

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25870459

研究課題名(和文) MEKを標的とする化学修飾フラボノイドによる神経障害性痛治療薬の開発

研究課題名(英文) Developing drug for neuropathic pain by chemically modified flavonoids targeting MEK

研究代表者

松岡 義和 (Matsuoka, Yoshikazu)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：20509434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今研究はフラボノイドの一種であるケルセチン及び派生化合物の神経障害性痛に対する効果の検討を目的とした。ケルセチン経口投与による神経障害性痛への治療効果の検討では、ラット神経障害性痛モデル(Spared nerve injuryモデル)でケルセチン前投与により痛みは有意に改善した。しかし後投与では有意な効果を示さなかった。ラットの後根神経節の免疫染色、ウエスタンブロットではアストロサイト活性化マーカーであるGFAPがケルセチン投与により抑制されていた。これらの結果からケルセチンによる鎮痛効果は後根神経節のサテライトセルの活性化を抑制することが主な機序と考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the effect of quercetin on the neuropathic pain in the rat model. Pre-treatment of neuropathic pain by oral administrated quercetin prevented the development of pain behavior in the rat with spared nerve injury model. On the other hand, post-treatment failed to reverse the pain behavior. Immunohistochemistry and western blotting showed significant suppression of GFAP protein, a marker of astrocyte activation, in dorsal root ganglion in the treated rats. These results showed that the effect of quercetin on the neuropathic pain was mediated by the suppression of activation of satellite glial cells in dorsal root ganglia.

研究分野：麻酔学

キーワード：フラボノイド ケルセチン 神経障害性痛

1. 研究開始当初の背景

神経障害性痛の原因は未だ不明であり、既存の治療薬が有効でないことが多いため、これまで様々な分子が新規治療のターゲットとして研究されてきた。細胞内シグナル伝達経路の一つである MAPK もその一つであり MEK 阻害剤の有効性を示す動物実験は多い。しかし MEK1 阻害剤は少数の治験薬またはヒトに投与できない薬物しかない。そのため申請者は米国 FDA の承認済み医薬品約 700 種のライブラリから MEK1 阻害作用をもつ薬物をスクリーニングした。その結果、フラボノイドが強い MEK1 阻害作用を持つことを見出した。このことからフラボノイドの神経障害性痛治療薬としての可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究は化学修飾フラボノイドと天然フラボノイドの神経障害性痛に対する治療効果を検討することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

モデル動物による行動学的評価；ラットの坐骨神経の分枝を結紮、切断することにより神経障害性痛のモデル動物を作成する。これによりラットは後肢の足底の痛覚過敏を示すようになり、薬物の経口投与による痛み閾値の変化を観察する。

痛みの評価；ラットの足底に固さの異なるフィラメントを柔らかい物から順に押し当て逃避行動を示す閾値を求め（機械的刺激に対する 50% 閾値）、またラットをガラス製の床の上に置き、ガラスの下から足底に熱線をあて、逃避行動を示すまでの時間を測定する（熱潜時）。モデル作成前および作成後 3、5、7、10、14 日目に測定する。モデル作成前から低い閾値を示すラットは使用しない。

ケルセチン経口投与；ケルセチンは溶媒に溶けにくく静脈内投与、腹腔内投与では投与量が限られること、臨床投与時には経口投与となることから、ケルセチンを飼料に混合し投与する。ヒトへの経口投与時の血中濃度は研究されており、経口摂取により前述のウェスタンブロット実験での抑制濃度 (1 μM) に到達することが報告されている。予備実験により 1 日の平均食餌摂取量を求めたので、これにより最大 1g/kg/日となるように飼料を調整し標準飼料と混合することで摂取量を調節する。投与期間は (1) モデル作成前からの前投与、(2) 痛み発症後からの投与、につき実験を行う。体重の増加量、飼料消費量を連日記録し薬物による異常がないことを確認する。

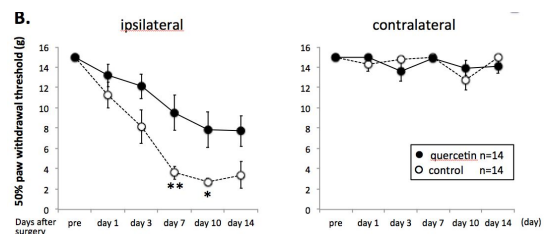
組織学的評価；観察期間後、深麻酔下に腰部後根神経節、脊髄を摘出し、蛍光免疫染色、ウェスタンブロットを行う。MEK1 阻害作用の結果である活性化 ERK1/2、また脊髄ミクログリア細胞、アストロサイトのマーカー OX42、GFAP などを測定する。麻酔時に同時に血液を

