

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10311

研究課題名(和文)脳卒中後疼痛・情動異常発症メカニズムの検討-「ミクログリア活性化仮説」の評価-

研究課題名(英文) Investigation of pathogenic mechanisms for central post-stroke pain and its accompanying emotional disorder - evaluation of microglial activation hypothesis

研究代表者

有田 和徳 (ARITA, Kazunori)

鹿児島大学・医歯学域医学系・教授

研究者番号：90212646

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：脳卒中後疼痛モデルマウスにおける安定した機械的アロディニア反応および情動行動異常の検出法を確立し、機械的アロディニア反応、自発運動量増加はミクログリア活性化阻害薬(ミノサイクリン、p38MAPキナーゼ阻害薬)が有意な抑制効果を示した。また、N型Caチャンネルは、脳卒中後急性期の疼痛行動に関与する可能性が示唆された。一方、脳卒中後少なくとも亜急性期までは、顕著な抑うつ様行動変化は観察されず、慢性期におけるより詳細な検討が今後必要である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have established experimental conditions that enabled us to measure both stable mechanical withdrawal thresholds of hindpaws and emotional behaviors of thalamic hemorrhage-induced central post-stroke pain model mice. We found that systemic administration of inhibitors for microglial activation including minocycline and p38 MAP kinase inhibitors significantly alleviated the expression of both thalamic hemorrhage-induced mechanical allodynia and increased locomotor activity. Furthermore, N-type voltage-gated Ca channels were suggested to contribute to the development of the thalamic hemorrhage-induced mechanical allodynia in the acute phase. In contrast, we have not yet detected significant thalamic hemorrhage-induced depression-like behaviors in both acute and subacute phases. Thus, further study is necessary for the detection of the depression-like behaviors.

研究分野：脳神経外科学分野

キーワード：脳卒中後疼痛 視床痛 ミクログリア p38 MAPキナーゼ 中枢神経障害性疼痛 うつ様行動 不安様行動 電位依存性Caチャンネル

1. 研究開始当初の背景

脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain; CPSP) は、視床や被殻の血管障害の後の亜急性期に生じる難治性中枢性疼痛の代表である。CPSP 発症には視床感覚中継核病変、病変周囲の機能異常、大脳皮質中心溝付近構造の機能変化が大きな要因であることが示唆されているものの、未だ詳しいメカニズムは明らかにされておらず、従って有効な治療法も存在しないのが現状である。さらに、CPSP はしばしば激越な疼痛となって日常生活に多大な支障を及ぼし、そのため患者はうつ状態に陥り、自殺することすら珍しくない。従って、CPSP 患者に対する疼痛、および気分・情動障害に対する有効な治療法の開発が強く求められている。

申請者らは、基盤 C (一般) (申請者代表: 課題番号 24592166; 平成 24-26 年度) の支援を受け、CPSP モデルマウス開発に着手した (Neurosci. Res., 78:72-80, 2014)。本モデルにおいて興味深いのは、視床出血部位周辺に長期間にわたり、ミクログリア活性化を生じることであり、検討した薬物群の中で長期にわたって最も高い鎮痛効果を示したのが、ミクログリア活性化阻害薬として汎用されるミノサイクリンであった。また本モデルマウスは、その他の疼痛モデル (後肢炎症モデル、末梢神経障害モデル) マウスと比較し、疼痛行動試験時に行なう感覚刺激 (機械刺激や熱刺激) に対し過剰な逃避行動を示すが、このような過剰反応もミノサイクリンあるいはアミトリプチリンで抑制された。従って、本モデルマウスは CPSP 発症メカニズムのみならず、脳卒中後の情動異常発症に関しても細胞・分子レベルでの研究を推進する重要なツールになると考えられた。

2. 研究の目的

CPSP 発症・維持メカニズムとミクログリア活性化の関係をさらに追及するとともに、情動行動異常にもミクログリア活性化が関与しているとの仮説の基に、脳卒中後疼痛・情動異常発症メカニズムの基礎的検討を行うことを目的とした。

情動系 (不安・うつ症状) を評価する試験として、自発運動量計測、強制水泳試験、尾懸垂試験を行った。これらの試験を経時的に行い、CPSP 抑制に効果的であったミノサイクリンやアミトリプチリン、および他のミクログリア活性化阻害薬 (p38MAP キナーゼ阻害薬) の効果を検討する。

