

令和 3 年 5 月 17 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08838

研究課題名(和文) ラット神経障害性痛モデルにおけるカンナビノイド再取り込み阻害薬の中枢神経作用

研究課題名(英文) Central effects of cannabinoid reuptake inhibitors in rat neuropathic pain models

研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・大学病院・准教授

研究者番号：20331001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：内因性カンナビノイド再取り込み阻害薬のAM404が脊髄で神経障害性疼痛を抑制するかラット坐骨神経絞扼モデルを使って調べた。AM404は発現させた機械痛覚過敏と冷痛覚過敏を運動機能に影響を与えない用量で抑制した。AM404の抗痛覚過敏作用はカンナビノイド受容体CB1阻害薬を投与すると抑制されたが、TRPV1受容体阻害薬では増強した。CB2阻害薬は作用を認めなかった。AM404はCB1受容体を活性化して鎮痛作用を発現する一方でTRPV1受容体を活性化して痛覚閾値を低下させることが示唆された。カンナビノイド再取り込み阻害薬のAM404は副作用が少ない新しい神経障害性疼痛治療薬となる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛の治療薬は有効性が低く、ふらつきや眠気などの重大な副作用があるため日常生活だけでなく仕事や学習に支障を来している。新しい治療薬の開発が望まれている。内因性カンナビノイドは中枢神経系で侵害受容伝達の抑制に強く関与している。再取り込み阻害薬のうち、AM404は侵害受容伝達に重要な部位の脊髄で神経障害性疼痛に対して鎮痛作用を示した。一方、中等量までは運動機能への影響は軽微だった。本研究でカンナビノイド再取り込み阻害薬は新たな神経障害性疼痛治療薬となる可能性が示唆された。AM404が臨床応用されるためには運動機能以外の重大な副作用である精神症状の発現の有無なども今後検討する必要がある。

研究成果の概要(英文)：There are no therapeutic agents for neuropathic pain that are effective and have minor side effects, and the development of new therapeutic agents is expected. The endocannabinoid system modulates a wide variety of pain conditions. Here, we explored the effect of AM404, an endocannabinoid reuptake inhibitor, on neuropathic pain at the site of the spinal cord. AM404 attenuated mechanical and cold hyperalgesia with minimal effects on motor coordination. AM251 significantly inhibited the antihyperalgesic action of AM404, whereas capsazepine showed a potentiating effect. AM404 exerts antihyperalgesic effects primarily via cannabinoid receptors (CB)1, but not CB2, receptor activation at the site of the spinal cord. Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) appears to play a pronociceptive role. The endocannabinoid reuptake inhibitor may be a promising candidate treatment for neuropathic pain.

研究分野：疼痛管理学

キーワード：神経障害性疼痛 中枢神経 カンナビノイド 再取り込み阻害

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は治療が困難で慢性痛の主たる原因である。現在、臨床応用されている薬物は有効性が低いことに加え、眠気やふらつき、精神症状など重大な副作用が発現し、薬物治療が困難な場合もある。このため多くの患者で日常生活動作が損なわれ、痛みの悪循環に陥る。慢性痛はまた、高率に不安障害や抑うつ状態を引き起こすため治療効果が著しく低下し、破壊的思考を来し病態を複雑化させている。従って従来の治療薬と異なる作用機序を持つ副作用の少ない、新しい神経障害性疼痛治療薬の開発が必要である。副作用を軽減するためには薬物が中枢及び末梢において侵害受容伝達に重要な役割を担っている部位に選択的に作用する必要がある。

2. 研究の目的

内因性カンナビノイドは中枢神経系で侵害受容伝達の抑制や脳内報酬系の賦活に強く関与している。二つのカンナビノイド受容体サブタイプ(CB₁/CB₂)が同定されており、動物モデルとヒトでそれぞれの受容体作動薬の鎮痛作用が認められている。CB₁受容体作動薬は強い鎮痛効果を示すが一方で幻覚などの精神症状の出現が課題となっている。CB₂受容体作動薬は最近、臨床試験で神経障害性疼痛に対する有効性が認められている。本研究は神経障害性疼痛モデルを用いて内因性カンナビノイド系を活性化させるカンナビノイド取込み阻害薬を髄腔内に投与し、脊髄での抗侵害作用のほか、臨床応用に不可欠な運動機能・記憶/学習能力への影響について行動薬理学的に検討する。受容体作動薬を投与するよりも内因性の生理活性物質の機能を増強させる方が生理的恒常性への影響が少なく、副作用を軽減できる可能性がある。本研究は神経障害性疼痛治療薬としてのカンナビノイド再取込み阻害薬の可能性について検討する。

