

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893032

研究課題名(和文) 神経栄養因子シグナルを用いた下行性抑制系の強化による新規慢性痛治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel therapy for chronic pain patients by enhancing the descending pain inhibitory systems via BDNF signalings

研究代表者

須藤 貴史 (Suto, Takashi)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60739621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害による痛みが慢性化したラットにおいて、記憶やその想起に関する前頭前皮質機能や、動物が元来持つ痛みを抑制するしくみである内因性鎮痛機構が弱まることが再確認された。また、同モデルにおいて行動実験で脳由来神経栄養因子(BDNF)シグナルの増強が認知機能の改善をもたらし、ノルアドレナリンを介する内因性鎮痛機能を改善することがわかった。また、免疫染色により、これらの現象は青斑核の興奮性の変化による可能性が示された。現在、マイクロダイアライシスによる機能的な変化を調査中である。

研究成果の概要(英文)：Chronic nerve injured animals showed decreased prefrontal cortex function including cognition. They also showed decreased pain evoked pain inhibition. Treatment with TrkB receptor agonist (7,8-dihydroxyflavone) partially restored those impairment of PFC related function as reported before. TrkB agonist also restored pain evoked analgesia via noradrenergic activation. Immunohistochemistry of Locus coeruleus suggested the TrkB agonist improves excitation of noradrenergic neurons in locus coeruleus. Microdialysis studies are scheduled to examine the balance of glutamate and GABA signalings in locus coeruleus.

研究分野：麻酔科学

キーワード：慢性痛 神経障害性疼痛

1. 研究開始当初の背景

術後慢性痛は治療が難しく、現時点では発症の予防も難しい。これは術後慢性痛の多くが治療の難しい神経障害性疼痛の性質を持つためであると考えられている。これまでの研究から、神経障害後に神経栄養因子のひとつである Brain Derived Neurotrophic Factor(BDNF)を介したシグナルにより、脳幹の青斑核を起源とし、脊髄後角で作用するノルアドレナリン(NA)作動性神経を介した内因性鎮痛機構(下行性抑制系)の活性化が起こることが報告されている。しかし、慢性術後痛患者では、この下行性抑制系の機能が不十分であることも報告されている。

1) 術後慢性痛

術後慢性痛は急性期(数日から数週間)の痛みと異なり、多くが神経障害性疼痛に類似した性質を持つ(Haroutiunian et al. 2013)。そのため、適切な治療を行っても治癒が難しい。頻度は術式により様々だが、少なく無く(Macrae 2008)、予防が重要と考えられる。ヒトが元々持つ鎮痛機構である下行性抑制系の機能異常と術後痛の慢性化が相関を示すという報告があり(Yarnitsky et al. 2008)、発症リスクの高い患者を拾い上げられる可能性はあるが、確立した予防法はない。

2) 慢性痛における BDNF シグナルと下行性抑制系機能

神経障害後の比較的早期には脊髄で BDNF の増加、TrkB 受容体を介したシグナルにより NA 作動性神経の軸索の増加、NA 含有量の増加、基礎放出量の増加が起こることが報告されている(Hayashida 2011; Hayashida et al. 2008a)。増加した NA は脊髄後角において、アドレナリン₂受容体を介して、一次求心性繊維からのグルタミン酸やサブスタンスPなどの興奮性神経伝達物質の放出を抑制し、鎮痛的に作用する。また、我々の予備実験から TrkB 作動薬である 7,8-Dihydroxyflavone の髄腔内投与