さらに申請者らは最近の予備的検討から、N 型 (Ca_v2.2) 電位依存性 Ca チャネル欠損マウスが、コラゲナーゼ誘発視床出血操作による疼痛を発症しにくい (発症が遅れる) ことが示唆された。N 型チャネル欠損マウスは、研究分担者の栗原らが作製し、末梢神経障害性疼痛発症の著しい減弱を世界で初めて報告しているが (EMBO J., 20: 2349-56, 2001)、その後、末梢神経障害後の脊髄ミクログリア

活性化も著明に減弱していることも見出し、していた (Molecular Pain, 5:74, 2009)。

3. 研究の方法

本実験遂行にあたり、所属研究機関に動物実験計画書 (承認番号 MD13074、MD14071)、および遺伝子組換え実験計画書 (承認番号 22037) を提出し、承認を得た。

CPSPモデルは、雄性マウス右視床後外側腹側核に、collagenase (10 U/ml) を脳定位的に微量注入 (15-20 nl) することで作成した (Bregmaから後方に1.0 mm、右外側に1.4 mm、表面から腹側に3.4 mm)。術後1-2週をPhase 1 (急性期)、3-4週をPhase 2 (亜急性期)、10週以降をPhase 3 (慢性期) と区分して、疼痛行動試験 (vonFrey刺激毛を用いた機械的疼痛閾値測定: 50%閾値測定)、情動行動試験 (自発運動量測定、強制水泳試験、尾懸垂試験) を行った。

自発運動量は、90分間の運動時間を計測した。強制水泳試験は、6分間の強制水泳セッションの後半4分間に生じる無動時間を計測し、尾懸垂試験は、6分間に認められる無動行動の発現時間を計測した。

4. 研究成果

(1) vonFrey 刺激毛を用いた機械的疼痛閾値測定 (C57BL/6J)

疼痛行動試験として、新たに vonFrey 刺激毛を用いた機械的疼痛閾値測定試験を行った。本測定は、Dynamic plantar aesthesiometer を用いた測定に比べ、触刺激誘発疼痛である機械的アロディニア現象をより反映していると考えられる。本検討により、Dynamic plantar aesthesiometer を用いた機械的疼痛閾値測定同様、明瞭な閾値低下 (機械的アロディニア) を観察することに成功した (図 1)。

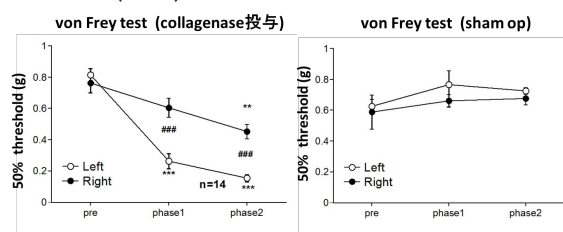


図 1. vonFrey 刺激毛を用いた機械的閾値測定

Sham 手術群 (sham op; n = 4) は、コラゲナーゼの代わりに、生理食塩水を投与した。コラゲナーゼ処理による右視床後外側腹側核出血により、両側後肢の機械的閾値は顕著に低下した。

(2) N 型 (Ca_v2.2) および R 型 (Ca_v2.3) 電位依存性 Ca チャネル欠損マウスにおける検討 - vonFrey test による機械的閾値の測定

CPSP モデルを神経型 (Ca_v2.2 および 2.3) 電位依存性 Ca チャネル欠損 (全身性) マウ

に適用した。Dynamic plantar aesthesiometer を用いた機械的閾値測定の予備的検討では、Phase 1 において、有意な機械的アロディニア発症抑制効果が観察されていた。ところが、vonFrey 刺激毛を用いた機械的閾値測定では、1 部を除き、野生型と比べ、ほぼ同様の閾値低下が認められた (図 2)。この結果は、機械的閾値測定原理 (vonFrey テストは主に A 線維刺激由来の、Dynamic plantar aesthesiometer では加えて A および C 線維刺激由来の機械的疼痛を検出) を反映し、Ca_v2.2 および 2.3 は、A 線維刺激由来の機械的アロディニア発症への関与は少ないことを示唆しているのかもしれない。

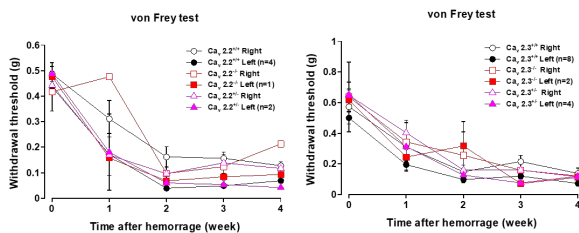


図 2. 神経型電位依存性 Ca チャネル欠損マウスを用いた検討

Ca_v2.2 (N 型) 欠損マウスにおいては、術後 1 週目における同側 (右側) 後肢の機械的閾値低下が減弱している可能性があるが (Dynamic plantar aesthesiometer を用いた測定結果と類似している)、反対側の閾値低下は野生型同様であった。ただし、例数が少ない (特にホモ欠損マウスは獲得しにくい状況にある) ので、さらなる検討が必要である。

