

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08985

研究課題名（和文）青斑核アストロサイトに着目した慢性痛病態の機序と治療法に関する研究

研究課題名（英文）Roles of locus coeruleus astrocytes for mechanisms and treatments of chronic pain

研究代表者

林田 健一郎（Hayashida, Kenichiro）

秋田大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：40769634

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）：本研究は、痛みに対するブレイキシテムである内因性鎮痛と脳機能に重要な役割を持つ青斑核（LC）に着目し、慢性痛病態と治療戦略について検討した。その結果、痛みの慢性化に伴うアストロサイトのグルタミン酸輸送体の減少が、LC神経活動に異常を起し、内因性鎮痛機構及び前頭葉機能低下に関与するという知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、痛みの慢性化に伴う青斑核の病態を明らかにし、青斑核の異常が慢性痛だけでなく認知機能異常の一因になることを示した。また、この青斑核の異常は、既存薬であるバルプロ酸や抗うつ剤で予防・治療できる可能性を示した。これらの結果は、これまでの慢性痛の病態理解に新しい知見を加えるだけでなく、治療ターゲットとしての青斑核の重要性を示唆しており、新しい慢性痛治療法開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：This research project focused on the roles of locus coeruleus (LC) for endogenous analgesic system and brain functions to understand mechanisms and treatments of chronic pain. We observed that down regulation of glutamate transporters in the LC during chronification of neuropathic pain results in abnormal LC neuronal activities to cause impaired endogenous analgesia and cognitive functions.

研究分野：疼痛学

キーワード：慢性痛 下行性抑制 神経障害性疼痛

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛に代表される慢性痛は、痛みによってだけでなく、注意、記憶、判断などの認知実行機能低下によっても患者の生活の質や生産性を低下させるため、脳機能異常を含めた慢性痛病態の機序解明や治療法の開発は、医療・医学の重要な課題である

1. 近年、様々な慢性痛患者で内因性鎮痛機能の低下が報告されている(Lewis et al., J Pain, 2012)。ノルアドレナリン(NA)作動性下行性抑制系は、LC から投射される神経線維から脊髄後角に放出されたNAが脊髄後角の α_2 アドレナリン受容体に働き鎮痛を起こす。内因性鎮痛系には多くの中枢神経機序が関与しているが、申請者は最近、痛み刺激により惹起される内因性鎮痛(Noxious stimulation-induced analgesia: NSIA)に NA 作動性下行性抑制系の正常な活動が重要であり、神経障害性疼痛が慢性化したラットで NSIA が減弱することを見出し、以下のような知見を得た。

2. 前頭葉は、注意、記憶、判断などを担っており、これら認知実行機能は慢性痛時に低下することが報告されている(Moriarty et al., Progress in neurobiology, 2011)。前頭葉は複雑なネットワークによって機能調節されているが、LC から投射される NA 神経線維はその中でも重要な役割を持つ。NA による前頭葉機能調節には至的濃度が重要であり、低濃度から至的濃度までの NA は α_2 アドレナリン受容体を介して前頭葉機能を向上させるが、過度の NA は α_1 または α_2 アドレナリン受容体を介して前頭葉機能を低下させる。申請者は、慢性痛時に LC の基礎神経活動が亢進した結果、前頭葉における基礎 NA 放出が過度に増加することによって前頭葉機能が低下し、この機能低下は α_1 アドレナリン受容体拮抗薬で改善することを報告した。以上の背景から、慢性痛において、LC のアストロサイト GLT-1 発現減少が細胞外グルタミン酸濃度を上昇させ LC の基礎神経活動が過剰亢進することで前頭葉機能の低下が起きると仮説を立てた。

3. Histone deacetylase (HDAC)によるヒストンの脱アセチル化は、慢性痛病態に関わる神経やグリアの様々な遺伝子転写に重要な役割を持つ。申請者は、HDAC 阻害活性を持つ抗痙攣薬バルプロ酸の経口投与が末梢神経損傷後に脊髄で減少した GLT-1 を回復させること、さらに、慢性痛ラット LC の GLT-1 発現減少と NSIA 減弱は HDAC 阻害剤の LC への局所投与により回復できることを報告した。また、予備実験において、経口投与したバルプロ酸は神経障害性疼痛が慢性化したラットの障害側の疼痛閾値を上昇させ、NSIA と LC の GLT-1 発現を回復させた。バルプロ酸は慢性痛治療にすでに承認されている経口剤であり、その治療効果と作用機序を検討することは、トランスレーショナル研究として臨床的意義が高い。これらの結果を基に、バルプロ酸は LC の GLT-1 発現を回復させることで細胞外グルタミン酸濃度を正常化し、慢性痛で低下した内因性鎮痛および前頭葉機能を回復させると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究は、細胞外グルタミン酸濃度を調節するアストロサイトの **glutamate transporter-1 (GLT-1)** が神経障害性疼痛の慢性化に伴って LC で減少することに注目し、GLT-1 発現減少と LC 神経活動の異常、内因性鎮痛および前頭葉機能低下との相関を検討すると共に、これら慢性痛病態に対して LC の GLT-1 発現を増加させることによる治療戦略について検討した。

