

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：23803

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670041

研究課題名(和文) 神経因性疼痛に随伴する血流障害の緩和による疼痛治療の可能性

研究課題名(英文) Does treatment of blood flow decrease, a complication of neuropathic pain, can be a target of pain palliation?

研究代表者

齊藤 真也(Saito, Shin-ya)

静岡県立大学・薬学部・准教授

研究者番号：80271849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：我々は皮膚血管では電位依存性Caに対する依存度が他の血管よりも低いため、温度低下に対する耐性が高く、収縮が維持されることを見出した。一方神経損傷モデルラットでは交感神経の損傷に伴い、細胞内Ca排出が減った結果血管の収縮応答性が亢進し、少ない刺激で大きく収縮することが明らかとなった。これらのことを合わせて考えると、神経損傷モデル動物の皮膚血管では弱い収縮刺激を受けて、すでに血管が収縮している状態にあることが示唆された。そこで、血管を拡張させる薬を投与したところ、血流が回復するとともに、痛みに対する感受性が下がった。以上のことから血管を拡張させることが神経因性疼痛治療になりうることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Dependence on voltage-dependent Ca channel (VDCC) is relatively low in skin artery comparing with other arteries. This may account for its tolerance on low temperature, since activity of VDCC is decrease in low temperature. In sciatic nerve-injured model rat, damage of sympathetic nerve is accompanied with decrease of Ca extrusion in planter artery, which results in increase of response to contractile stimuli. This suggests that weak stimuli are enough to induce sufficient contraction in injured site. According to this opinion, we administrated low dose of vasodilator which showed vasodilation with increase in pain threshold. In this study, we demonstrated that treatments which cause vasodilating response can be tools for treatment of pain.

研究分野：循環器薬理学

キーワード：神経因性疼痛 皮膚血管 電位依存性Caチャネル Na/Ca交換体 血管拡張 温度依存性

## 1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は治療の困難な慢性疾患で、多くの患者の QOL を著しく低下させている。その原因は様々であり、疼痛の発生機序も不明であるため、治療のためのエビデンスが不足しているのが現状である。現象論的には神経傷害によって、一次求心性神経上での受容体が増加することが知られている。神経因性疼痛は循環障害も併発しており、過度の交感神経刺激を与えると神経因性疼痛患者の皮膚血流が極度に減少すること、また疼痛動物モデルの皮膚血管においても同様に血流が減少することが知られており、交感神経に対する皮膚血管の過剰な応答であると解釈されている。神経因性疼痛治療に交感神経ブロックが一定の効果を示すが、同時のこの処置においても血流が改善していることは注目に値する。なぜならば、血流と疼痛に関しての視点を変えれば、そもそも血流障害が疼痛を引き起こすことはレイノー病や閉塞性動脈硬化症でも認められていることであり、これらの治療法は神経因性疼痛と血流障害の因果関係を逆に考えることが可能であることを示唆しているからである。しかし根本的な問題は、疼痛患者や疼痛モデル動物において、皮膚血管の血流が障害されることが知られているにもかかわらず、その発症機序については全く明らかになっていないのである。すなわち、疼痛と血流障害の因果関係を考える以前に血流障害が起きるメカニズムを明らかにする必要があるためである。

## 2. 研究の目的

以上の背景のもと、最終目標を神経因性疼痛治療の新たなストラテジーを明らかにすることとし、そのため本課題では段階的に目的を3つに分けることとした。

(1) 皮膚血流の異常を理解するにあたり、我々はまだ皮膚血管と深部血管の収縮の反応の違いを十分には理解していない。そのため血流障害反応が皮膚血管に特有の機能に関連しているのか、それともより普遍的な機構を介しているのかを判断できるだけの知見を得る必要がある。そのためにまず、皮膚血管と深部血管の収縮応答性、収縮制御の差異を明らかにすることを第一の目的とした。