(3). p38MAP キナーゼ阻害薬の機械的アロディニアに対する効果

CPSP モデルマウス (C57BL/6J、雄性) において観察される機械的アロディニア現象 (vonFrey test) に対する p38MAP キナーゼ阻害薬 (ロスマピモド) 経口投与の効果を検討した (図 3)。

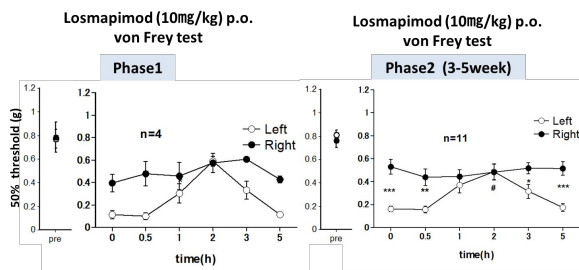


図 3. p38MAP キナーゼ阻害薬ロスマピモドの抗機械的アロディニア効果

ロスマピモド (10 mg/kg) の経口投与は、投与後 2 時間をピークに、左側後肢の有意な抗機械的アロディニア効果を示した。一方、右側後肢の機械的アロディニアに対する効果は認められなかった。

その結果、Phase 1 および 2 の両期におけるロスマピモド (10 mg/kg) の経口投与は、有意な抗アロディニア効果をもたらすことが示唆された。一方、Vehicle コントロールの経口投与は無効であった (data not shown)。

(4). 自発運動量測定

次に、野生型 (雄性 C57BL/6J) マウスを用い、視床出血処置後の自発運動量の測定を行った (図 4)。

自発運動量は Phase 2 において有意な増加が認められ、この効果は、ミノサイクリン (50 mg, i.p.) あるいはロスマピモド (10 mg/kg, p.o.) の処置により有意に抑制された (図 5: ロスマピモド腹腔内投与は無効であったが、現在のところ、その理由は不明である)。Vehicle 投与は、自発運動量を若干減少させるが、ミノサイクリン 50 mg/kg (i.p.) は、正常時の自発運動量を半減させるので (data not shown)、その効果の解釈には注意が必要であるかもしれない。

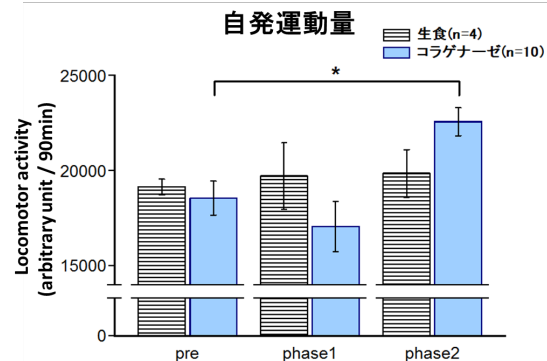


図 4. 視床出血処置後の自発運動量測定

Sham 手術群 (生食; n = 4) は、コラゲナーゼの代わりに、生理食塩水を投与した。コラゲナーゼ処理による右視床後外側腹側核出血により、Phase 2 においては、自発運動量の有意な増加が認められた。野生型 (雄性 C57BL/6J) を用いた。

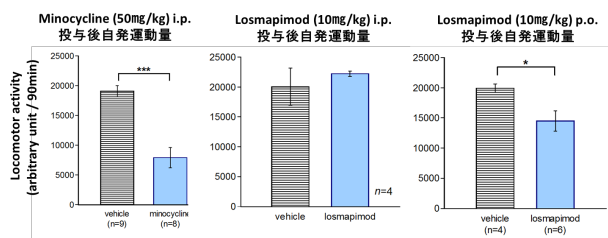


図 5. Phase 2 における自発運動量に対するミノサイクリン、あるいはロスマピモドの効果

ロスマピモド (10 mg/kg) の経口投与は、自発運動量を有意に減少させた。一方、ロスマピモドの腹腔内投与は無効であった (別種の p38MAP キナーゼ阻害薬であるドラマピモドの腹腔内投与も無効であった)。野生型 (雄性 C57BL/6J) マウスにおける検討。

