

平成 22 年 5 月 10 日現在

研究種目: 基盤研究(C)  
 研究期間: 2007~2009  
 課題番号: 19603022  
 研究課題名(和文) 中枢性コリン作動性神経を標的とした神経因性疼痛伝達機構の解明と治療薬の開発

研究課題名(英文) Drug discovery and the mechanism of neuropathic pain targeting central cholinergic systems

## 研究代表者

本多 健治 (HONDA KENJI)  
 福岡大学・薬学部・助教  
 研究者番号: 60140761

研究成果の概要(和文): 本研究では、末梢神経障害に伴う神経因性疼痛に対する中枢性コリン作動性神経のムスカリン受容体とグリア細胞の機能的役割について脊髄と脳で研究しました。その結果、①脊髄内ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の興奮は鎮痛作用を示すことを明らかにしました。この鎮痛作用には GABA<sub>A</sub> 受容体の活性化が一部関与していました。また、脳内前帯状回ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の興奮は GABA 作動性神経を介し疼痛伝達を抑制することで、痛みの緩和に深く関与していることを明らかにしました。②脊髄グリア細胞は、神経因性疼痛の主症状であるアロディニア発現に深く関与することを証明しました。また、抗生物質のミノサイクリンは神経損傷によるミクログリア細胞の増加と Chemotactic Cytokine Ligand (CCL)-1 の産生を抑制して、抗アロディニア効果を発現することを証明しました。この成果は、疼痛における臨床応用の可能性を示唆しています。

研究成果の概要(英文): ①In this study, we examined the mechanism of neuropathic pain in spinal cord and brain. Especially, we demonstrated how the muscarinic receptors in spinal cord and brain involve in neuropathic pain. Activation of spinal muscarinic M<sub>1</sub> receptors produces analgesic effect to nociceptive stimulation and, at least in part, through neuronal pathways involving spinal GABA<sub>A</sub> receptors. In addition, Activation of muscarinic M<sub>1</sub> receptors in the the cingulate cortex attenuated the neuropathic pain and the analgesic effect was mediated by both GABA<sub>A</sub> and GABA<sub>B</sub> receptors. ②In addition, we examined the functional role of chemokines in neuropathic pain. Pre-administrations of microglia inhibitor minocycline inhibited the allodynia. This result supports that Chemotactic Cytokine Ligand (CCL)-1 in the spinal cord contributes to the development of neuropathic pain.

## 交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛

キーワード：神経障害性疼痛、中枢性ムスカリン受容体、GABA 作動性神経、ミクログリア細胞、ケモカイン

### 1. 研究開始当初の背景

世界人口の三分の一以上の人々が、慢性痛に悩まされていることが報告されています。慢性的な痛みは、労働意欲の低下と生きる希望をも奪うことが考えられます。しかし、現在、難治性の痛みの治療に満足している人はわずか半数と考えられています。特に、慢性痛の中でも、神経損傷に起因する神経障害性疼痛は、抗炎症剤やモルヒネに抵抗性を示す難治性の慢性疼痛疾患で有効な鎮痛薬はありません。そこで、神経障害性疼痛発症の仕組みの解明と新たな鎮痛薬の開発が急がれています。

### 2. 研究の目的

本研究では、(1) 脊髄より上位の脳の中でのコリン作動性神経とその受容体のムスカリン受容体の疼痛伝達への役割は、いまだ明らかではありません。そこで、神経因性疼痛とその痛覚伝達系に対する脊髄と脳内ムスカリン受容体の関与を詳細に研究しました。(2) 脊髄グリア細胞とケモカインに焦点を合わせ、神経因性疼痛発症の関連を調べました。

### 3. 研究の方法

#### (1) 神経障害性疼痛モデル動物の作製：

マウスおよびラットを用い Seltzer らに準じ坐骨神経部分結紮による末梢神経損傷モデルを作製しました。

#### (2) 末梢神経障害と疼痛：

① 作製された坐骨神経部分結紮モデル動物を用いて、末梢神経障害による神経因性疼痛発症の仕組みを調べました。神経因性疼痛は、機械的刺激あるいは熱刺激に対する疼痛反応から、異痛症（衣服が触れただけでも痛みを感じる：アロディニア）、痛覚過敏や知覚鈍麻を評価しました。特に、機械刺激に対しては神経因性疼痛の主症状機械刺激性アロディニアが問題になることから、von Frey フィラメントによる触圧刺激試験を行った。熱刺激に対しては、足底部を熱刺激す

るプランター法と tail-flick 法で評価した。

② 侵害刺激疼痛と神経因性疼痛における薬理学的実験：痛覚過敏・触圧過敏に対するムスカリン性アセチルコリン受容体（ムスカリン受容体）受容体の効果を検討するために、拮抗薬および作動薬を用いて鎮痛効果を調べました。薬物は主に脊髄クモ膜下腔内および脳室内に投与しました。

