

令和元年5月9日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10989

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛モデルにおける抑制性神経伝達物質トランスポーター阻害薬の中枢作用

研究課題名(英文) Central effects of blockades of inhibitory neurotransmitter transporters in neuropathic pain models.

研究代表者

寺田 忠徳 (TERADA, Tadanori)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：10399206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：坐骨神経絞扼と糖尿病性ニューロパチーによる神経障害性痛モデルラットを作成し、脳室内にグリシントランスポーター2(GlyT2)阻害薬のALX1393とGABAトランスポーター3(GAT3)阻害薬のSNAP5114を投与した。ALX1393は両方のモデルで機械及び冷痛覚過敏に対して鎮痛作用を示したが、SNAP5114は抗痛覚過敏作用を示さなかった。またALX1393は高用量では自発運動活性を低下させたが、ALX1393とSNAP5114とも抗不安作用や抗うつ作用は発現しなかった。脳内のGlyT2は抗痛覚過敏作用と自発運動活性に関与する一方、GAT3にはこれらの役割がないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

有効性の高い神経障害性痛治療薬の開発が求められている。疼痛抑制機構の破綻が神経障害性痛の病態の一つであるため、これを賦活化させることが治療に有効である。脳内のグリシントランスポーター2(GlyT2)の機能をGlyT2阻害薬で抑え、抑制性神経伝達物質グリシンの働きを強めたところ、ラットに発現させた機械及び冷痛覚過敏に対する鎮痛作用が現れた。一方、高用量のGlyT2阻害薬は自発運動を低下させた。研究結果からGlyT2は脳内で疼痛閾値の調節に関与していると考えられ、運動機能を低下させる副作用の懸念はあるものの、新しい神経障害性痛治療薬のターゲットとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Central effects of blockades of inhibitory neurotransmitter transporters on hyperalgesia, anxiety, and depression were examined in rat neuropathic pain models. A selective glycine transporter 2 (GlyT2) inhibitor ALX1393 and a selective GABA transporter 3 (GAT3) inhibitor SNAP5114 were administered intracerebroventricularly. In chronic constriction injury (CCI) model and diabetic polyneuropathy model, ALX1393 inhibited cold and mechanical hyperalgesia. In contrast, SNAP5114 had no effect on the cold and mechanical hyperalgesia in both models. In the CCI model, a high dose of ALX1393 decreased total moving distance in the open field. Both ALX1393 and SNAP5114 had no effect on percentage of the time spent in the central area of the open field and time spent in the open arms of elevated plus maze. These results indicate that GlyT2 but not GAT3 in the brain modulates nociceptive transmission and that neither GlyT2 nor GAT3 is involved in anxiety and depression in the neuropathic pain models.

研究分野：緩和ケア

キーワード：神経障害性痛 トランスポーター 中枢作用

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

1. 研究開始当初の背景

神経障害性痛には未だ有効性の高い治療薬が無く、慢性疼痛の大きな原因となっている。様々な種類の薬物が臨床応用されているが鎮痛作用が十分でないだけでなく副作用のために薬物治療の継続が困難となる場合もある。このため従来の治療薬と異なる作用機序で選択的に侵害受容伝達を抑制する副作用の少ない治療薬の開発が必要である。神経障害性痛の病態の一つに下行性疼痛抑制系の機能破綻がある。この機能の賦活化が神経障害性痛治療に重要であると考えられている。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛には未だ有効性の高い治療薬がない。抑制性神経伝達物質の GABA とグリシンは中枢神経系で侵害受容伝達を抑制している。これまで著者らは GABA とグリシントランスポーターの阻害薬を脊髄に投与すると神経障害性痛モデルで抗侵害作用が現れることを報告した。GABA とグリシンの再取り込みが阻害されるとシナプスにおける GABA とグリシンの濃度が上昇し、抑制性のシナプス伝達が増強される。これにより下行性疼痛抑制系が活性化し、神経障害性痛の病態である脱抑制が減弱することにより抗侵害作用が発現すると考えられた。さらに研究を発展させ、トランスポーターサブタイプのうち、上位中枢で侵害受容伝達や慢性痛の情動反応に關する領域に発現する GAT-3 と GlyT-2 の阻害薬を脳内に投与し、抗侵害作用の他、情動(抗不安/抗うつ作用)、運動・学習能力への影響を調べる。本研究で神経障害性痛治療薬としての抑制性神経伝達物質トランスポーター阻害薬の臨床応用の可能性を探る。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性痛モデルの作製

