

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K01358

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛に対するボツリヌス療法の前臨床研究

研究課題名(英文) Preclinical study on botulinum toxin therapy in treatment for neuropathic pain

研究代表者

山本 由弥子 (YAMAMOTO, Yumiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403496

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)：これまで三叉神経障害性疼痛モデルラットを用いて、A型ボツリヌス神経毒素(BoNT/A)の疼痛抑制効果を解析してきた。本研究課題では、2つの抗がん薬誘発性疼痛モデルラットを作製して、BoNT/Aが抗がん薬誘発性の神経障害性疼痛に対しても有効であることを明らかにした。また、片側に投与されたBoNT/Aが両側性の疼痛抑制効果を示すことも明らかにした。

他方で、他の血清型のボツリヌス神経毒素による神経障害性疼痛治療の可能性も検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本人の2人に1人はがんになる時代において、抗がん薬による神経障害性疼痛で苦しむ患者さんは多い。これに対して有効な治療法はなく、抗がん薬の減量や化学療法の中止を余儀なくすることもある。本課題において、抗がん薬誘発性疼痛モデルラットでボツリヌス神経毒素の有効性を明らかにした。今後ボツリヌス神経毒素の作用機序を解明出来れば、詳細の分かっていない抗がん薬誘発性神経障害性疼痛発症機序の解明の一助になるとともに、ボツリヌス療法は抗がん薬誘発性神経障害性疼痛の治療においても期待できる。

研究成果の概要(英文)： We have previously shown that botulinum toxin type A (BoNT/A) alleviates trigeminal neuropathy induced by infraorbital nerve constriction. In this study, we generated two rat models of chemotherapy-induced peripheral neuropathy, and assessed the analgesic effect of BoNT/A in chemotherapy-induced neuropathy. Unilateral BoNT/A administration into the whisker pad area attenuated chemotherapy-induced mechanical allodynia bilaterally.

In addition, we investigated the cleavage of synaptobrevin and syntaxin in the trigeminal ganglion neurons by botulinum toxin type B (BoNT/B) and by botulinum toxin type C (BoNT/C) respectively, to apply BoNT/B and BoNT/C to treatment for neuropathic pain.

研究分野：細菌学

キーワード：ボツリヌス神経毒素 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

神経障害性疼痛は、末梢神経の物理的損傷、がんの浸潤、抗がん薬の投与、帯状疱疹後神経痛、糖尿病性ニューロパチーなど種々の原因により発症する。神経障害性疼痛発症のメカニズムが十分に解明されていないために、その治療は非常に困難となっている。申請者らは、眼窩下神経を結紮した三叉神経障害性疼痛モデルラットを用いて、A型ボツリヌス神経毒素(BoNT/A)に物理的損傷により発症した神経障害性疼痛に対する疼痛抑制効果があることを明らかにした。また、その疼痛抑制効果は、BoNT/Aが三叉神経節においてSNAREタンパク質のSNAP-25を切断することにより、神経伝達物質の遊離が抑制されて得られる可能性を示した。しかしながら、物理的損傷による疼痛モデルを用いて見出されたのと同じ作用機序でBoNT/Aが他の原因で発症した神経障害性疼痛に対して疼痛抑制効果を発揮するか否かは不明である。

2. 研究の目的

本研究課題では、神経障害性疼痛治療におけるボツリヌス療法の適応範囲の拡大、エビデンスに基づいた治療法の確立、副作用のない効果的な投与方法の実現を目指して、(1)~(3)を行い、抗がん薬誘発性神経障害性疼痛に対するBoNT/Aの有効性を解析する。

他方で、ボツリヌス神経毒素(BoNT)の効果は数ヶ月しか持続しないために反復投与が必要となるが、BoNT/Aの反復投与により中和抗体が産生されて治療が継続出来なくなった場合に備えて、他の血清型(B型、C型)のBoNTによる神経障害性疼痛治療の可能性も検討する。この目的のために、(4)と(5)を行う。