③ 神経因性疼痛におけるミクログリア細胞、サイトカイン・ケモカインの関与：神経因性疼痛に、グリア細胞、サイトカイン・ケモカインがどのように関与しているかを調べました。そのために、マウス脊髄のサイトカイン・ケモカインを形態的また定量的に検討しました。ミクログリア細胞活性阻制薬の抗生物質ミノサイクリンが神経因性疼痛に有効であることを明らかにする目的で、ミノサイクリン腹腔内投与し、疼痛やサイトカイン・ケモカインの動態を調べました。

### 4. 研究成果

(1) 脊髄ムスカリン受容体サブタイプと痛覚伝達抑制機構：

すでに私たちは糖尿病による神経障害性疼痛と脊髄ムスカリン受容体との関連を報告しています (Eur. J. Pharmacol. 505, 75-82, 2004)。本研究ではさらに脊髄でのムスカリン受容体がどのように痛覚伝達に関与しているかを詳細に検討しました。

脊髄内ムスカリン受容体刺激は糖尿病による神経障害性疼痛（アロディニア）と熱による強い痛み刺激に対して鎮痛作用を示しました。この鎮痛作用には、脊髄内ムスカリン  $M_1$  受容体とムスカリン  $M_4$  受容体が関与していました。さらに、脊髄ムスカリン受容体による鎮痛作用には  $GABA_A$  受容体の活性化が一部関与していました（雑誌論文④、⑥、⑧）。この結果は、脊髄での電気生理学的実験でムスカリン受容体は介在抑制性 GABA 作動性神経を賦活するという報告からも支持されます。

以上の結果から、図 1 に示すように、GABA

作動性神経終末に存在する Gq タンパク質共役型ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体が活性化されると、細胞内 Ca<sup>2+</sup> の上昇し、GABA 作動性神経からの GABA の遊離を引き起こします。その結果、GABA<sub>A</sub> 受容体が活性化し、痛覚伝達を抑制すると考えられます。一方、Gi タンパク質共役型ムスカリン M<sub>4</sub> 受容体の活性化は Gi タンパク質共役型受容体にみられる伝達物質の遊離抑制や K<sup>+</sup> チャンネルの開閉を介し、痛覚伝達を直接的に抑制すると思われます（雑誌論文⑤, ⑥, ⑨）。

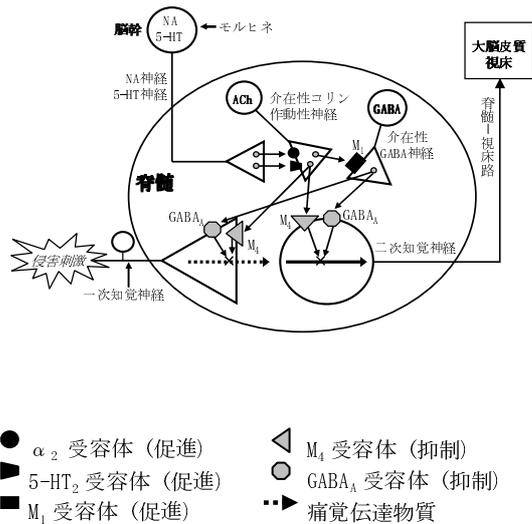


図1 痛覚伝達系における脊髄ムスカリン受容体の調節様式

## (2) 脳内ムスカリン受容体サブタイプと痛覚伝達抑制機構神経因性疼痛：

神経因性疼痛に脳内ムスカリン受容体がどのように関与しているかを調べました。坐骨神経を結紮することにより3日目から神経因性疼痛の主症状であるアロディニアの発現が見られ、約3カ月間持続しました。このアロディニアはムスカリン M<sub>1</sub>/M<sub>4</sub> 受容体作動薬 McN-A-343 を前帯状回内に局所投与することにより抑制されたが、視床内投与では抑制されませんでした。また、この抗アロディニア作用はムスカリン M<sub>1</sub> 受容体拮抗薬の前帯状回内投与により抑制されました。しかし、ムスカリン M<sub>4</sub> 受容体拮抗では抑制されませんでした。さらに、免疫組織学的検討から前帯状回内にムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の存在が確認されました。これらの結果から、前帯状回内ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の興奮が神経因性疼痛の抑制に深く関与することが明らかになりました。次に、前帯状回内ムスカリン M<sub>1</sub>

受容体を介する抗アロディニア作用における GABA 作動性神経の関与を検討しました。GABA<sub>A</sub> 受容体拮抗薬または GABA<sub>B</sub> 受容体拮抗薬の帯状回内投与は McN-A-343 の抗アロディニア作用を抑制しました。以上の結果は、脳内前帯状回ムスカリン M<sub>1</sub> 受容体の興奮は GABA 作動性神経を介し疼痛伝達の抑制し、神経因性疼痛の緩和に深く関与していることを示唆しています（学会発表①, ⑬, ⑳；雑誌論文投稿中, 2010）。

痛みは、識別、情動、認知の側面があります。前帯状回は痛みの情動的側面に関与していると考えられています。よって、本研究結果から前帯状回は情動的側面だけでなく、疼痛閾値の調節にも関与することが新たに明らかになりました。従って、本研究結果は脳内ムスカリン受容体の新たな生理的役割を明らかにしただけでなく、疼痛伝達の仕組みに新たな情報を提供します。

