

令和元年6月22日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10564

研究課題名(和文) サブスタンスP受容体を介した鎮痛補助薬の止痒メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of antipruritic mechanism of analgesic adjuvant via substance P receptor

研究代表者

山口 敬介 (YAMAGUCHI, KEISUKE)

順天堂大学・医学部・教授

研究者番号：10338410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：神経伝達物質サブスタンスP(SP)は、疼痛や炎症機構に関連している他、痒みのメディエーターとしての側面が注目されている。本研究は、SP受容体を介したシグナル伝達における鎮痛補助薬、特に抗てんかん薬(プレガバリン;PGB、ガバペンチン;GBP)の影響を分子生物学的に検討することによって、難治性掻痒の原因究明と新しい治療法を確立することを目的とした。

その結果、GBPおよびPGBはSP受容体を介するシグナル伝達系への抑制的な影響を有し、IL-6、IL-8などの炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を抑制することが明らかとなり、SPを介した抗炎症作用により止痒効果を発揮する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

帯状疱疹後掻痒を始めとした難治性掻痒が患者パフォーマンスに多大な影響を与え、QOL、学習効率、および労働生産性を著しく障害することが明らかにされている。適切な治療を提供することにより、それらを改善できる可能性があり、難治性掻痒の原因究明と安全な治療方法を確立することの社会的意義は非常に大きい。神経伝達物質サブスタンスP(以下SP)は、疼痛や炎症機構と強く関連している他、C線維のSP受容体(SPR)を介した直接的な掻痒のメディエーターとして中心的役割を果たしていることが注目されている。以上より、SPRを介したシグナル伝達系の解析が、難治性掻痒のメカニズム解明の鍵であることが考えられる。

研究成果の概要(英文)：Gabapentin (GBP) and pregabalin (PGB) exert antipruritic action on chronic itching with neuropathic or inflammatory conditions. In this study, we investigated the effects of GBP and PGB on substance P (SP)-induced activation of a human glioblastoma astrocytoma cell line U373 MG cell, which expresses the high levels of a functional high-affinity SP receptor and produces interleukin (IL)-6 and IL-8 in response to SP. The results indicated that GBP and PGB suppressed the SP-induced production of IL-6 and IL-8 in U373 MG cells. Furthermore, GBP and PGB inhibited the SP-induced phosphorylation of p38 MAPK and NF- κ B, and nuclear translocation of NF- κ B in U373 MG cells. Together, these observations suggest that GBP and PGB likely prevent the SP-induced IL-6 and IL-8 production by U373 MG cells via the inhibition of signaling molecules including p38 MAPK and NF- κ B, thereby exhibiting antipruritic action.

研究分野：麻酔学、疼痛学

キーワード：慢性掻痒 サブスタンスP 炎症 サイトカイン シグナル伝達 鎮痛補助薬 ガバペンチノイド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、慢性痒疹、皮膚癢疹症、帯状疱疹後痒疹などの難治性痒疹が患者パフォーマンスに多大な影響を与え、QOL、学習効率、および労働生産性を著しく障害することが明らかにされている。適切な治療を提供することにより、それらを改善できる可能性があり、難治性痒疹の原因究明と安全な治療方法を確立することの社会的意義は非常に大きいと考えられる。

帯状疱疹に引き続き起こる帯状疱疹後神経痛および帯状疱疹後痒疹は、経時的な神経の変性による神経障害性疼痛や神経障害性痒疹を伴い、疼痛と痒疹の強い関連が示唆されているものの詳細なメカニズムについて不明なことも多い。痒疹の原因として真皮神経の過形成や増殖過多、サイトカインなどの痒疹伝達メディエーター、マスト細胞、好酸球、真皮樹状細胞などが複雑に関与していることが想定される。中でも神経伝達物質サブスタンス P (以下 SP) は、疼痛や炎症機構と強く関連している他、C 線維の SP 受容体 (SPR) を介した直接的な痒疹のメディエーターとして中心的役割を果たしていることが注目されている。(図1)