(1) 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットの作製

作用機序の異なる複数の抗がん薬により神経障害性疼痛モデルラットを作製して、それぞれの疼痛モデルが物理的刺激、温熱刺激のいずれに対して痛覚過敏やアロディニアを発症しているかを確認する。

(2) 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットにおけるBoNT/Aの疼痛抑制効果の検証

(1)で作製された疼痛モデルラットにおいて、BoNT/Aの投与により疼痛関連行動が抑制されるか否かを観察する。

(3) 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットにおけるBoNT/Aの疼痛抑制効果の作用機序の解析

BoNT/Aの疼痛抑制効果を確認出来れば、BoNT/Aの局在、BoNT/Aの機能部位などを解析する。

(4) 知覚神経節におけるSNAREタンパク質(synaptobrevin、syntaxin)の発現

これまでの申請者らの三叉神経障害性疼痛モデルラットを用いた研究から、BoNT/Aの疼痛抑制効果は、BoNT/Aが知覚神経節においてSNAREタンパク質のSNAP-25を切断することにより神経伝達物質の遊離が抑制されて得られると推察される。そこで、三叉神経節と後根神経節において、B型、D型、F型、G型ボツリヌス神経毒素の基質であるsynaptobrevinとC型ボツリヌス神経毒素(BoNT/C)の基質であるsyntaxinの発現を調べる。

(5) 知覚神経節におけるSNAREタンパク質(synaptobrevin、syntaxin)の切断

三叉神経節の初代培養細胞において、B型ボツリヌス神経毒素(BoNT/B)によるsynaptobrevinの切断とBoNT/Cによるsyntaxinの切断を調べる。

3. 研究の方法

(1) 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットにおけるBoNT/Aの疼痛抑制効果

抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットの作製

成熟Sprague-Dawley系雄性ラットの腹腔内にプラチナ製剤のシスプラチンあるいはピンカアルカロイド系抗がん薬のビンクリスチン硫酸塩を反復投与した。

von Frey フィラメント試験

ラット顔面部の左側、右側のそれぞれにvon Frey フィラメントを用いて機械刺激を与え、逃避行動を示す閾値を測定した。

BoNT/Aの投与

抗がん薬投与により神経障害性疼痛を発症したラットにおいて、A型ボツリヌス菌62A株から精製したBoNT/A(10 MLD(マウス最小致死量))を、ラットの右側の頬髭部に皮内投与した。

(2) 他の血清型(B型、C型)のBoNTによる神経障害性疼痛治療の可能性

知覚神経節におけるSNAREタンパク質(synaptobrevin、syntaxin)の発現

成熟Sprague-Dawley系雄性ラットから三叉神経節および後根神経節を摘出して、ウェスタンブロッティングによりsynaptobrevin、syntaxinの発現を調べた。Synaptobrevinのウェスタンブロッティングでは、本研究課題において作製された抗ペプチド抗体が用いられた。

三叉神経節培養細胞におけるSNAREタンパク質(synaptobrevin、syntaxin)の切断

1-2週齢のSprague-Dawley系ラットから三叉神経節を摘出し、コラゲナーゼ処理とトリプシ

ン処理により三叉神経節細胞を分離した。分離された細胞を 24-well プレートに播種、一晚培養した後、B 型ボツリヌス菌 B-okra 株から精製した BoNT/B または C 型ボツリヌス菌 C-stockholm 株から精製した BoNT/C を添加して培養を続けた。次いで、ウェスタンブロッティングにより synaptobrevin、syntaxin の切断を調べた。

なお、動物実験は、岡山大学自然生命科学研究支援センター動物資源部門 岡山大学動物実験委員会及び徳島大学動物実験管理委員会に申請書を提出して承認を受けた上で、法令を遵守して実施した。

4. 研究成果

(1) 抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルラットにおける BoNT/A の疼痛抑制効果