3. 研究の方法

(1)神経障害性痛モデルの作製 (担当: 原・原西・寺田)

坐骨神経絞扼モデル(CCI)

Bennett and Xieの方法¹⁾により、雄 Sprague-Dawley (SD)ラットをセボフルラン麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開し片側の坐骨神経を4.0-silk糸で4箇所緩く結紮する。坐骨神経の剥離・露出のみを行う sham手術を施し、坐骨神経損傷の影響を確認する。Ugo Basile社製圧刺激疼痛閾値測定装置 model:37215 を用いて痛覚過敏が認められたラットを用いて実験を行う。CCIラットは一群6匹ずつランダムに各処置群に割り当てられた。

(2)髄腔内カテーテル留置 (担当: 原・原西・寺田)

坐骨神経絞扼手術に続いて、薬物をくも膜下腔に投与するため、セボフルラン麻酔下に頭部固定装置を用いてSDラットの大槽からポリエチレンカテーテル(PE-10)を尾側に向かって8.0 cm挿入し、皮下トンネルを作成して頭部に固定した。処置1週間後に30Gの注入針を装着したマイクロシリンジをPE-10に接続し、薬物または溶媒の50%dimethyl sulfoxide(DMSO)10µlを緩徐に注入した。<参考文献> 1) Bennett and Xie. Pain 1988;33:87

上記処置から1週間後に神経障害性疼痛(CCI)モデルラットにカンナビノイド取込み阻害薬 AM404(20, 50, 100µg/rat)(図1)を投与し、以下の疼痛閾値試験、運動機能試験を行って定量評価した。神経障害性疼痛の第一選択治療薬であるgabapentin(100µg)を対照薬として抗侵害作用と運動機能への抑制作用についてAM404と比較した。また、選択的CB₁受容体阻害薬のAM251、選択的CB₂受容体阻害薬のAM630、CB₂受容体作動薬のJWH015、TRPV1受容体作動薬のcapsaicin、TRPV1受容体阻害薬のcapsazepineを髄腔内投与し、脊髄での内因性カンナビノイド再取込み阻害薬の鎮痛作用機序と運動機能への影響を行動薬理学的により詳細に検討した。

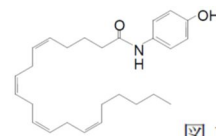


図1

(3)熱・冷刺激および機械刺激過敏性への作用を調べる実験 (担当: 原・原西)

Cold plate test (冷的痛覚過敏に対する作用)

Ugo Basile社製 Hot/Cold plate, model 35100を用いる。神経障害性痛では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する。2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する。

Electronic von Frey test (機械的痛覚過敏に対する作用)

IITC Life Science社製 model 2391Cを用いる。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)を測定する。

(4)運動・学習機能への作用を調べる実験 (担当: 原・原西・寺田)

Rotarod test

Ugo Basile社製 model 47700を用いる。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(秒)を測定する。1時間間隔で3回測定を行うと学習能力により潜時が延長する。

(5)測定データの統計解析 (担当: 原・原西・寺田)

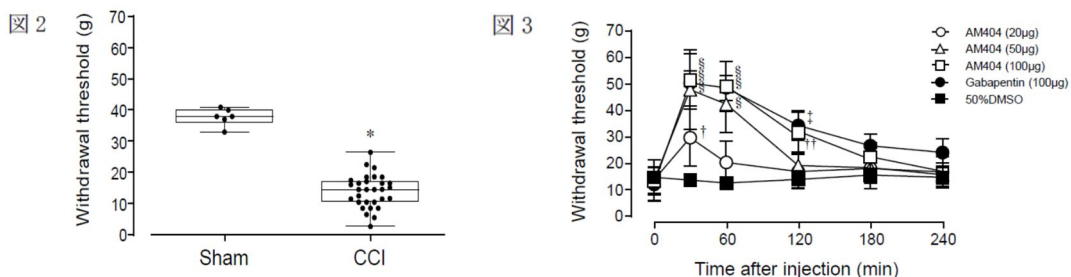
結果は、平均±標準偏差または中央値[25%値, 75%値]で表した。データはnested one-way ANOVAまたはthree-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test, the Mann-Whitney U testで統計解析し、P<0.05を有意とした(各群6匹) †p<0.05, ††p<0.01, †††p<0.001 and

§ p < 0.0001 compared with 50%DMSO.