(10 μ g/10 μ L, 7日間)により脊髄における NA 含有量、NA 合成酵素である Dopamine beta Hydroxylase (D_{BH})の増加、アセチルコリン作動性神経に見られる Choline Acetyltransferase の増加を確認している。また、アドレナリン₂受容体作動薬であるクロニジン(3 μ g 髄腔内)の鎮痛作用を増加することが観察され、TrkB 作動薬により下行性抑制系機能を増強できる可能性が示された。神経障害性疼痛では、一般的に使用されている鎮痛薬を用いて疼痛を制御するだけでは神経障害による疼痛の慢性化を抑制できないことが報告されている(Yang et al. 2014)。神経障害により惹起される変化を長期間にわたり抑制することが必要と考えられ、神経栄養因子として神経保護作用も持つ TrkB 作動薬が神経障害による発痛的な変化を抑制あるいは回復させる可能性も考えられる。

2. 研究の目的

本研究では中枢神経系に存在する BDNF 受容体のひとつである tropomyosin receptor kinase B (TrkB)の作動薬による処置が下行性抑制系機能を回復させるか否か、慢性術後痛の予防および治療となりうるか否かを検討する。

(1) TrkB 作動薬の疼痛モデルに対する作用

疼痛モデルにおける疼痛閾値に対して、TrkB 作動薬を用いた処置が疼痛の回復を促進しうるかを行動実験により評価する。また TrkB 作動薬処置により、下行性抑制系を賦活化する鎮痛薬の作用を増強するか否かを検討する。

(2) TrkB 作動薬のノルアドレナリン作動性神経の機能に与える作用の評価

TrkB 作動薬による処置が脊髄における NA の基礎放出量にどのような影響を与えるか、microdialysis 法による検討を行う。さらに、脊髄後角での NA 放出を促進させ、アドレナリン₂受容体を介して、一次求心性感

覚神経からの興奮性神経伝達物質の放出を抑制し、鎮痛作用を発揮していると考えられている鎮痛薬を投与し、前後での NA 濃度の上昇率を比較する。Vehicle 群と比較することで TrkB 作動薬処置が NA 作動性神経の機能に与える影響を検討する。また、TrkB 作動薬処置後の脊髄組織中の NA 含有量がどのように変化するか観察する。

(3) 徐放型 TrkB 作動薬作成のための基礎実験

徐放型 TrkB 作動薬作成の予備実験として、術後慢性痛予防に必要な TrkB 作動薬の投与量、投与期間の検討を行う。目的 1 で行う行動実験と、目的 2 で行う microdialysis 法による実験は我々の予備実験での投与量である (10 μ g 髄腔内、7 日間) および、アルツハイマー型痴呆モデルとストレスモデルで報告のある投与量(5mg/kg 腹腔内、10 日間)を用いる。投与量および期間の増減を行い、術後慢性痛予防および治療に有効と思われるものを検討する。また、徐放性 TrkB 作動薬の作成を行い、in vitro における薬剤放出様式や構造的特徴につき観察する。

3. 研究の方法

神経障害性疼痛の要素を持つ慢性痛モデルとして Chung らの L5/L6 spinal nerve ligation (SNL)モデルと partial sciatic nerve ligation model (pSNL)モデルを用いる。我々の先行研究から SNL モデルでは神経障害後 6 週程度になると内因性鎮痛機能が減弱していることがわかってきたため、神経障害性疼痛慢性期としての検討をする。TrkB 作動薬として 7,8-Dihydroxyflavone(7,8-DHF)を用いる。7,8-DHF を間欠的に投与した後、下記の 3 部分から構成される実験を行う。

(1) 痛みの行動実験

神経障害をともなう術後の疼痛閾値の経時的变化を von Frey filament test および paw

pressure test による行動実験で観察する。NA を介した鎮痛機序を持つ抗うつ薬、慢性痛治療薬であるデュロキセチンの鎮痛作用に与える影響の検討も行う。

(2) 下行性抑制系機能に与える影響の検討
脊髄および脳組織中の NA 含有量の測定。microdialysis 法による脊髄後角における NA 基礎放出量および鎮痛薬投与後の NA 測定。青斑核のノルアドレナリン作動性神経の興奮性を興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸と抑制性伝達物質の GABA とのバランスを測定することで検討する。