(2) 第二に疼痛モデルラットにおける皮膚血管の収縮応答性亢進反応のメカニズムの解明を目的とした。

(3) 上記二つの目的を達成したところで、それらの知見をもとにし、神経傷害時における皮膚血管収縮応答性亢進抑制に基づく疼痛緩和の可能性を目指していくことを最終目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、皮膚血管として尾動脈と足底動脈を、深部血管として総腸骨動脈と大動脈をラットより単離して用いた。皮膚血管と深部血管の比較実験では雄性 Wistar ラットより尾動脈および総腸骨動脈、大動脈をそれぞれ単離し、約 2 mm 幅のリング標本を作製した。太さ 40  $\mu\text{m}$  のタングステンワイヤーを2本通し、片方をホルダーに、片方をトランスデューサーに接続した。恒温槽内は 5%  $\text{CO}_2$  および 95%  $\text{O}_2$  の混合ガスで通気し、37 に加温した Krebs-Henseleit 緩衝液で満たし、常法にしたがって収縮張力を測定した。

神経因性疼痛モデル動物には Bennett 及び Xie の慢性絞扼性神経損傷 (Chronic constriction injury: CCI) モデルを採用した (Bennett GJ & Xie YK, Pain, 1988, 33:87-107)。雄性 Wistar ラットの片方の坐骨神経を 4-0 プレイドシルクを用い、約 1 mm 間隔で 4ヶ所絞扼することで、CCI 手術とした。4週間後に術足側および無術足側それぞれから足底動脈を単離し、約 2 mm 幅のリング標本を作製した。これを上記の方法と同様にホルダーとトランスデューサーに接続し、収縮張力を測定した。

また雄性 C57BL/6J マウスに対しては片方の坐骨神経を 3-0 プレイドシルクを用い、約 1 mm 間隔で 3ヶ所絞扼することで、CCI 手術とした。4週間後マウスを保定器内に静置し、足底部の皮膚表面に対する von Frey Hair 法によって疼痛の閾値を測定した。また、同部位に対する接触型プローブを用いて、レーザー Doppler 血流計により正常足および術足の足底部皮膚血流量を測定した。両足からの摘出足底動脈は太さ 20  $\mu\text{m}$  のタングステンワイヤーを用いて同様にホルダーとトランスデューサーに接続し、収縮張力を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 尾動脈と総腸骨動脈、大動脈で、37 と 24 におけるフェニレフリン (PE) に対する収縮応答性を比較すると、尾動脈では PE に対する最大収縮反応が 24 で増加したのに対して、総腸骨動脈では減弱していた。さらに、大動脈派では 24 では半減していた。興味深いことに 37 におけるニフェジピン (Nif) による抑制作用は、総腸骨動脈においてより強く現れたことから、PE 誘発性収縮において、尾動脈における電位依存性  $\text{Ca}$  チャネル (VDCC) の寄与は総腸骨動脈におけるそれよりも大きいことが明らかとなった。Marti らは尾動脈には  $1_A$  受容体が、大動脈には  $1_D$  受容体が、そして総腸骨動脈にはその両方が発現していることを報告している (Marti D et al., Am J Physiol, 2005, 289:H1923-H1932)。そこで各受容体サブタイプ拮抗薬の作用を 37 と 24 で比較したところ、37 では  $1_D$  受容体拮抗薬が大動脈と総腸骨動脈の PE 誘発性収縮を右方シフトさせ、 $1_A$  受容体拮抗薬が尾動脈におけるそれ

を右方シフトさせたのに対して、24 では尾動脈での  $\alpha_1$  受容体拮抗薬の作用が 2 相性となり、新たな受容体サブタイプの存在が示唆された。この現象については今後さらに検討を重ねる必要がある。一方 PE 誘発性収縮に対する LOE908 単独及び LOE908+Nif の抑制作用を比較したところ、尾動脈では差がなかったのに対して、総腸骨動脈はさらに抑制作用が増強された。このことは、尾動脈では LOE908 感受性チャネルによって脱分極が起きるのに対して、総腸骨動脈では LOE 非感受性チャネルも加わり、より脱分極成分が大きくなっていることが示唆された。VDCC は Q10 が大きく、極めて温度感受性の高いチャネルである。このことから、尾動脈では総腸骨動脈に比べてこのチャネルへの依存度が減ることによって、温度低下に対する抵抗性が生じていることが示唆された。