以上より、SPR を介したシグナル伝達系の、より深い理解が難治性痒疹のメカニズム解明の鍵であるという発想を得た。

一方、抗てんかん薬であるプレガバリンやガバペンチンなどのガバペンチノイドは、神経前シナプスにおいてカルシウム流入を抑制することで神経伝達物質の過剰な放出を抑制し、鎮痛効果を発揮することが知られている。既に欧米において神経障害性疼痛の薬物治療ガイドラインの第一選択薬とされ、本邦でも鎮痛補助薬として神経障害性疼痛に対して広く

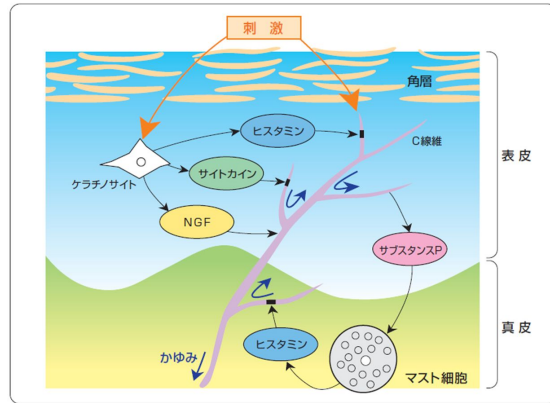


図1: かゆみ発現のメカニズム

臨床使用されている他、最近では止痒効果を発揮することが報告されている (N Engl J Med 2013; 368:1625-1634)。また、皮膚 SP 作用の減弱などが関連していると推定されているものの、詳細な止痒メカニズムは明らかにされていない。本研究は、SPR を介したシグナル伝達における抗てんかん薬 (プレガバリン、ガバペンチン) の効果を分子生物学的に検討することによって、難治性痒疹の原因究明と新しい治療方法を確立することを目的とした。

2. 研究の目的

本研究は、SPR を介したシグナル伝達における鎮痛補助薬の効果を分子生物学的に検討することによって、難治性痒疹の原因究明と新しい治療方法を確立することを目的とした。具体的には、ヒト星状膠腫細胞 U373MG 細胞株を用いた実験系において、SPR を介した鎮痛補助薬、特に抗てんかん薬 (プレガバリン、ガバペンチン) の SPR を介した止痒効果について解明することを目的とし、そのために SP 刺激によって惹起される炎症性サイトカインの発現、シグナル伝達系への薬剤の影響を解明することとした。

3. 研究の方法

SPR を介する細胞内情報伝達経路と鎮痛補助薬の影響についての検討; U373MG 細胞を用い、SP が MAP キナーゼ、特に ERK1/2 や P38 MAPK を活性化させることをウエスタンブロット法により測定する。抗てんかん薬 (プレガバリン PGB、ガバペンチン GBP) の影響を、ウエスタンブロット法による検出を試みる。

鎮痛補助薬の炎症性サイトカイン産生抑制効果についての検討; SP 刺激によって惹起される炎症性サイトカインの mRNA の発現・産生を RT-PCR 法で、タンパク質レベルを ELISA 法で定量する。さらに鎮痛補助薬による発現への影響を検討する。

鎮痛補助薬の炎症性転写因子 NF- κ B 活性化抑制効果についての検討; 同様に、SP 刺激によって惹起される NF- κ B を、ウエスタンブロット法を用いて測定する。さらに鎮痛補助薬による発現への影響を検討する。

以上より、痒疹のメカニズムを分子レベルで解析することにより、難治性痒疹の病態をより詳細に解明し、安全かつ有効な治療方法を確立することを目的とした。神経障害性痒疹のみならず、神経障害性疼痛の治療方法の確立することを目指した。