4. 研究成果

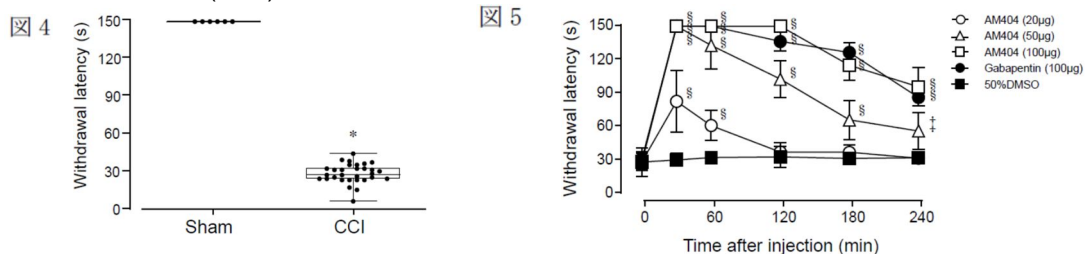
(1) CCI ラットにおける AM404 髄腔内投与の機械痛覚過敏に対する影響

Electronic von Frey test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応閾値が低下した。(sham: 38.0 g, [36.0, 40.3]; CCI: 14.0 g, [10.0, 16.7], the Mann-Whitney U test, p < 0.0001) (図 2) AM404 投与から 30, 60, 120, 180, 240 分後の逃避行動閾値を測定した。AM404 は機械痛覚過敏に対して用量依存性に閾値を増加した。AM404 (100 μg) の抗痛覚過敏作用は gabapentin (100 μg) と同等であった。(図 3)



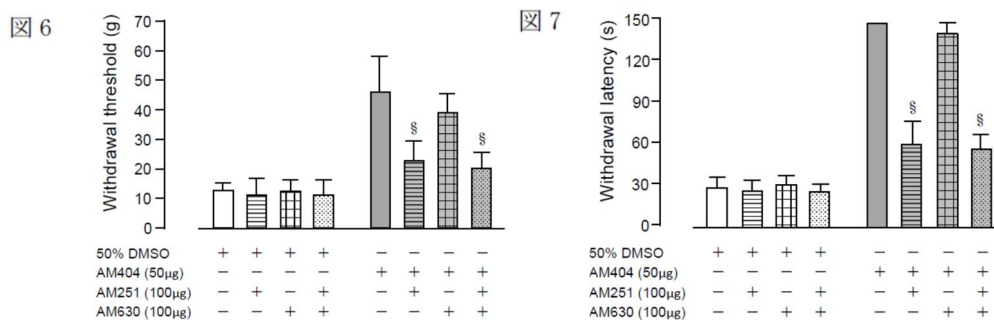
(2) CCI ラットにおける AM404 髄腔内投与の冷痛覚過敏に対する影響

Cold plate test で CCI ラットは sham ラットと比較して逃避反応潜時が減少した。(sham: 150 秒, [150, 150]; CCI: 28.5 秒, [24.8, 33.8], the Mann-Whitney U test, p < 0.0001) (図 4) AM404 投与から 30, 60, 120, 180, 240 分後の逃避行動潜時を測定した。AM404 は冷痛覚過敏に対して用量依存性に潜時を増加した。AM404 (100 μg) の抗痛覚過敏作用は gabapentin (100 μg) と同等であった。(図 5)



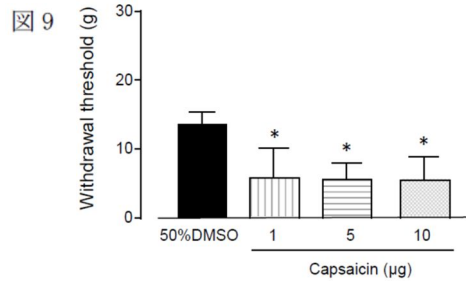
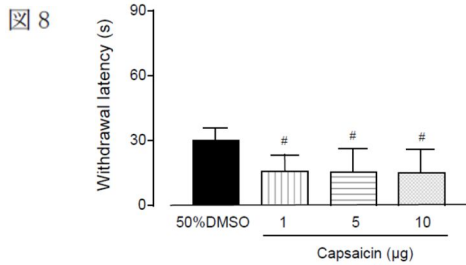
(3) AM404 の抗痛覚過敏作用に対する CB₁, CB₂ 受容体阻害薬の影響