シスプラチン誘発性神経障害性疼痛モデル

プラチナ製剤は、DNA に結合して DNA を架橋することにより、DNA 複製を阻害、アポトーシスを誘導して抗腫瘍効果を発揮する。プラチナ製剤の一つであるシスプラチン (2 mg/kg/day) を 1 日毎に 4 日間、Sprague-Dawley 系ラットの腹腔内に投与して、ラット顔面部で von Frey 試験を行なったところ、逃避行動を示す閾値の低下が観察された。このことから、シスプラチンの投与により機械的アロディニアを発症していることが確認できた。また、疼痛は少なくとも 30 日間持続することが分かった。そこで、シスプラチンの初回投与から 15 日目にラットの右側の頬髭部に BoNT/A (10 MLD) を末梢皮内投与したところ、BoNT/A 投与側 (右側) だけでなく、BoNT/A 非投与側 (左側) でも閾値の回復が認められて、片側に投与された BoNT/A が両側性の疼痛抑制効果を示すことが明らかとなった (図 1)。

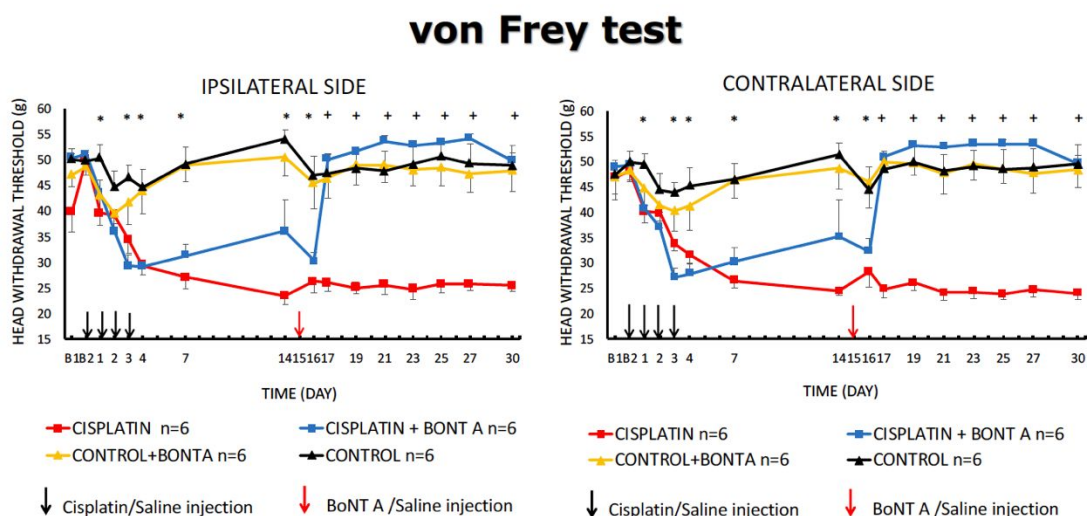


図1 シスプラチン誘発性神経障害性疼痛モデルラットにおけるBoNT/Aの疼痛抑制効果

ビンクリスチン誘発性神経障害性疼痛モデル

ビンカルカロイド系の抗がん薬は、微小管に結合することにより微小管の重合を阻害、細胞分裂を停止させて抗腫瘍効果を発揮する。ビンカルカロイド系の抗がん薬の一つであるビンクリスチン (100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$) を 1 日毎に 5 日間の腹腔内投与を 2 日間の間隔をあけて 2 回行ったところ、機械的アロディニアを発症した。ビンクリスチンの初回投与から 15 日目にラットの右側の頬髭部に BoNT/A (10 MLD) を末梢皮内投与したところ、シスプラチン誘発性神経障害性疼痛モデルでの観察と同様に、片側に投与された BoNT/A が両側性の疼痛抑制効果を示すことが明らかとなった。