4. 研究成果

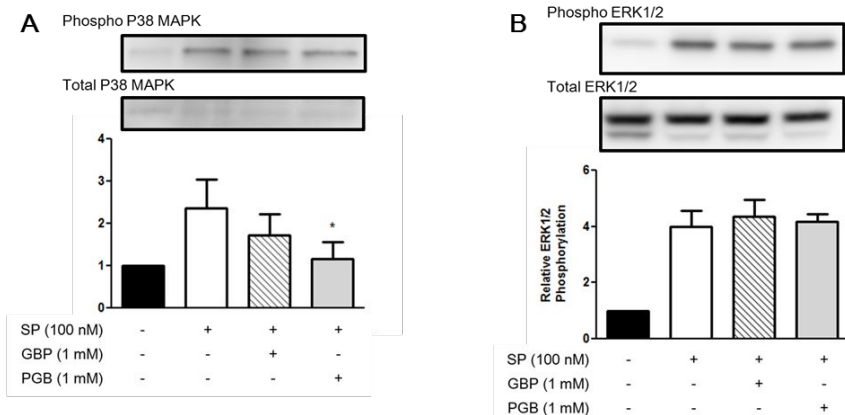
(1) まず初めに、SP 受容体を介した P38 MAPK のリン酸化および ERK に対する GBP および PGB の影響を検討した。

U373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、1mM GBP、1mM PGB で前処理した後、100 nM SP で 10 分刺激した。反応停止後、細胞を回収し、電気泳動後にウエスタンブロット法で A; リン酸化 P38 MAPK および B; リン酸化 ERK1/2 を検出した。ストリッピング後、A; 全 P38MAPK および B; 全 ERK1/2、を検出し、コントロールとの割合を比較した。その結果、

A; GBP (1mM) および PGB (1mM) は、SP (100nM) による p38 のリン酸を抑制した。

B; GBP (1mM) および PGB (1mM) は、SP (100nM) による ERK1/2 のリン酸を部分的に抑制した。

以上より、U373MG 細胞において、SP 受容体を介した MAPK 経路の活性化は、特に P38 MAPK において、ガバペンチンおよびプレガバリンによって抑制されることが分かった。



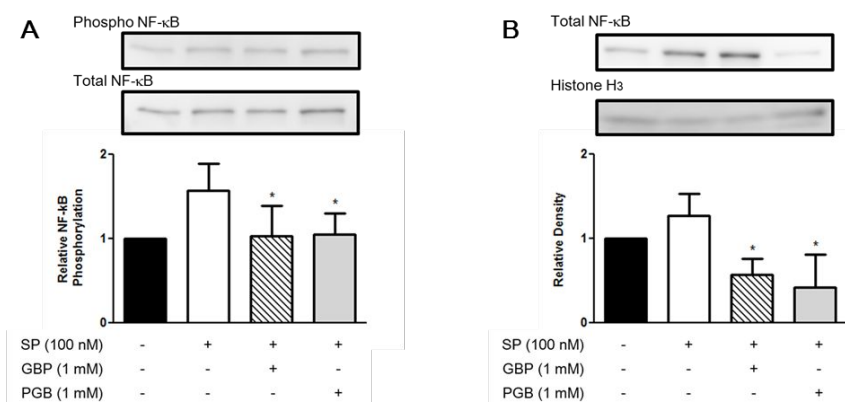
(2)次に、SP 受容体を介した NF- κ B のリン酸化および NF- κ B の核内移動に対する GBP および PGB の影響を検討した。

U373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、1mM GBP および 1mM PGB で前処理した後、100 nM SP で 10 分刺激した。反応停止後、細胞を回収し、電気泳動後にウエスタンブロット法で A; リン酸化 NF- κ B を、B;核内移動を検出した。ストリッピング後、A;全 NF- κ B を、B;ヒストン H3 を検出し、コントロールと比較した。その結果、

A; GBP (1mM)および PGB (1mM)は、SP (100nM)による NF- κ B のリン酸化を抑制した。

B; GBP (1mM)および PGB (1mM)は、SP (100nM)による NF- κ B の核内移動を抑制した。

以上より、U373MG 細胞において、SP 受容体を介した NF- κ B の活性化は、ガバペンチンおよびプレガバリンによって抑制されることが、さらに、NF- κ B の細胞膜から核内への移動が、ガバペンチンおよびプレガバリンによって抑制されることが分かった。