坐骨神経絞扼モデル(CCI)

5週齢の雄 Sprague-Dawley (SD) ラットを三種混合薬の腹腔内投与により麻酔し、大腿骨上に皮膚切開を行い、片側の坐骨神経を 4.0-絹糸で 4 箇所緩く結紮した。Ugo Basile 社製圧刺激疼痛閾値測定装置を用いて痛覚過敏が認められたラットを実験に用いた。対照には坐骨神経を剥離・露出のみを行う sham 手術を施し、痛覚過敏の発現が坐骨神経絞扼によることを確認した。

糖尿病性ニューロパチーモデル(DM)

膵細胞を選択的に破壊するストレプトゾトシン 100mg/kg を 4 週齢の雄 SD ラットの腹腔内に投与し、1 週間後に血糖値が 250mg/dL 以上のラットを糖尿病ラットとした。投与後 4 週以降も高血糖が持続し、Ugo Basile 社製圧刺激疼痛閾値測定装置により、対照として生理食塩水を腹腔内投与した正常ラットと比べて痛覚過敏が認められた糖尿病ラットを実験に用いた。

(2) 脳室カニューレ留置

薬物を脳室内に投与するため、麻酔下に脳定位固定装置を用いて SD ラットの右側脳室に 22G のステンレス製のガイドカニューレを頭頂骨より 4.0 mm 挿入し、歯科用セメントとスクリューで頭部に固定した。処置 1 週間後に 29G の注入用カニューレに PE-20 カテーテルを接続し、ALX13931、SNAP5114 または溶媒の dimethyl sulfoxide: DMSO 10 μ L をマイクロシリンジで注入した。実験終了後にカニューレからメチレンブルーを注入し、側脳室の周囲が染色されていることで薬物が脳室内に正確に投与されたことを確認した。

(3) 熱、冷、機械痛覚過敏性に対する作用の検討

Plantar test (熱痛覚過敏に対する作用)

神経障害性痛に伴う熱刺激に対する痛覚過敏を評価するための検査で、患肢足底に放射熱を当てて逃避反応(患肢を引き上げる)が起こるまでの時間(潜時)を測定した。(Ugo Basile 社製 model 7360)。

Cold plate test (冷痛覚過敏に対する作用)

神経障害性痛に発現頻度が高く、特徴的な冷刺激に対する痛覚過敏を評価した。4 の冷板にラットを乗せ、逃避反応(後肢を舐める・引き上げる・振り回す)が起こるまでの潜時を測定した。(Ugo Basile 社製 Hot/Cold plate model 35100)

von Frey test (機械痛覚過敏に対する作用)

患肢足底に上向きの力がかかるように filaments を押し当て、逃避反応(患肢を引き上げる)が起こる閾値(g)を測定した。(IITC Life Science 社製 electronic von Frey esthesiometer model 2391C)

(4) 急性痛に対する作用の検討(正常ラット)

Tail flick test(脊髄反射が関与 カットオフ時間: 15 秒)

Hotplate test(上位中枢が関与 52.5 カットオフ時間: 30 秒)

(5) 運動・学習機能に対する作用の検討 Rotarod test ; 5 分間で 4rpm から 40rpm まで加速しながら回転するドラムの上にラットを乗せ、落下するまでの潜時を測定した。(Ugo Basile 社製 model 47700)

(6)不安・抑うつに対する作用の検討

Open field test(不安・抑うつの評価)

ラットを高さ 40cm の壁で囲まれた 80cm 四方のオープンフィールドの中央に置き、5 分間自由に探索させた。ラットは不安が強いとフィールドの外側部分を好むため中央部分での滞在時間が短縮する。ラットの探索行動をビデオ撮影し、ビデオ行動解析システム[Stoelting 社製 ANY-maze ver6.0]で定量評価した。(i)中央部分(inside zone)の滞在時間と(ii)総移動距離を計測し、locomotor activity(自発運動活性)への影響も調べた。

Elevated plus maze test: 高架式十字迷路試験 (不安・抑うつの評価)