(5). 視床出血処置はうつ様行動を引き起こすか？

最後に、視床出血処置後にうつ様行動が誘発されるか否か検討するために、経時的に強制水泳試験、尾懸垂試験を行った(図6)。

Sham手術群(生理食塩水投与群: 生食)では、Phase 2において無動時間が延長傾向にあったが、コラゲナーゼ処置群では変化は観察されなかった。一方、強制水泳試験においては、両群において変化は観察されなかった。今後はPhase 3における検討を行う予定である。

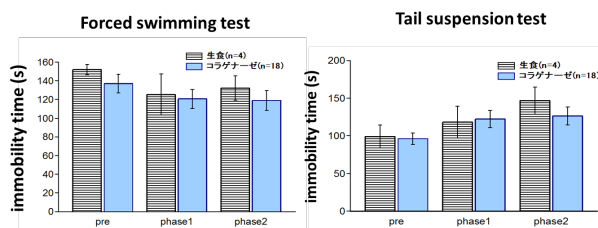


図6. 視床出血処置のうつ様行動試験に及ぼす効果

Sham手術群(生食; n=4)は、コラゲナーゼの代わりに、生理食塩水を投与した。コラゲナーゼ処理による右視床後外側腹側核出血は、Phase 1および2における強制水泳試験および尾懸垂試験に影響を与えなかった。野生型(雄性C57BL/6J)を用いた。

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11件)

Takasaki I, Watanabe A, Yokai M, Watanabe Y, Hayakawa D, Nagashima R, Fukuchi M, Okada T, Toyooka N, Miyata A, Gouda H, Kurihara T. *In silico* screening identified novel small-molecule antagonists of PAC1 receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* January 18, 2018. DOI:10.1124/jpet.117.245415. 査読有

Futatsuki T, Yamashita A, Ikbar KN, Yamanaka A, Arita K, Kakihana Y, Kuwaki T. Involvement of orexin neurons in fasting- and central adenosine-induced hypothermia. *Scientific Report* 8:9812717.101(2018). DOI: 10.1038/s41598-018-21252-w. 査読有

Aizawa F, Ogaki Y, Kyoya N, Nishinaka T, Nakamoto K, Kurihara T, Hirasawa A, Miyata A, Tokuyama S. The deletion of GPR40/FFAR1 signaling damages maternal care and emotional function in female mice. *Biol. Pharm. Bull.* 40(8): 1255-1259 (2017). DOI: 10.1248/bpb.b17-00082. 査読有

Nakamoto K, Aizawa F, Miyagi K, Yamashita T, Mankura M, Koyama Y, Kasuya F, Hirasawa A, Kurihara T, Miyata A, Tokuyama S. Dysfunctional GPR40/FFAR1 signaling exacerbates pain behavior in mice. *PLoS One* 12(7): e0180610 (2017).

DOI: 10.1371/journal.pone.0180610. 査読有

Moinuddin FM, Hirano H, Shinsato Y, Higa N, Arita K, Furukawa T. ATP7B expression in human glioblastoma is related to temozolomide resistance. *Oncology letter* 147:7777-7782(2017). DOI:10.3892/ol.2017.7249. Epub 2017 Oct 23. 査読有

Nishimuta Y, Awa R, Nagayama T, Makiuchi T, Tomosugi T, Hanaya R, Tokimura H, Hirano H, Moinuddin FM, Muhammad Kamil, Kibe A, Arita K. Long-term outcome after endovascular treatment of cavernous sinus dural arteriovenous fistula and a literature review. *Acta Neurochirurgica* 2017 Jul 27:202017(2017). DOI:10.1007/s00701-017-3336-4. Epub 2017 Sep 20. 査読有

Yuki N, Chan AC, Wong AHY, Inoue T, Yokai M, Kurihara T, Devaux JJ, Wilder-Smith E. Acute painful autoimmune neuropathy: A variant of Guillain-Barré syndrome. *Muscle & Nerve* 57(2): 320-324 (2018). DOI: 10.1002/mus.25738. Epub 2017 Jul 24. 査読有

Hosoyama H, Matsuda K, Mihara T, Usui N, Baba K, Inoue Y, Tottori T, Otsubo T, Kashida Y, Iida K, Hirano H, Hanaya R, Arita K. Long-term outcomes of epilepsy surgery in 85 pediatric patients followed up for over 10 years: a retrospective survey. *J Neurosurg Pediatr* 19:606-615(2017). DOI: 10.3171/2016.12.PEDS16197. Epub 2017 Mar 3. 査読有