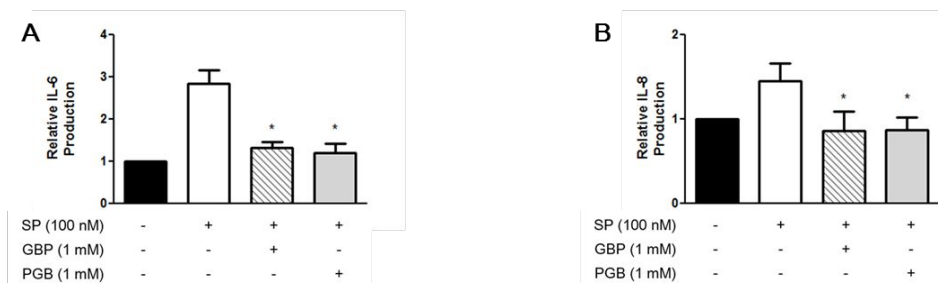
(2) SP 受容体を介した IL-6 および IL-8 産生に対する GBP および PGB の影響

U373MG 細胞を 12 穴プレートで培養し、1mM GBP および 1mM PGB で全処理した後、100 nM SP で 24 時間刺激した。培養液を回収し、培養液中の IL-6 と IL-8 の産生を ELISA 法で検出した。その結果、

A; GBP (1mM)および PGB (1mM)は、SP (100nM)による IL-6 の産生を有意に抑制した。

B; GBP (1mM)および PGB (1mM)は、SP (100nM)による IL-8 の産生を有意に抑制した。

以上より、U373MG 細胞において、SP 受容体を介した IL-6 および IL-8 の産生は、ガバペンチンおよびプレガバリンによって抑制されることが、分かった。



本研究により、ガバペンチンおよびプレガバリンはSP受容体を介するシグナル伝達への影響を有することが示された。特に、MAPKのうち、P38のリン酸化を抑制することにより、転写因子NF-κBの核内移動を抑制し、その結果、IL-6およびIL-8などの炎症性サイトカイン、ケモカインの産生を抑制することが明らかになった。以上より、ガバペンチンおよびプレガバリンはSPを介した抗炎症作用により、止痒効果を発揮する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

英文雑誌

1. Yamaguchi K, Kumakura S, Murakami T, Someya A, Iseki M, Inada E, Nagaoka I: Anti-inflammatory actions of gabapentin and pregabalin on the substance P-induced mitogen-activated protein kinases activation in U373 MG human glioblastoma astrocytoma cells. Mol Med Rep.5:6109-6115, 2017 (査読有)
2. Yamaguchi K, Kumakura S, Murakami T, Someya A, Inada E, Nagaoka I: Ketamine suppresses the substance P-induced production of IL-6 and IL-8 by human U373MG astrocytoma cells. Int J Mol Med 37:687-692, 2017 (査読有)

和文雑誌

1. 石川 理恵, 井関 雅子, 古賀 理恵, 山口 敬介, 稲田 英一: 急性期から疼痛専門医による治療を受けた帯状疱疹患者の神経障害性疼痛にみられる要素の検討 PAIN RESEARCH 31: 156-165, 2016 (査読有)
2. 山口 敬介: かゆみ 治療薬を使いこなす"知識"と"ノウハウ" この薬は"いつ"どの患者で"どう使う"? GABA アナログ 薬局 69 : 2446-2452, 2018 (査読無)

〔学会発表〕(計2件)

1. 山口 敬介, 榎本 達也, 菅澤 佑介, 斎藤 理恵, 高橋 美佳, 長谷川 理恵, 千葉 聡子, 井関 雅子: ガバペンチンがサブスタンス P 受容体を介する MAP キナーゼシグナル伝達系に与える影響について 第49回日本ペインクリニック学会総会, 2015年7月
2. Yamaguchi K, Inada E; Gabapentin Inhibits Substance P Induced Mitogen-Activated Protein Kinases Activation in U373 MG Human Astrocytoma Cells. 110th ASA annual meeting, San Diego, 2015

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 長岡 功

ローマ字氏名：NAGAOKA, isao

所属研究機関名：順天堂大学

部局名：医学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：60164399

(2)研究協力者

研究協力者氏名：若林 彩子

ローマ字氏名：WAKABAYASHI, saiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。