抗がん薬誘発性神経障害性疼痛モデルにおける BoNT/A の作用機序の解析

シスプラチン誘発性神経障害性疼痛モデルおよびビンクリスチン誘発性神経障害性疼痛モデルにおいて、片側に投与された BoNT/A が両側性の疼痛抑制効果が明らかとなったので、BoNT/A 投与側 (右側) と BoNT/A 非投与側 (左側) の三叉神経節組織、脳幹を摘出して、BoNT/A の基質である SNAP-25 の切断をウェスタンブロッティングにより調べた。しかしながら、いずれの組織においても切断された SNAP-25 は検出されず、BoNT/A の機能部位を同定するには至らなかった。

三叉神経障害性疼痛モデルラットを用いた以前の研究では、BoNT/A の疼痛抑制効果は BoNT/A の投与側に限局されると考えられていた。本研究により、片側に投与された BoNT/A が両側性の疼痛抑制効果が明らかとなった。今後、それぞれの疼痛モデルで作用機序を解明して、神経障害性疼痛治療におけるボツリヌス療法を確立させたい。

(2) 他の血清型 (B 型、 C 型) の BoNT による神経障害性疼痛治療の可能性

まず、三叉神経節組織と後根神経節組織において、B型、D型、F型、G型のBoNTの基質である synaptobrevin と C 型の BoNT の基質である syntaxin が確かに発現していることをウェスタンブロッティングにより確認した。次いで、三叉神経節初代培養細胞に BoNT/B あるいは BoNT/C を投与して、synaptobrevin と syntaxin の切断をウェスタンブロッティングによりそれぞれ調べた。BoNT/C による syntaxin の切断を確認することは出来なかったが、BoNT/B の投与により synaptobrevin のバンドが消失することを認めて、BoNT/B によっても神経障害性疼痛の治療が可能であると考えられた。BoNT/C は syntaxin と SNAP-25 を基質とすることから、三叉神経節培養細胞で BoNT/C による SNAP-25 の切断も調べた。その結果、BoNT/C の投与による SNAP-25 の分子量シフトを認め、SNAP-25 をターゲットとすることで、BoNT/C も神経障害性疼痛の治療に臨床応用できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 阪口義彦、内山淳平、小椋義俊、後藤和義、山本由弥子、松崎茂展、山口明日美、林哲也、小熊恵二、林俊治
2. 発表標題 C型とD型ボツリヌス毒素変換ファージの解析
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山本由弥子、丸濱功太郎、松香芳三、美間健彦、後藤和義、Arief Waskitho、横田憲治、阪口義彦、松下治、小熊恵二
2. 発表標題 ボツリヌス神経毒素の三叉神経節での作用機構の解析
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arief Waskitho, Yumiko Yamamoto, Tsuyoshi Morita, Huijiao Yan, Resmi Raju, Masamitsu Oshima, Junhel Dalanon, Otto Baba, Yoshizo Matsuka
2. 発表標題 Orofacial neuropathic pain rat models induced by chemotherapy drugs
3. 学会等名 Tokushima University Bioscience Retreat
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Arief Waskitho, Yumiko Yamamoto, Tsuyoshi Morita, Huijiao Yan, Resmi Raju, Masamitsu Oshima, Junhel Dalanon, Otto Baba, Yoshizo Matsuka
2. 発表標題 Bilateral effects of unilateral administration of botulinum toxin A in chemotherapy induced neuropathy
3. 学会等名 Dentisphere (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 小熊恵二、鈴木智典、山本由弥子	4. 発行年 2017年
2. 出版社 北海道大学出版会	5. 総ページ数 916 (304-308)
3. 書名 病原細菌・ウイルス図鑑 (ポツリヌス菌)	

〔産業財産権〕

〔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	丸濱 功太郎 (MARUHAMA Kotaro) (60712792)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教 (15301)	
研究 分担者	松香 芳三 (MATSUKA Yoshizo) (90243477)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(歯学域)・教授 (16101)	