3. 研究の方法

項目1: 末梢神経障害後の内因性鎮痛及び前頭葉関連行動の変化と LC における GLT-1 発現の相関

本項目の実験は、正常ラット及び神経障害性疼痛モデルである spinal nerve ligation (SNL) ラットで右側 L5-L6 脊髄神経結紮2、4、6週間後に行った。また、LC の GLT-1 減少だけによる影響を明らかにするため、GLT-1 selective small interfering RNA (GLT-1 siRNA, 8.3 pmol/day) もしくはコントロール siRNA を正常ラットの両側 LC に5日間局所投与し同様な実験を行った。

1-1. 行動試験と GLT-1 発現量測定

Novel object recognition (NOR) は、ラットが新規対象物に興味を持つ習性を利用し、主に前頭葉が関与する注意、記憶、実行の要素が含まれる。NOR は、予め学習させた 4 個の等しい対象物の1つを変更し、新規対象物に興味を示した時間の割合で評価し、動物にストレスをほとんど与えることがないため、他の実験へ影響しない。

LC における SNL 後の病態変化及び痛覚刺激による神経活動の活性化に左右差はないが、SNL 障害側後肢(右側)は痛覚過敏のため疼痛閾値変化を正常状態と比較することが難しいことから、NSIA の評価は左後肢(SNL の対側)で行った。NSIA の痛み刺激は左前肢皮下へのカプサイシン(150 µg/50 µl)投与によって惹起し、投与30分後の左後肢逃避閾値と投与前値との差を評価した。

1-2. LC 神経活動測定

イソフルレン麻酔下で、細胞外記録用電極を用いて、基礎神経活動及び痛み刺激(NSIAと同じ条件)によって惹起される神経活動の変化を記録した。得られたデータは波形解析プログラムでシングルユニットに分離し、カプサイシン投与前1分間と投与後10分間において、それぞれのユニットの10秒ごとの活動電位頻度を評価した。

項目2: LC における GLT-1 をターゲットとした慢性痛治療

本項目は、慢性痛治療に適応があるバルプロ酸の経口投与による治療効果と作用機序を検討する事で、新たな慢性痛治療の開発につながるトランスレーショナル研究である。

実験は、神経障害性疼痛が慢性化する SNL 手術6週間後から、蒸留水もしくはバルプロ酸(200 mg/kg/day)を朝晩2回2週間経口投与した慢性痛ラットを用いて行った。SNL 障害側後肢(右側)の痛覚過敏はバルプロ酸投与最終日まで、毎朝の投与前に Paw-pressure テストによって測定した。

4. 研究成果

本研究の結果、以下の知見を得た。

< 1 > 神経障害性疼痛が慢性化したラット青斑核において、基礎神経活動は増加するが、前肢への痛み刺激による反応がほぼ消失することを細胞外記録法で観察した。この結果は、これまで我々が報告した内因性鎮痛機能の行動試験及びマイクロダイアライシス法を用いたノルアドレナリン放出測定の結果と一致した。これらの結果は、慢性痛時の青斑核が痛み刺激に反応できなくなったことにより内因性鎮痛機構が減弱するという我々の仮説を支持する。

< 2 > 神経障害性疼痛が慢性化したラット青斑核において、 α_2 アドレナリン受容体拮抗によりグルタミン酸放出が起きることを論文報告した。この結果から、ノルアドレナリンは青斑核ノルアドレナリン神経細胞だけでなく、グルタミン酸神経終末も抑制し、結果として青斑核神経活動を抑制していることが示唆された。

< 3 > バルプロ酸の経口投与により、慢性痛時に減弱した内因性鎮痛が回復すること、その機序として青斑核の GLT-1 発現の増加が関与することを見出した。この結果は、我々の仮説を支持する。

