバリン・ガバペンチンの作用部位であると考えられている  $\alpha 2 - 1$  の発現を、青斑核と中脳水道周辺灰白質で検討した。青斑核では  $\alpha 2 - 1$  は発現せず、近傍にある三叉神経中脳核に発現していることが分かった。坐骨神経切断により  $\alpha 2 - 1$  の発現に大きな変化はないことが示された。中脳水道周辺灰白質では、 $\alpha 2 - 1$  の発現はほとんど見られなかった。プレガバリン・ガバペンチンが青斑核を介して鎮痛効果を発揮していることが報告されてきたが、青斑核ではなく近傍の三叉神経中脳核に作用し、その結果として青斑核を活性化し鎮痛効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been suggested that pregabalin/gabapentin binds  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit of  $\text{Ca}^{2+}$  channel and produces an analgesic effect in the spinal dorsal horn. In the brain, pregabalin/gabapentin has been reported to act at locus coeruleus (LC) and to produce an analgesic effect, but there was no report to reveal the expression of  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit in the LC. In this study, we examined the expression of  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit in the brain, especially in the LC, PAG and the adjacent nucleus. We found that  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit was not expressed in the LC, but in the adjacent nucleus, the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve.  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit was not expressed in the PAG. We also found that nerve injury did not affect the expression of  $\alpha 2$ - $\delta 1$  subunit in the mesencephalic nucleus of the trigeminal nerve.

研究分野：麻酔科学

キーワード：青斑核 中脳水道周辺灰白質  $\alpha 2$  サブユニット ガバペンチノイド

### 1. 研究開始当初の背景

プレガバリン・ガバペンチンは、カルシウムチャンネルの  $\alpha 2\delta$  サブユニットを阻害することにより、鎮痛効果を発揮していることが示唆されてきている。プレガバリン・ガバペンチンは、脊髄後角における侵害刺激伝達をモデュレーションすることにより、鎮痛効果を発揮することが報告されている。この機序以外に下降性抑制系の起始核の一つである青斑核を介する機序が報告されている。しかしながら、プレガバリン・ガバペンチンの作用部位である  $\alpha 2\delta$  サブユニットの上位中枢における発現は、ほとんど報告がないことが現実である。この研究では、上位中枢での  $\alpha 2\delta$  サブユニットの発現を検討し、プレガバリン・ガバペンチンの上位中枢における作用発現機序を検討することにある。

さらに、プレガバリン・ガバペンチンは特に神経障害性疼痛での鎮痛効果が注目されており、急性痛に対する効果は強くない。このことは、神経障害により  $\alpha 2\delta$  サブユニットの発現が誘導され、その結果として神経障害性疼痛において良好な鎮痛効果が得られる可能性がある。さらに、プレガバリン・ガバペンチンは、日本のみならず各国の神経障害性疼痛治療ガイドラインで第1選択薬となっている。しかしながら、メタ解析によると NNT (number needed to treat) は 7.7 にすぎないことが知られている。このことは、プレガバリン・ガバペンチンが有効な神経障害性疼痛と無効な神経障害性疼痛が存在することが示唆される。このことは、 $\alpha 2\delta$  サブユニットの発現が誘導されやすい神経障害とされにくい神経障害が存在することが示唆される。また、神経障害から時間経過により  $\alpha 2\delta$  サブユニットの発現の発現に変化が出る可能性もある。

### 2. 研究の目的

動物実験では、プレガバリン・ガバペンチンはカルシウムチャンネルの  $\alpha 2\delta$  サブユニットのブロッカーであり、カルシウムチャンネルを抑制することにより脊髄での神経伝達物質放出が抑制することにより鎮痛効果が得られることが報告されている。しかしながら、慢性疼痛患者での研究では、髄腔内へ投与されたガバペンチンは鎮痛効果を示さないことが報告された。この原因は不明であるが、この臨床研究結果は  $\alpha 2\delta$  サブユニットのブロッカーの鎮痛効果発現に脊髄を介さない機序を介するものもあることを強く示唆している。

上位中枢では、ガバペンチンを  $\alpha 2\delta$  サブユニットの発現が少ない青斑核に直接投与することにより鎮痛効果が得られることが報告されている。青斑核では、ガバペンチンは GABA のシナプス伝達をシナプス前抑制にて抑制することにより青斑核細胞の脱抑制をおこし、その結果としてノルアドレナリンを介した下降性抑制系の賦活化を起こすことが知られている。