AM404 の抗痛覚過敏作用の機序を調べるため、CB₁ 受容体阻害薬の AM251 (100 μg)、CB₂ 受容体阻害薬 AM630 (100 μg) を AM404 (50 μg) の投与 5 分前に髄腔内に投与し、AM404 投与から 30 分後の逃避反応閾値(g)と潜時(秒)を測定した。Electronic von Frey test で AM404 (50 μg) の抗痛覚過敏作用は AM251 によって有意に抑制された。一方 AM630 は AM404 の作用に影響を与えなかった。(図 6) Cold plate test でも同様に、AM404 (50 μg) の抗痛覚過敏作用は AM251 によって有意に抑制された一方で AM630 は AM404 の作用に影響を与えなかった。(図 7)



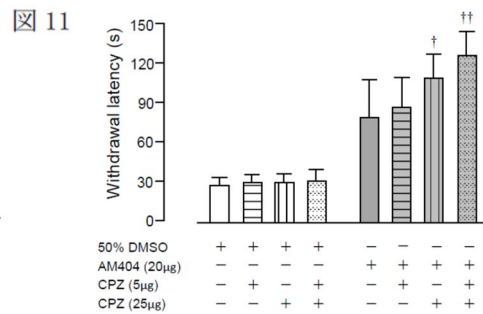
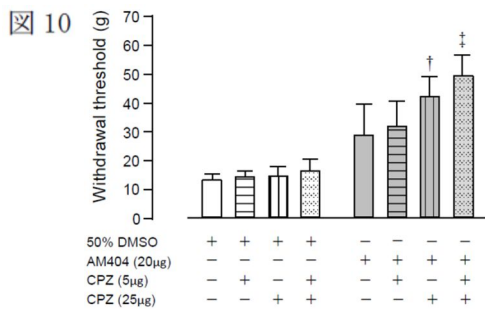
(4) CCI ラットにおける痛覚閾値に対する脊髄 TRPV1 受容体の役割について

CCI ラットの侵害受容伝達における脊髄の TRPV1 受容体の役割を理解するため、TRPV1 受容体作動薬の capsaicin (1, 5, 10 μg) を髄腔内に投与し、30 分後に逃避反応閾値(g)と潜時(秒)を測定した。Capsaicin は低用量で electronic von Frey test の逃避反応閾値 (図 8) と cold plate test の逃避反応潜時 (図 9) をそれぞれ減少させた。



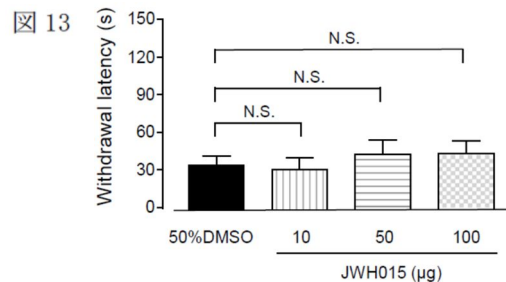
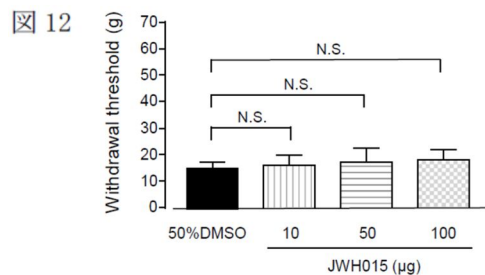
(5)AM404 の抗痛覚過敏作用に対する TRPV1 受容体阻害薬の影響

AM404 の TRPV1 受容体アゴニスト作用が抗痛覚過敏作用にどのように影響しているか調べた。Capsaicin が逃避反応閾値と潜時を減少させたことから、TRPV1 受容体を介した AM404 の作用は疼痛過敏であることが予想された。TRPV1 受容体阻害薬の capsazepine (25 µg) を AM404 (20 µg) の投与 5 分前に髄腔内に投与し、AM404 投与 30 分後の逃避反応閾値 (g) および潜時 (秒) を測定した。Electronic von Frey test で AM404 (20 µg) の抗痛覚過敏作用は capsazepine によって有意に増強した。(図 10) Cold plate test でも同様に AM404 (20 µg) の抗痛覚過敏作用は capsazepine によって有意に増強した。(図 11)