ラットを 70cm の高さにある十字型の 4 本のアーム(長さ 50cm)の中央に置き、5 分間自由に探索させた。不安が強いラットは壁のないオープンアームの滞在時間が短縮し、壁で囲まれたクローズドアームの滞在時間が延長するため、(i)オープンアームの滞在時間、(ii)クローズドアームの滞在時間、(iii)総移動距離をビデオ行動解析システム[Stoelting 社製 ANY-maze ver6.0]で定量評価した。同様に locomotor activity(自発運動活性)への影響も調べた。

結果は、one-way ANOVA followed by Dunnett ' s post hoc test, two-way repeated measures ANOVA followed by Dunnett ' s post hoc test, Student ' s two sample t test で統計解析し、 $P < 0.05$ を有意とした (各群 6 匹)。

4. 研究成果

(1) 神経障害性痛に対する脳内 GlyT2 および GAT3 の関与: CCI モデル

Plantar test

CCI モデル群では Sham 手術群と比較して熱刺激に対する逃避反応閾値が著明に低下した。ALX1313 と SNAP5114 の脳室内投与では高用量でも 180 分後まで機械痛覚過敏に対する逃避反応潜時に影響を与えなかった。(図 1、図 2)

Cold plate test

CCI モデル群では Sham 手術群と比較して冷刺激に対する逃避反応閾値が著明に低下した。ALX1313 は用量依存性に逃避反応潜時を延長させた。高用量では脳室内投与 180 分後でも鎮痛作用が持続していた。この作用はグリシン受容体阻害薬のストリキニーネ (STR) の脳室内前投与により完全に抑制された。(図 3) 一方、SNAP5114 は 200 μg の高用量でも冷痛覚過敏に対して作用が見られなかった。(図 4)

von Frey test

CCI モデル群では Sham 手術群と比較して機械刺激に対する逃避反応閾値が著明に低下した。ALX1313 は用量依存性に逃避反応閾値を上昇させた。高用量では脳室内投与 180 分後でも鎮痛作用が持続していた。この作用はグリシン受容体阻害薬のストリキニーネ (STR) の脳室内前投与により完全に抑制された。(図 5) 一方、SNAP5114 は 200 μg の高用量でも機械痛覚過敏に対して作用が見られなかった。(図 6)

以上の結果から、CCI モデルでは ALX1393 はシナプス間隙のグリシン濃度を上昇させてシナプス後膜のグリシン受容体を活性化させることで抑制性シナプス伝達を増強し、冷および機械痛覚過敏に対して抗痛覚過敏作用が発現することが示唆された。熱痛覚過敏に対して効果が見られなかった理由は現時点で明らかではない。刺激強度の違いが関与している可能性がある。一方、SNAP5114 により脳内の GAT3 機能を抑制し GABA 作動性神経伝達を増強させても抗痛覚過敏作用が発現しなかった。