(2) 摘出足底動脈において、PE および TP 受容体刺激薬である U46619 刺激に対する濃度 - 収縮曲線を検討したところ、どちらの場合でも、術足側の足底動脈の方が正常足側のそれよりも左方シフトしていた。すなわち、術足足底動脈における収縮応答性の亢進は旧来考えられていたような  $\alpha_1$  受容体発現量の増加では説明できないことが示された。一方神経刺激に対する収縮応答性は術足側で低下しており、CCI 手術によって交感神経が障害されたままであることが示され、また徐神経後の血管で見られる supersensitivity に似た状況であることも示された。

受容体作動性 Ca チャネル阻害薬および VDCC 阻害薬存在下での PE に対する反応性を、術足側と正常足側で比較したが、いずれの場合も術足側血管の方が正常足側血管よりも感受性が亢進したままであった。そこで血管平滑筋の Ca 排出経路として知られている Na/Ca 交換体(NCX)の阻害薬 KB-R 7943 存在下で比較したところ、濃度反応曲線に差が見られなくなった。これは術足側に比べて KB-R 7943 によって正常足側で大きく反応曲線が左にシフトしたためである。このことから、CCI ラットでは何らかの機構により、NCX による Ca 排出機能が低下することにより、収縮刺激に対する応答性が亢進している事が示された。しかし NCX の逆回転モード選択的阻害薬 SEA0400 では亢進抑制効果が見られなかったことから、NCX を介した収縮応答性の亢進は、NCX の逆回転による Ca 流入ではなく、順方向での Ca 排出機能の低下によるものと考えられた。

(3) 作製した CCI マウスの両足で血流量と疼痛閾値を測定し、両者の相関性を検討したところ、相関性が認められた。足周囲温を 22 から 10 に低下させても疼痛閾値は変化しなかったが、37 に上昇させると閾値が有意に上昇した。残念ながら皮膚血流量の温度感受性を本研究終了時までには定量することが

できなかったため、推測の域を出ることができないが、(1)の結果から考察すると、すでに CCI によって収縮状態にある皮膚血管が温度上昇によって正常足のそれよりも強く改善されることが予想される。したがって温度上昇によって双方の足でどの程度血流が改善されるのかは重要なポイントであり、引き続き実験を継続していく。

一方(2)の結果から CCI 術足血管では細胞内 Ca の動員効率が高まっており、同程度に収縮を引き起こすには、術足側の方が Ca の流入量が少なく済むことを示している。つまり裏を返せば同程度の収縮では術足側の血管の方が細胞内シグナル伝達抑制に感受性が高くなる可能性を示している。それを踏まえ、細胞内 cAMP 量を増加させる 受容体作動薬 salbutamol の作用を CCI ラット摘出足底動脈で検討したところ、術足側では収縮を強く抑制したのに対して、正常足側ではそれほどの抑制効果は見られなかった。そこで CCI マウスに低用量の salbutamol を投与したところ、術足の血流量が増加する傾向がみられた。さらに von Frey 法により痛みに対する閾値を測定したところ、投与により有意に痛みが緩和した。

以上のことから、CCI モデル動物の足底動脈は NCX による Ca 排出が低下し、supersensitivity 状態にあるが、それゆえに収縮抑制刺激にも高感受性であると考えられる。温熱や血管拡張が疼痛治療の手段になりうることを本研究結果は示唆している。

## 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 0 件)

〔学会発表〕(計 12 件)

〔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

齊藤真也 (SAITO, Shin-ya)  
静岡県立大学・薬学部・准教授  
研究者番号：80271849

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：