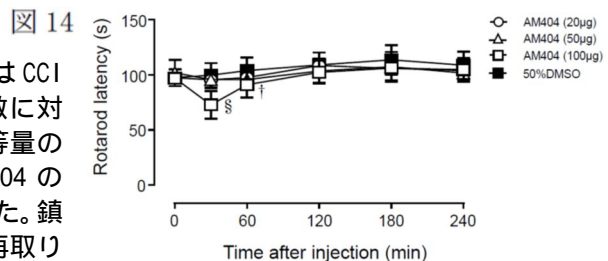
(6)CCI ラットにおける痛覚閾値に対する脊髄 CB₂ 受容体の役割について

CB₂ 受容体阻害薬 AM630 (100 µg) が AM404 の作用に影響を及ぼさなかったため、CCI ラットの侵害受容伝達における脊髄の CB₂ 受容体の役割を理解するため、CB₂ 受容体作動薬の JWH015 (20, 50, 100 µg) を髄腔内に投与し、30 分後の逃避反応閾値 (g) および潜時 (秒) を測定した。JWH015 は高用量でも electronic von Frey test (図 12) と cold plate test (図 13) で機械痛覚過敏と冷痛覚過敏の痛覚閾値に全く影響を与えなかった。



(7)CCI ラットにおける AM404 髄腔内投与の運動機能(協調運動)に対する影響

AM404 の臨床応用の可能性を探るため、副作用である運動機能への作用を調べた。AM404 投与から 30, 60, 120, 180, 240 分後の閾値を測定した。CCI ラットのベースライン潜時は 97 ± 11 秒であった。高用量の AM404 (100 µg) は投与 30 分後の潜時を有意に減少させたが、AM404 (20, 50 µg) は影響を与えなかった。(図 14)



以上の結果から、髄腔内に投与した AM404 は CCI ラットに発現した機械痛覚過敏と冷痛覚過敏に対して強力な鎮痛作用を示した。その程度は中等量の gabapentin と同等であった。また脊髄は AM404 の主要な作用部位の一つであることが示唆された。鎮痛作用機序として、内因性カンナビノイドの再取り込みが阻害され、シナプス間隙での濃度が上昇し、CB₁ 受容体を活性化することが考えられる一方で、CB₂ 受容体は関与していないことが示唆された。CB₂ 受容体作動薬の JWH015 が痛覚閾値に

全く影響を与えなかったことから、我々が作製した CCI モデルラットは少なくとも手術から 1 週間後の時点で脊髄における CB₂ 受容体の発現量が少ないことが考えられた。続いて AM404 が TRPV1 受容体アゴニストでもあることから、先ず CCI モデルでの脊髄 TRPV1 受容体の痛覚閾値に対する役割について検討した。TRPV1 受容体作動薬の capsaicin は痛覚過敏を増強した。一方、TRPV1 受容体阻害薬の capsazepine が AM404 の鎮痛作用を増強したことから、AM404 は TRPV1 受容体を介して痛覚閾値を低下している可能性が考えられた。AM404 が抗痛覚過敏作用を発現するのはその内因性カンナビノイド増強作用が TRPV1 受容体活性化作用に打ち勝つためだと推測される。AM404 は高用量で運動機能を軽度抑制することから、ふらつきや眠気などの副作用は少ないことが期待できる。AM404 を臨床応用するには更に精神症状に関する副作用の検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Hara K, Haranishi Y, Terada T. | 4. 巻 872 |
| 2. 論文標題 Intrathecally administered perampnolol alleviates neuropathic and inflammatory pain in rats | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Eur J Pharmacol | 6. 最初と最後の頁 172949 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ejphar.2020.172949. | 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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Haranishi Y, Hara K, Terada T. | 4. 巻 195 |
| 2. 論文標題 Antihyperalgesic effects of intrathecal perospirone in a rat model of neuropathic pain | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pharmacol Biochem Behav | 6. 最初と最後の頁 172964 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pbb.2020.172964. | 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 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Haranishi Y, Hara K, Terada T. | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Inhibitory effect of intrathecally administered AM404, an endocannabinoid reuptake inhibitor, on neuropathic pain in a rat chronic constriction injury model | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Pharmacol Rep | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43440-021-00250-2. | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 原幸治、原西保典、寺田忠徳 |
| 2. 発表標題 ラット疼痛モデルにおけるザクロ由来ポリフェノール・ブニカラジン髄腔内投与の抗侵害作用 |
| 3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 原幸治、原西保典、寺田忠徳 |
| 2. 発表標題 ラット神経障害性痛モデルにおける植物由来ベルバスコンド髄腔内投与の抗痛覚過敏作用 |
| 3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会 |
| 4. 発表年 2020年 |

〔図書〕 計0件

〔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 | 寺田 忠徳 (TERADA Tadanori) (10399206) | 産業医科大学・医学部・講師 (37116) | |
| 研究分担者 | 原西 保典 (HARANISHI Yasunori) (90449942) | 産業医科大学・医学部・非常勤医師 (37116) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|