採取する。ケルセチン血中濃度を測定し、ヒトで報告されている血中濃度との相関を求める。これによりヒトでの臨床投与に必要な量を推測する。

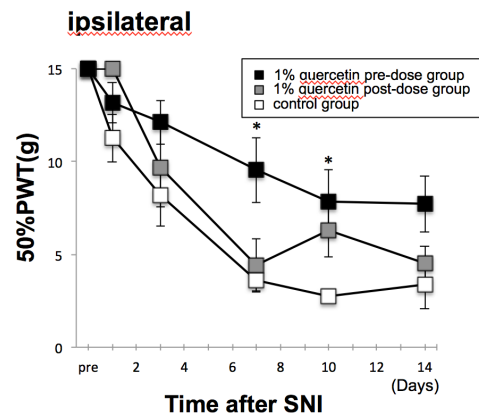
4. 研究成果

行動評価

神経障害性痛モデル作成によりラットは痛覚過敏性を示すが、ケルセチン前投与群では疼痛域値が改善した。

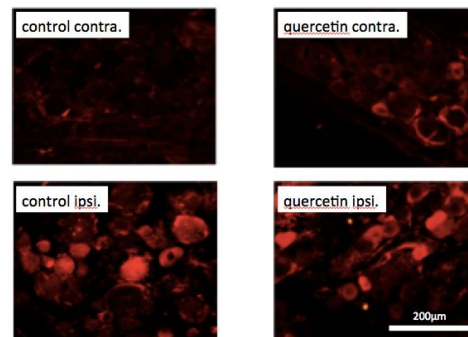


しかし神経障害性痛発症後に投与（後投与）では痛覚閾値は変化しなかった。



組織学的評価

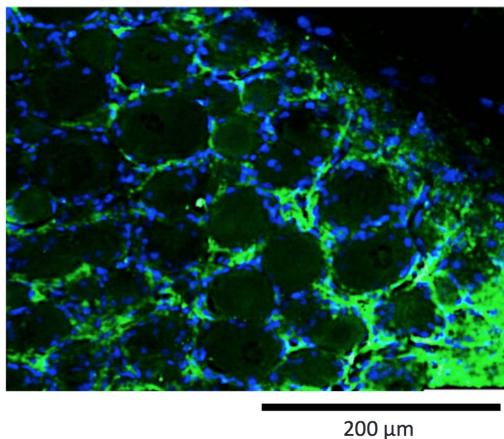
免疫染色ではケルセチン投与群の後根神経節での ERK1/2 が抑制される傾向を認めたが



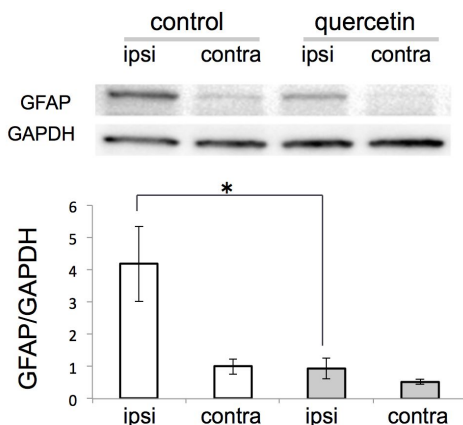
Primary Ab : anti-pERK(Rb,CST,#4370) 1:200
Secondary Ab : goat anti-Rb-Alexa546 1:1000

統計学的な有意差は認めなかった。

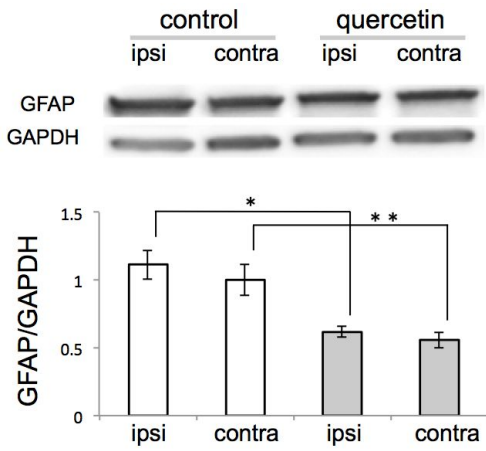
そこで ERK1/2 の強い局在性を認めるサテライトグリア細胞に注目した。サテライトグリア細胞はアストロサイトの一種であり GFAP が活性化マーカーとしてよく知られている。GFAP の後根神経節における局在性を示すため GFAP の免疫染色を行い、サテライトグリア細胞に GFAP が局在していることを示した。



サテライトグリア細胞の活性化を見るために後根神経節のウェスタンブロットを行い GFAP 蛋白を定量したところ、GFAP はケルセチン投与群で著明に減少した。

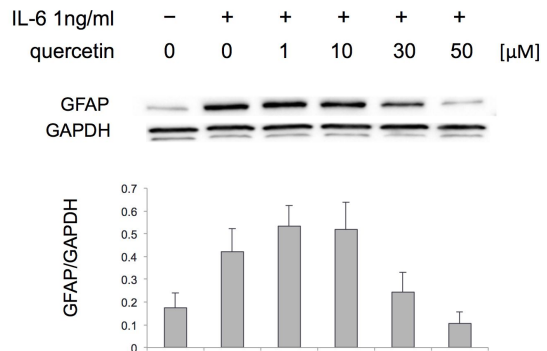


脊髄後角でも GFAP の抑制は観察されたが後根神経節に比べると抑制は軽度であった。



In-vitro 実験

ラットグリア細胞のセルラインである C6 細胞を用いてケルセチンの GFAP 抑制作用を検討した。ケルセチン 30 μM の添加により IL-6 による GFAP 誘導が抑制された。



ラット血液のケルセチン濃度を HPLC で測定した結果、血中濃度は 10-30 μM であり、In-vitro 実験で GFAP 抑制が見られた濃度に近い値が経口投与でも到達していることがわかった。

これらの結果から、経口投与されたケルセチンは後根神経節のサテライトグリア細胞の活性化を防ぐことにより神経障害性痛の発症を予防すると考えられた。後投与では効果を示さなかったことからサテライトグリア細胞は神経障害性痛の発症に強く関与するが痛みの維持には別の機構が働いていると考えられた。

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 1 件)

1. THE FLAVONOID QUERCETIN SUPPRESSES THE DEVELOPMENT OF NEUROPATHIC PAIN BEHAVIOR IN RATS

武藤典子、松岡義和

第 15 回国際疼痛学会

2014.10.7 ブエノスアイレス、アルゼンチン

[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〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松岡 義和 (Matsuoka, Yoshikazu)

岡山大学病院 集中治療部 助教

研究者番号：20509434