< 4 > 青斑核の GLT-1 をノックダウンした動物は、慢性痛動物と同様に、新規物質への興味が減少することを観察した。このことは、青斑核 GLT-1 の減少が、青斑核神経の基礎活動を増加させ、前頭葉機能を低下させる要因の一つであるという我々の仮説を支持する。

< 5 > リオデジャネイロ大学と共同開発中の新規 α_2 アドレナリン受容体作動薬 PT-31 の鎮痛作用について論文報告した。クロニジンなど既存の α_2 アドレナリン受容体作動薬と異なり、PT-31 は血圧低下や鎮静を起こしにくい化合物で、下行性ノルアドレナリン神経系による鎮痛メカニズム研究のツールとして興味深い。

< 6 > 社会的ストレスを負荷したラットにおいて、慢性痛と同様に内因性鎮痛機能が減弱し、術後痛からの回復が遅延する事を論文報告した。また、社会心理ストレスは慢性痛と同様に青斑核アストロサイトの GLT-1 の減少を起こし、青斑核が痛み刺激に反応できなくなったことにより内因性鎮痛機構が減弱するという新しい知見を得た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sudo Roberto T, Hayashida Kenichiro, Santos Alu?zio N, Kawatani Masahito, Monteiro Carlos ES, Moreira Roberto D, Trachez Margarete M, Montes Guilherme C, Zapata-Sudo Gisele	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 Novel agonist of $\alpha_4\beta_2$ neuronal nicotinic receptor with antinociceptive efficacy in rodent models of acute and chronic pain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pain Research	6. 最初と最後の頁 2453 ~ 2462
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/JPR.S169637	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Hayashida Ken-ichiro, Kimuram Masafumi, Eisenach James C.	4. 巻 676
2. 論文標題 Blockade of 2-adrenergic or metabotropic glutamate receptors induces glutamate release in the locus coeruleus to activate descending inhibition in rats with chronic neuropathic hypersensitivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 41 ~ 45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Arora Vipin, Martin Thomas J., Aschenbrenner Carol A., Hayashida Kenichiro, Kim Susy A., Parker Renee A., Eisenach James C., Peters Christopher M.	4. 巻 382
2. 論文標題 Psychosocial Stress Delays Recovery of Postoperative Pain Following Incisional Surgery in the Rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 35 ~ 47
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neuroscience.2018.04.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sudo Roberto Takashi, do Amaral Rachel Vieiralves, Monteiro Carlos Eduardo da Silva, Pitta Ivan da Rocha, Lima Maria do Carmo, Montes Guilherme Carneiro, Ririe Douglas Gordon, Hayashida Kenichiro, Zapata-Sudo Gisele	4. 巻 815
2. 論文標題 Antinociception induced by a novel 2A adrenergic receptor agonist in rodents acute and chronic pain models	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Eur J Pharmacol	6. 最初と最後の頁 210 ~ 218
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2017.09.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hayashida KI, Kimura M, Eisenach JC,	4. 巻 676
2. 論文標題 Blockade of 2-adrenergic or metabotropic glutamate receptors induces glutamate release in the locus coeruleus to activate descending inhibition in rats with chronic neuropathic hypersensitivity	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neurosci Lett	6. 最初と最後の頁 41-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.neulet.2018.04.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Arora V, Ph, Martin T.J., Aschenbrenner C.A., Hayashida KI, Kim S, Parker R.A., Eisenach J.C., Christopher M. Peters C.M.	4. 巻 382
2. 論文標題 Psychosocial stress delays recovery of postoperative pain following incisional surgery in the rat	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience	6. 最初と最後の頁 35-47
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Sudo RT, Santos AN, Debom RC, Hayashida KI, Trachez MM, Zapata-Sudo G
2. 発表標題 Antinociceptive profile of a new agonist of alpha4beta2 nicotinic receptor in rodent models of acute and chronic pain
3. 学会等名 2017 Anesthesiology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 林田健一郎、河谷正仁、Sudo RT.
2. 発表標題 Alpha4beta2型ニコチン受容体を介する脊髄における鎮痛メカニズム
3. 学会等名 160回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 動物実験装置	発明者 林田健一郎	権利者 秋田大学
産業財産権の種類、番号 特許、2018-164414	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	河谷 正仁 (kawatani masahito) (00177700)	秋田大学・医学(系)研究科(研究院)・教授 (11401)	
研究 分担者	木口 倫一 (kiguchi norikazu) (90433341)	和歌山県立医科大学・医学部・講師 (24701)	