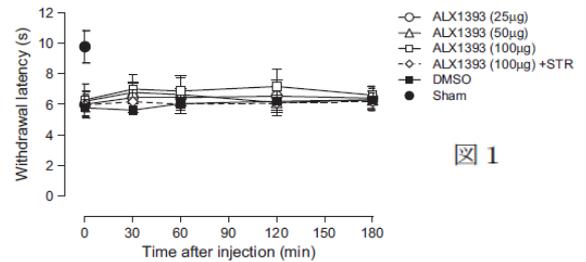


図 1

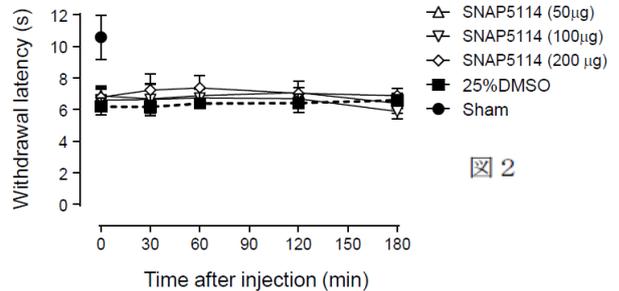


図 2

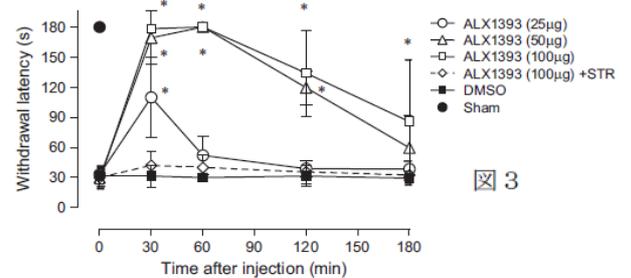


図 3

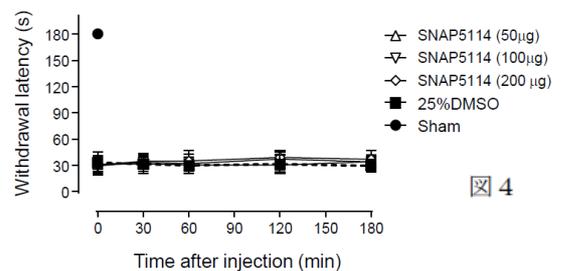


図 4

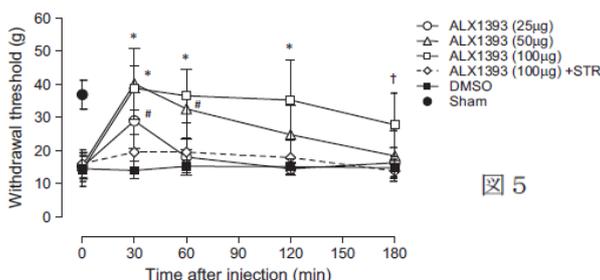


図 5

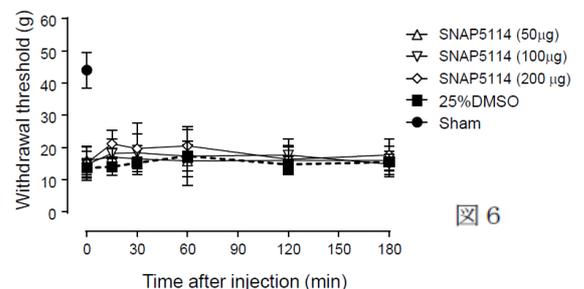


図 6

(2) 神経障害性痛に対する脳内 GlyT2 および GAT3 の関与 : DM モデル

DM モデルでは週齢が同じ(age-matched)正常ラットと比較して、機械および冷痛覚過敏が発現した。一方、熱痛覚過敏は発現しなかった。

Plantar test

ストレプトゾトシン投与から 4 週後に高血糖が持続していたラットでは熱痛覚過敏が発現しなかったため ALX1313 と SNAP5114 の脳室内投与を行わなかった。熱痛覚過敏が発現しなかった理由は不明だがラットの系統が影響している可能性が考えられる。

Cold plate test

ALX1313 は用量依存性に逃避反応潜時を延長させた。高用量の 100 μ g では脳室内投与 180 分後でも鎮痛作用が持続していた。この作用はグリシン受容体阻害薬のストリキニーネの脳室内前投与により完全に抑制された。一方、SNAP5114 は 200 μ g まで冷痛覚過敏に対して鎮痛作用が見られなかった。

von Frey test

ALX1313 は用量依存性に逃避反応閾値を上昇させた。100 μ g では脳室内投与 180 分後でも鎮痛作用が持続していた。この作用はグリシン受容体阻害薬のストリキニーネの脳室内前投与により完全に抑制された。(図 7) 一方、SNAP5114 は高用量でも機械痛覚過敏に対して鎮痛作用が見られなかった。(図 8)

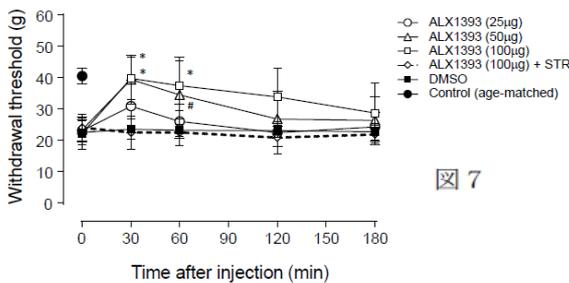


図 7

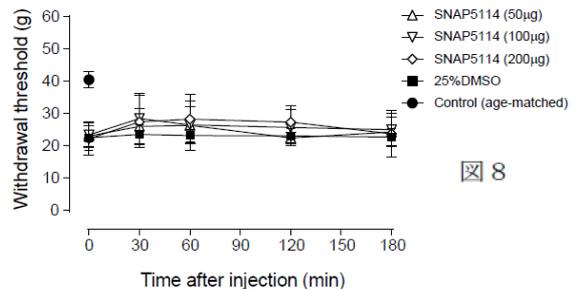


図 8

以上の結果から、DM モデルでは ALX1393 はシナプス間隙のグリシン濃度を上昇させてシナプス後膜のグリシン受容体を活性化させることで抑制性シナプス伝達を増強し、冷痛覚過敏および機械痛覚過敏に対して抗痛覚過敏作用が発現することが示唆された。一方、SNAP5114 により脳内の GAT3 機能を抑制し GABA 作動性神経伝達を増強させても抗痛覚過敏作用が発現しないことが示唆された。

(3) 急性痛に対する脳内 GAT3 の関与

これまでの実験で二種類の神経障害性痛モデルでは SNAP5114 の脳室内投与は高用量の 200 μ g でも鎮痛作用を示さなかった。そこで、急性痛に対する脳内 GAT3 の関与についても検討することとした。無処置の正常ラットを用いて SNAP5114 の最大投与量を 500 μ g に増やし、Tail flick test(図 9)と Hotplate test(図 10)を行った。200 μ g と 500 μ g は、ともに逃避反応潜時に影響を与えなかった。このことから急性痛においても神経障害性痛と同様に脳内 GAT3 は侵害受容伝達にほとんど関与していないことが示唆された。

Tail flick test

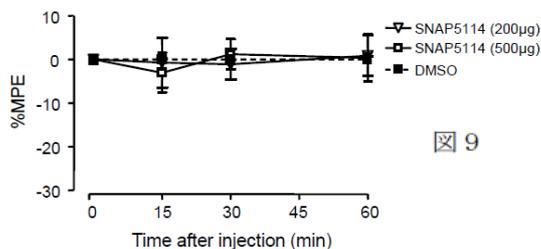


図 9

Hotplate test

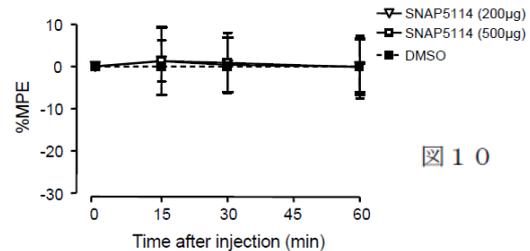


図 10

(4) 運動機能及び学習能力に対する脳内 GlyT2 の関与

CCI モデルラットで脳室内に投与した ALX1393 は高用量でも rotarod から転落するまでの時間(latency)に影響を与えなかった。このことから運動機能や学習能力に影響を与えない用量でも抗痛覚過敏作用が現れることが示唆された。(図 11)

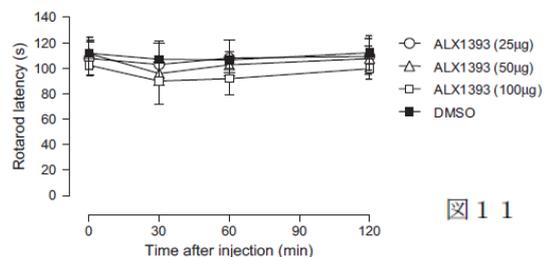


図 11

(5)不安、抑うつ症状に対する脳内 GlyT2 及び GAT3 の関与

ALX1393 及び SNAP5114 の脳室内投与 30 分後の不安関連行動について、ビデオ行動解析システムを用いて評価した。(図 1 2)

Open field test

ALX1393 は 50 µg までは総移動距離 (total distance) に影響を与えなかったが 100 µg では総移動距離を短縮させた。(図 1 3) SNAP5114 は 200 µg まで総移動距離には影響を与えなかった。また、両方とも中央部分 (inside zone) の滞在時間には影響を与えなかった。

高架式十時迷路試験

ALX1393 は 100 µg まで Open arm の滞在時間に影響を与えなかった。ALX1393 は抗痛覚過敏作用が発現する 50 µg までは総移動距離に影響を与えなかったが、100 µg では総移動距離が短縮し、Closed arm の滞在時間が短縮する一方でアームが交わる Central zone の滞在時間が延長した。(図 1 4) SNAP5114 は 200 µg まで Open arm の滞在時間と総移動距離には影響を与えなかった。

これらの結果から、SNAP5114 は脳室内投与では抗不安作用や抗うつ作用が発現しないことが示唆された。しかし、ALX1393 は高用量では locomotor activity (自発運動活性) を低下させる可能性がある。その結果、Closed arm の滞在時間が短縮し Central zone の滞在時間が延長したと考えられるが、この locomotor activity の低下と抗不安作用の発現を区別することは困難である。脳内の GlyT2 と GAT3 の情動反応への作用について解明するためにはこれら薬物を脳内の特定部位へ投与する必要があると考えられた。

本研究から、脳内で ALX1393 は二つの神経障害性痛モデルの機械及び冷痛覚過敏に対して抗痛覚過敏作用を示したが、SNAP5114 は神経障害性痛と急性痛に対して作用を示さなかった。また ALX1393 は高用量では自発運動活性を低下させたが、両薬物とも抗不安作用や抗うつ作用はほとんど無いと考えられた。脳内の GlyT2 は抗痛覚過敏作用と自発運動活性に関与する一方、GAT3 にはこれらの役割がないことが示唆された。GlyT2 は脊髄での抗侵害作用に関する過去の知見と併せて、神経障害性痛治療薬の新たな標的分子として有望であるが、臨床応用するためには更に研究が必要である。

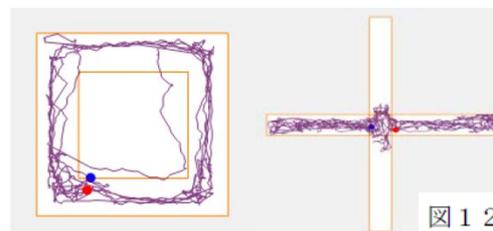


図 1 2

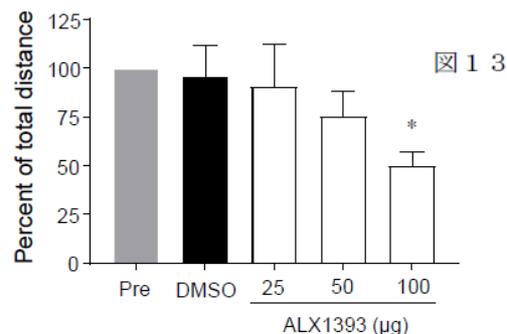


図 1 3

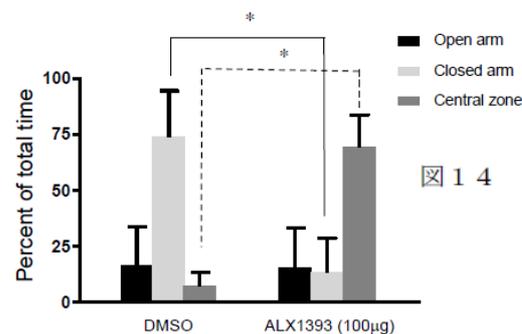


図 1 4

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

寺田忠徳, 中西 司, 北村典章. フェンタニル貼付剤 3 日型製剤から 1 日型製剤に変更して患者の生活の質の向上を認めた慢性疼痛患者の 2 症例、ペインクリニック、査読有、39、2018、1661-1663

寺田忠徳, 中西 司, 北村典章. ベンラファキシンを投与した結果、抑うつ症状と神経障害性疼痛の改善を認めた慢性腰痛患者の 1 症例、日本ペインクリニック学会、査読有、25、2018、268-272

Kumakura M, Hara K, Sata T. Sevoflurane-associated torsade de pointes in a patient with congenital long QT syndrome genotype 2. J Clin Anesth 2016 33:81-5. 査読有 doi: 10.1016/j.jclinane.2016.03.011.

[学会発表](計3件)

原西 保典、原 幸治、寺田 忠徳、ラット神経障害性痛モデルにおける非定型抗精神病薬ペロスピロンの抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第 6 5 回学術集会、2 0 1 8 年 5 月 1 7 日、パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、ラット神経障害性疼痛モデルにおける AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬ペランパネルの抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第 6 4 回学術集会、2 0 1 7 年 6 月 9 日、神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

原 幸治、原西 保典、寺田 忠徳、ラット神経障害性疼痛モデルにおけるカンナビノイド再取り込み阻害薬 AM404 の抗痛覚過敏作用、日本麻酔科学会第 6 3 回学術集会、2 0 1 6 年 5 月 2 7 日、福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：原 幸治

ローマ字氏名：(HARA, Koji)

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号(8桁): 20331001

研究分担者氏名：佐多 竹良

ローマ字氏名：(SATA, Takeyoshi)

所属研究機関名：産業医科大学

部局名：医学部

職名：名誉教授

研究者番号(8桁): 60128030