Hanaya R, Niantiaro FH, Kashida Y, Hosoyama H, Maruyama S, Sugata S, Otsubo T, Tanaka K, Ishii A, Hirose H, Arita K. Vagus nerve stimulation for generalized epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) accompanying seizures with impaired consciousness. *Epilepsy & Behavior Case Reports* 7:16-19(2017). DOI:10.1016/j.ebcr.2016.11.001. eCollection 2017. 査読有

栗原 崇. Trend & Topics 痛みの分子科学 - 電位依存性 Na⁺チャンネル最前線. White - これからの女性医療を考える 通巻第7号、Vol.4 No.2: 42-48 (2016). http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0076_0402. 査読有

栗原 崇、宮田 篤郎. 脊髄痛覚伝達における遊離脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の関与. 日本薬理学雑誌. 146 (6): 309-314 (2015). DOI: 10.1254/fpj.146.309. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

水沼亮太、栗原 崇、神戸悠輝、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. FFAR1/GPR40 は疼痛遷延化に伴う情動行動変化に関与する. 第138回日本薬理学会関東部会 (2018.3.10) 東京

貞村祐子、栗原 崇、水沼亮太、神戸悠輝、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. GPR40/FFAR1 欠損マウスはコカイン誘発移所運動活性亢進効果が減弱している. 第70回日本薬理学会西南部会 (2017.11.18) 鹿児島

水沼亮太、栗原 崇、神戸悠輝、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. GPR40/FFAR1 は慢性疼痛に伴ううつ病に関与するか? 第70回日本薬理学会西南部会 (2017.11.18) 鹿児島

貞村祐子、栗原 崇、水沼亮太、神戸悠輝、鮫島芳宗、平澤 明、中本賀寿夫、大吉達樹、徳山尚吾、有田和徳、宮田篤郎. FFAR1 ノックアウトマウスはコカイン誘発移所運動活性が減弱する. 第90回日本薬理学会年会 (2017.3.15 ~ 17) 長崎

貞村祐子、栗原 崇、花田朋子、平野宏文、時村 洋、宮田篤郎、有田和徳. 脳卒中後疼痛モデルマウスにおける情動行動解析. 日本脳神経外科学会第74回学術総会 2015 (2015.10.14 ~ 16) 札幌

栗原 崇、カルキ・プラサンナ、中町智哉、渡邊 潤、朝田俊秀、大吉達樹、塩田清二、吉村 恵、有田和徳、宮田篤郎. 遊離中/長鎖脂肪酸受容体 GPR40/FFAR1 の脊髄痛覚伝達における役割. 第12回GPCR研究会 (2015.5.15 ~ 16) 東京

〔図書〕(計 1 件)

栗原 崇
ベッドサイドの薬理学 (笹栗俊之、宮田

篤郎 編). 分担項目 (第IV編1章1) 鎮痛薬; 1章2) 局所麻酔薬; 1章3) 全身麻酔薬; 1章4) 筋弛緩薬; 第IV編2章1) 頭痛治療薬; 2章2) 抗めまい薬)、丸善出版、東京、2018年3月31日発行. 総ページ数 432 ページ. ISBN: 978-4-621-30274-3

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: PAC1 受容体拮抗薬を用いた鎮痛薬
発明者: 栗原 崇、高崎一朗、豊岡尚樹、合田浩明
権利者: 同上
種類: 特許
番号: 特願 2017-186447
出願年月日: 2017年9月27日
国内外の別: 国内

取得状況 (計 1 件)

名称: 疼痛に関する化合物及び医薬組成物
発明者: 萩原正敏、豊本雅靖、細谷孝充、吉田 優、栗原 崇
権利者: 同上
種類: 特許
番号: US9745275B2
取得年月日: 2017年8月29日
国内外の別: アメリカ合衆国

〔その他〕

ホームページ等

鹿児島大学脳神経外科学分野
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~ns/index.html>

鹿児島大学生体情報薬理学分野
<http://www.kufm.kagoshima-u.ac.jp/~pharmacology/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有田 和徳 (ARITA, Kazunori)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号: 90212646

(2) 研究分担者

宮田 篤郎 (MIYATA, Atsuro)
鹿児島大学・歯学域医学系・教授
研究者番号: 60183969

時村 洋 (TOKIMURA, Hiroshi)
鹿児島大学・歯学域医学系・准教授
研究者番号: 50227568

栗原 崇 (KURIHARA, Takashi)
鹿児島大学・医歯学域医学系・准教授
研究者番号：60282745

(3) 研究協力者

貞村 祐子 (SADAMURA, Yuko)

鮫島 芳宗 (SAMESHIMA, Yoshimune)