青斑核では  $\alpha 2$  サブユニットの発現は少ないことから、青斑核での作用が  $\alpha 2$  サブユニットを介した効果でない可能性が示唆されてきている。また、星状膠細胞を介した  $\alpha 2$  サブユニットを介さない効果も報告されてきている。このように、ガバペンチン・プレガバリンの神経障害性疼痛に対する鎮痛効果の作用機序は、解明されていない部分が多く存在するのが現状である。さらには、神経障害により上位中枢における  $\alpha 2$  サブユニットの発現がどのように変化するかについては、全く知られていない。

本研究では、上位中枢での  $\alpha 2$  サブユニットの発現部位を免疫染色にて確認することが第一の目的となる。さらに、神経障害を行うことにより、 $\alpha 2$  サブユニットの発現に変化が起こる可能性を検討することが目的となる。

### 3. 研究の方法

$\alpha 2$  サブユニットサブユニットは、少なくとも 4 種類の gene にコードされている  $\alpha 2-1$ 、 $\alpha 2-2$ 、 $\alpha 2-3$ 、 $\alpha 2-4$  が確認されている。このうち、プレガバリン・ガバペンチンは  $\alpha 2-1$  サブユニットに結合することにより、シナプスにおける神経伝達物質の放出を制御して、鎮痛効果を発揮すると考えられている。従って、今回の研究では特に、 $\alpha 2-1$  サブユニットに注目して研究を行った。

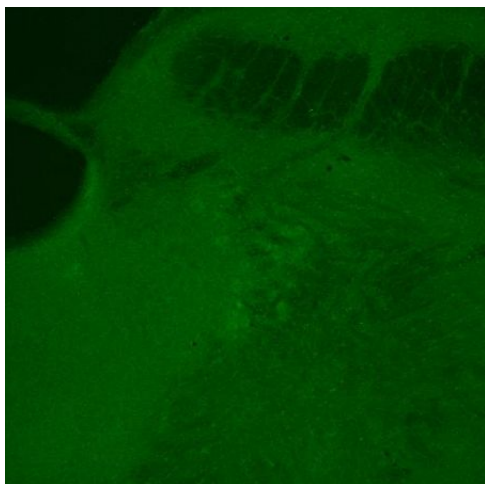
脊髄・青斑核 (locus coeruleus: LC)・中脳水道周辺灰白質 (periaqueductal grey: PAG)における  $\alpha 2-1$  サブユニット発現を免疫染色法により検討した。神経障害は、坐骨神経を結紮切断することにより作成した。神経障害後 1 週間で検討した。コントロールとして、シャム手術を行ったラットを用いた。シャム手術ラット及び神経障害性疼痛モデルラットは 4%パラホルムアルデヒド溶液により灌流固定を行った。延髄より上位の脳・脊髄腰膨大部を摘出する。脳は、ミクロトームを用いて 50 $\mu$ m の厚さの切片を作成して LC 部位の検討を行った。

免疫染色は、以下の通り 2 重染色を行った。5% 馬血清及び 0.3% Triton x-100 含有 PBS に 1 時間浮遊させた後、1:1000 に希釈した  $\alpha 2-1$  抗体と dopamine- $\beta$ -hydroxylase (DBH) 抗体を 24 時間反応させた。洗浄の後、1:100 に希釈した 2 次抗体を 3 時間反応させてから観察を行った。

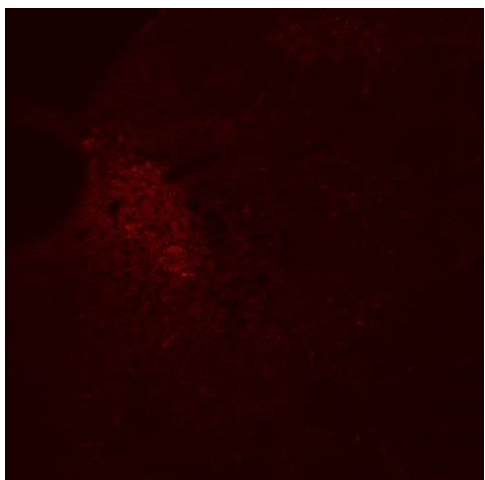
一次抗体として、Origine 社製の  $\alpha 2-1$  抗体 (rabbit) を用いた。LC のマーカーとして、Millopore 社製の DBH 抗体 (mouse) を用いた。2 次抗体として、Donkey anti-rabbit IgG (Alexa Fluor 488, green)、Donkey anti-mouse IgG (Alexa Fluor 647, red) を用いた。共焦点レーザー顕微鏡 (FV 1200, Olympus 社製) を用いて観察を行った。