(3) 免疫組織学的手法による検討

脊髄および青斑核における NA 作動性神経の解剖学的変化を Dopamine beta hydroxylase の染色により観察する。また、青斑核の NA 作動性神経の興奮性の違いを pCREB などのマーカーの染色により検討する。また、興奮性と抑制性いずれのシグナルに変化があるのか、受容体や伝達物質の観点からも検討する。

これら 3 つの手法を用いて、神経障害性疼痛モデルラットの 7,8-DHF 処置群、非処置群で比較することによって、7,8-DHF が下行性抑制系機能に与える影響を観察し、神経障害をベースとする慢性痛が予防されるかを明らかにする。

4. 研究成果

(1) 疼痛行動への影響

von Frey test による検討で、神経障害性疼痛モデルラット(SNL)は障害直後から慢性期に至るまで長期にわたり、軽度の触刺激においても逃避反応を示した。これは異痛症と呼ばれる状態を示す。7,8-Dihydroxyflavone による処置後もこの状態は変化しなかった。しかし、慢性痛治療薬として使用されるデュロキセチンを投与した場合、7,8-Dihydroxyflavone 処置群では非処置群

と比較して強い鎮痛効果が見られた。デュロキセチンは内因性鎮痛機構を利用して鎮痛作用を発揮するとする報告もあり、今回の結果からは 7,8-Dihydroxyflavone が内因性鎮痛機構を増強した結果、デュロキセチンの鎮痛作用が強まった可能性が示唆された。

(2) ノルアドレナリン作動性神経の機能に与える作用

現在、正常動物と神経障害性疼痛モデルで青斑核周囲のマイクロダイアライシスによるグルタミン酸 / GABA の同時測定を行っている。興奮性伝達物質と抑制性伝達物質のバランスから 7,8-DHF の青斑核に対する作用のメカニズムを調査中である。

また、免疫染色における検討では青半角のノルアドレナリン作動性神経において、神経の興奮が起こったことを示すマーカーのひとつである pCREB の免疫染色を行った。カプサイシンによる痛み刺激を与えたところ、神経障害性モデルの慢性期では正常動物と比較して興奮した細胞数が少なかった。7,8-Dihydroxyflavone 処置により興奮性は正常と同程度になった。

現在、今後は青斑核の神経細胞間のシグナル伝達に与える影響をグルタミン酸受容体 (GluR)、およびグルタミン酸神経の入力 (VGLUT) および GABA 神経の入力 (GAD67) の免疫染色により検討を行っている。これにより興奮と抑制のバランスを形態学的側面からも検討する。

脊髄における検討では Dopamine beta hydroxylase の染色性に関して、いずれの群においても密度に差は見られなかった。前頭前皮質における検討でも同様であった

(3) 徐放薬作成のための基礎実験

7,8-Dihydroxyflavone は 5mg/kg/day をもちいて行動実験および免疫染色を行った場合、内因性鎮痛の増強や、既存の鎮痛薬の鎮痛作

用増強、免疫染色での青斑核の興奮性の回復作用を示した。しかし、投与終了から 1 週後にデュロキセチンの鎮痛作用を再検討した結果、その効果は観察されなかった。このことから、TrkB 作動薬処置に持続的な効果がないことが示唆され、徐放薬などによる持続投与が有効な可能性も示された。神経障害後の時期による作用の違いも示唆されるため今度検討していく。

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)

[学会発表](計 1 件)

(1) 神経障害性疼痛モデル慢性期における内因性疼痛抑制系の機能減弱と Brain Derived Neurotrophic Factor の役割、須藤貴史、小幡英章、齋藤繁(第 37 回日本疼痛学会 2015 年 7 月 3 日～4 日 熊本市市民会館(熊本県、熊本市))

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 貴史 (SUTO, Takashi)
群馬大学 医学系研究科 助教
研究者番号: 60739621

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: