

平成30年6月18日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20080

研究課題名(和文)慢性痛における青斑核の機能変化のメカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of dysfunction of locus coeruleus in chronic neuropathic pain model

研究代表者

須藤 貴史(Suto, Takashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60739621

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)：本研究は慢性の神経障害性疼痛モデルにおける青斑核のグルタミン酸とGABAのバランスの変化に注目し、青斑核活動の変化と内因性鎮痛の発現との関連性を調査したものである。神経障害性疼痛モデルのSNLモデルの作成6週後には痛みにより誘発される内因性の鎮痛機構が消失する。この状態で青斑核内では痛みを受けてもグルタミン酸とGABAの変化はなく、内因性鎮痛が発動しないことが確認できた。また、脳由来神経栄養因子受容体のアゴニストである7,8-dihydroxyflavoneを5日間連日投与により青斑核の反応性が回復した。青斑核内で痛み刺激や薬剤に応じてGABAが減少することで相対的に興奮することが確認された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the balance of excitatory/inhibitory neurotransmitter in the locus coeruleus in order to examine the functional change of locus coeruleus following peripheral nerve injury (SNL model). The balance was assessed by measuring the concentration of glutamate and GABA with in vivo microdialysis. At 6 weeks following nerve injury, the animals did not show pain induced analgesia that reflects a part of endogenous analgesia. In the locus coeruleus of the animals, glutamate did not increase even after painful stimulation. Five days repeated treatment with 7,8-dihydroxyflavone (BDNF receptor agonist) could reverse the dysfunction of locus coeruleus by decreasing GABA release after painful stimulation. The restoration resulted in enhancement of analgesic effect of pregabalin. Co-administration of 7,8-dihydroxyflavone with pregabalin could be a novel strategy to treat chronic neuropathic pain.

研究分野：麻酔科学

キーワード：青斑核 神経障害性疼痛 脳由来神経栄養因子 内因性鎮痛

1. 研究開始当初の背景

外傷や手術による切断などによる末梢神経損傷は痛みにも似る不快な感覚をもたらす。これらは神経障害性疼痛として治療対象となるが治療は難しい。神経障害性疼痛の発症と維持には青斑核を起始核とするノルアドレナリン(NA)作動性神経系が関与している。NA 作動性神経は中枢神経系に広く投射し、機能調節を行っている。脊髄後角では内因性鎮痛機構(下行性抑制系)として疼痛シグナルの入力を調整している。また、前頭前野では認知機能に寄与する。我々の先行研究では神経障害による慢性痛状態では認知機能が低下し、NA による調整が破綻している可能性が示されている(Suto, Pain 2014)。また、内因性鎮痛機構(noxious stimulation induced analgesia: NSIA)が神経障害疼痛モデルの慢性期では減弱していることを報告した(Suto, Anesthesiology 2015)。青斑核の機能減弱は痛みの遷延化における重要な役割を果たしている可能性があり、機能低下のメカニズムの解明と機能回復法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

慢性の神経障害性疼痛モデルにおける青斑核の興奮と抑制のバランスは正常動物とどのように異なるのか？

正常動物では痛み刺激に応じて青斑核内でのグルタミン酸の放出が興奮を起こし、投射先でノルアドレナリンの放出を起こす。これが内因性鎮痛の発現に関与すると考えられている。慢性の神経障害性疼痛モデルでグルタミン酸の上昇が起こらないことが報告されている。しかし、抑制性の神経伝達物質である GABA の挙動については未解明である。

内因性鎮痛の改善と青斑核機能の関連の調査

これまでの研究で、脳由来神経栄養因子

(BDNF)は認知機能を改善させる効果が報告されている。また、鎮痛薬として使用される抗うつ薬は BDNF を増加させるものが報告されている。BDNF 受容体の低分子アゴニストである 7,8-dihydroxyflavone が減弱した内因性鎮痛に対しどのような効果を持つか検討する。また、青斑核機の興奮と抑制の調節へ影響を調査する。

内因性鎮痛と神経障害による痛みの関連性についての調査

痛みにより誘発される鎮痛(NSIA)を含む内因性鎮痛の回復が神経障害による痛みに対して鎮痛的に働くのかについて調査する。7,8-dihydroxyflavone が内因性鎮痛を改善させる場合、それが von Frey filament test の逃避閾値(誘発痛)に対してどのような影響を与えるのか調査する。

3. 研究の方法

慢性の神経障害性疼痛モデルとして spinal nerve ligation model (SNL)を用いた。Sprague-Dawley 雄性ラットの右第 5、第 6 腰神経を結紮切離した後、6 週間飼育したものをを用いた(SNL6 週群)。このラットに 7,8-dihydroxyflavone (5mg/kg/day)を 5 日間連続投与し、以下の実験に用いた。対照動物には溶媒のみを投与した。

青斑核周囲のグルタミン酸・GABA 測定
麻酔下にラットの左青斑核直上にカニューラを挿入し、数日の休息期間後、実験に用いた。麻酔下にマイクロダイアリスプローブを挿入し、プローブ中を毎分 1 μ l でリングル液を灌流させ、30 分間隔でサンプルを回収した。HPLC により分離、電気化学検出器(ECD)によるグルタミン酸・GABA の定量を行った。また、カプサイシン皮下投与後の変化を記録した。

脊髄の NA 測定

麻酔下に脊髄腰膨大部を露出、脊髄硬膜を切開し、マイクロダイアリスプローブを刺入した。プローブ中を毎分 1 μ l でリンゲル液を灌流させ、30 分間隔でサンプルを回収した。HPLC により分離、電気化学検出器 (ECD) による NA の定量を行った。また、カプサイシン皮下投与後の変化を記録した。

侵害刺激誘発性鎮痛 (Noxious stimulation induced analgesia: NSIA)

ラットの前足にカプサイシン 150 μ g を皮下注射による侵害刺激を与え、後足で paw-pressure test による逃避閾値を測定する。カプサイシン投与前と 30 分後の逃避閾値の差を下行性抑制系による効果として評価した。

免疫染色

ペントバルビタールによる深麻酔後、経心臓的に paraformaldehyde で灌流し組織の固定を行った。脊髄および青斑核付近組織を取り出し、マイクロトームで切片を作成した。脊髄では NA の合成酵素である D_H に対して蛍光 2 重染色法で免疫染色を行った。青斑核を含む組織は、神経興奮のマーカーの一つであるリン酸化 CREB の染色を行い、カプサイシン投与前後の興奮性の変化を正常動物と SNL6 週群、7,8-dihydroxyflavone 処置群で比較した。染色した組織は蛍光顕微鏡で観察し、画像解析ソフトを用いて脊髄後角および脳における染色性を群間で比較した。

神経障害性疼痛に対する作用

SNL6 週群において 7,8-dihydroxyflavone 処置が神経障害性疼痛に与える影響を von Frey filament test および paw pressure test により検討した。また、青斑核の興奮が鎮痛機序のひとつとして考えられているプレガバリンの効果に与える影響を同手法により

検討した。

4. 研究成果

内因性鎮痛減弱時の青斑核周囲のグルタミン酸/GABA の挙動
今回の実験結果からは正常動物と SNL 術後 6 週のグルタミン酸/GABA の基礎放出量に差は検出できなかった。また、カプサイシンを投与すると正常動物ではグルタミン酸の上昇が確認されたが、SNL 6 週後では見られなかった。GABA に関してはいずれの群も有意な変化がなかった。7,8-dihydroxyflavone 処置後の SNL 6 週群では基礎放出量には差が見られなかったが、カプサイシンを投与したあとで GABA の減少が見られ、青斑核が相対的に興奮する可能性が示唆された。

脊髄における NA の変化

正常動物ではカプサイシンにより NA の上昇が見られたが、SNL6 週群では上昇が見られなかった。7,8-dihydroxyflavone 処置した SNL 6 週群ではカプサイシン刺激による NA の増加が見られた。青斑核の興奮性の改善とともに投射先での NA の放出も確認できた。

NSIA

正常動物ではカプサイシン投与により逃避閾値の上昇が見られ、NSIA の発動が確認できた。一方、SNL 6 週群ではこの反応は見られなかった。7,8-dihydroxyflavone 処置した SNL 6 週群では NSIA が再度見られるようになった。この群における NSIA は NA 受容体の拮抗薬で消失し、青斑核および脊髄でのマイクロダイアリスの結果を反映しているものと考えられる。

免疫染色

正常動物ではカプサイシン投与により青斑核のノルアドレナリン作動性神経にリン酸化 CREB の発現が増加した。一方 SNL6 週群で

はカプサイシン投与前からリン酸化 CREB 陽性のノルアドレナリン作動性神経が多く、カプサイシン投与後にも変化は見られなかった。7,8-dihydroxyflavone 処置によりカプサイシン投与後のリン酸化 CREB 陽性のノルアドレナリン作動性神経は僅かに増加した。脊髄後角では正常動物に比較して SNL6 週群では D H 陽性の軸索密度が増加していた。7,8-dihydroxyflavone 処置した SNL6 週群では更に増加が見られた。

内因性鎮痛の疼痛行動への影響

減弱した下行性抑制系機能が7,8-dihydroxyflavone の連日投与により回復したが、神経障害による逃避閾値の低下には影響を与えなかった。しかし、術後早期のSNL と比較して減弱していたプレガバリンの鎮痛作用が増強された。自発痛など、この動物実験では測定できなかった痛みは未解明であり、今後の研究により解明していく。

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1件)

Daiki Kato, Takashi Suto, Hideaki Obata, Saito Shigeru, Spinal activation of tropomyosin receptor kinase B recovers the impaired endogenous analgesia in neuropathic pain rats. Anesthesia and Analgesia 2018, 査読あり, 掲載決定

[学会発表](計3件)

Takashi Suto, Hideaki Obata, Shigeru Saito, Effects of Brain-derived Neurotrophic Factor Signals on the Noradrenergic Descending Pain Inhibitory Systems, 16th World

Congress on Pain(国際学会), 2016

須藤貴史、太田浄、齋藤繁、神経栄養因子シグナルは神経障害性疼痛モデルにおける下行性抑制系の減弱を回復させる、日本麻酔科学会第64回学術集会、2017
須藤貴史、太田浄、加藤大樹、齋藤繁、慢性期神経障害性疼痛モデルにおける内因性鎮痛機構の減弱と急性痛の遷延化におけるノルアドレナリンを介した下行性抑制系の役割、第39回日本疼痛学会、2017

6 . 研究組織

(1)研究代表者

須藤 貴史 (SUTO, Takashi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:60739621