2. 研究成果  
代表的な染色例を以下に示す。

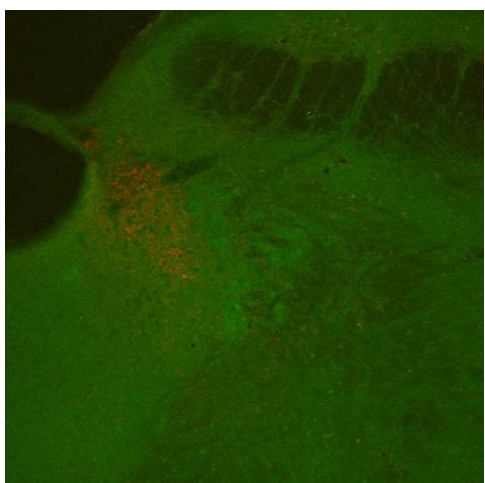
### シヤム手術後 1 週間



LC (シヤム手術側) における 2 -1



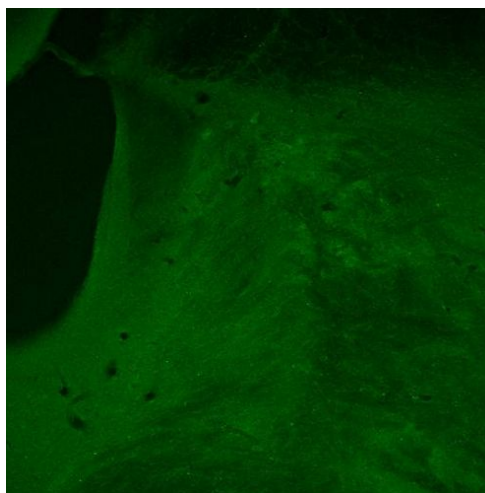
LC (シヤム手術側) における DBH



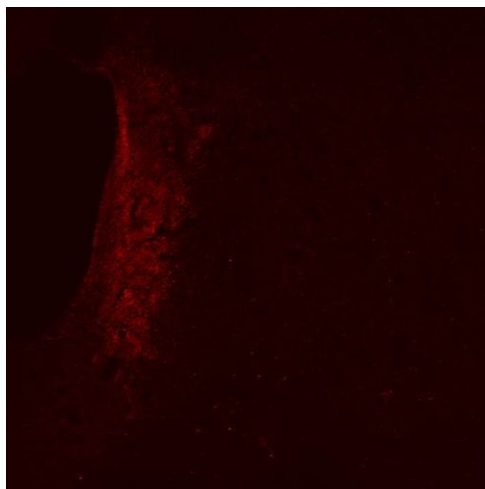
LC における Merge させた画像

### 神経損傷後 1 週間

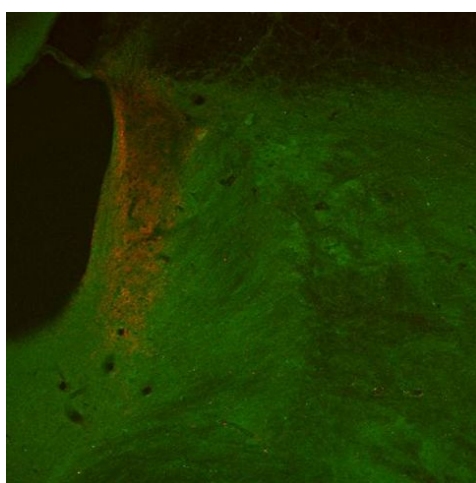
神経損傷後 1 週間



LC (神経損傷側) における 2 -1



LC (神経損傷側) における DBH



LC における Merge させた画像

図に示した通り、青斑核では 2 -1 は発現せず、近傍にある三叉神経中脳核に発現していることが分かった。坐骨神経切断により発現に大きな変化はないことが示された。

図は示していないが、2 -1 は脊髄後核に発現していることが分かった。今回の検討では、坐骨神経切断では発現に大きな変化はないことが示された。

また、中脳水道周辺灰白質では、2 -1 の発現はほとんど見られなかった。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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

山本達郎 (YAMAMOTO, Tatsuo)

熊本大学・大学院生命科学研究部麻酔科学・教授

研究者番号: 20200818

##### (2)研究協力者

野中 崇広 (NONAKA, Takahiro)

篠崎 友哉 (SHINOZAKI, Tomonari)