## (3) 神経因性疼痛におけるサイトカイン・ケモカインの関与：

末梢神経障害の発症の仕組みを脊髄のグリア細胞に注目し、研究しました。坐骨神経部分結紮による神経因性疼痛は、ミノサイクリンで抑制されました。さらに、免疫組織学的に調べた結果、脊髄のミクログリアとアストロサイトは坐骨神経部分結紮マウスの結紮側で著しく増加していました。この増加はミクログリア活性抑制剤のミノサイクリンで有意に抑制されました。以上の結果は、末梢神経障害の神経因性疼痛発症に脊髄ミクログリアが深く関与していることを示唆しています。

また、次のような興味深い考察を発表することができました。神経損傷により、炎症性サイトカインが遊離され、ミクログリアを活性化します。その際に、Chemotactic Cytokine Ligand (CCL)-1 が産生され、CCL-1 はグルタミン酸を介して、痛覚路の2次ニューロンを刺激します。その過程で、ミノサイクリンは、CCL-1 の産生を抑制して、抗アロディニア効果を発現すると考えられ、ミノサイクリンの神経障害性疼痛における臨床応用の可能性が期待できます（学会発表③, ⑤, ⑧, ⑩, ⑭, ⑮, ⑰；一部の結果は雑誌論文①に印刷中, 他の結果は雑誌論文投稿中, 2010）。

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 9 件)

- ① 神経障害性疼痛におけるミノサイクリンの抗アロディニア作用 秋元 望, 本多健治, 松本恵理子, 川田哲史, 右田啓介, 牛島悠一, 高野行夫 日本ペインクリニック学会誌 査読有, 2010, 印刷中.
- ② Masuda T, Hirabara Y, Nakamura Y, Chishaki A, Tsuruhisa M, Miyakawa M, Honda K, Saito R, Sakamoto H, Kawata M, Takano Y, Aldosterone-sensitive NTS neurons regulate sensitivity of the baroreceptor reflex in high-sodium loaded rats, J. Pharmacol. Sci. 査読有, Vol. 112, 2010, pp. 482-486.
- ③ Migita K, Moriyama T, Koguchi M, Honda K, Katsuragi T, Takano Y, Ueno S, Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy. Neurosci. Letters, 査読有, Vol. 452, 2009, pp. 200-203.
- ④ Honda K, Takano Y. Involvement of vasopressin V1a and V1b receptors in nociceptive responses and morphine-induced effects. J. Pharmacol. Sci. 査読有, Vol. 109, 2009, pp. 38-43.
- ⑤ 本多健治, 高野行夫, 脊髄内痛覚伝達系のムスカリン受容体, 生体の科学, 査読無, Vol. 60, No. 5, 2009, pp. 404-405.
- ⑥ Honda K, Horikawa K., Ando S., Koga, Kawata S, Migita K, Takano Y, The Spinal muscarinic M1 receptors and GABAA receptors contribute to the McN-A-343-induced antinociceptive effects during thermal stimulation of mice, J. Pharmacol. Sci. 査読有, Vol. 108, 2008, pp. 472-478.
- ⑦ Honda K, Koguchi M, Koga K, Nakajima K, Kobayashi F, Migita K, Ogata S, Hirabara Y, Takano Y, Contribution of Ca<sup>2+</sup>-dependent protein kinase C in the spinal cord to the development of mechanical allodynia in diabetic mice, Biol. Pharm. Bull., 査読有, Vol. 301, 2007, pp. 990-993.
- ⑧ 本多健治, 高野行夫, 疼痛試験法の実際、日本薬理学雑誌, 査読無, 130 巻, 2007, pp. 39-44.
- ⑨ 神谷大雄, 本多健治, 脊髄痛覚伝達系へのムスカリン性受容体の関与, 国際医療福祉大学 福岡リハビリテーション学部 紀要, 査読無, Vol. 3, 2007, pp. 13-20.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 松崎 雄, 本多健治, 中島茂人, 秋元 望, 牛島悠一, 斎藤 亮, 高野 行夫, 带状回ムスカリン M1 受容体は神経因性疼痛による機械性アロディニアを抑制する, 第 83 回日本薬理学会, 2010 年 3 月 18 日, 国際会議場 (大阪)
- ② 宮川雅行, 増田大治, 樗木晃子, 鶴久麻衣, 平原康寿, 本多健治, 斎藤 亮, 高野行夫, 2 型糖尿病—高食塩負荷モデルラットにおいて内皮細胞由来の弛緩反応は減弱する, 第 83 回日本薬理学会, 2010 年 3 月 16 日, 国際会議場 (大阪)
- ③ 秋元 望, 本多健治, 牛島悠一, 松崎 雄, 中島茂人, 斎藤 亮, 高野 行夫, CCL1 の神経因性疼痛への関与, 2010 年 3 月 16 日, 第 83 回日本薬理学会, 国際会議場 (大阪)
- ④ 増田大治, 宮川雅行, 樗木晃子, 鶴久麻衣, 平原康寿, 本多健治, 斎藤 亮, 高野行夫, 食塩負荷は動脈圧受容器反射の感受性を減弱させる, 第 62 回日本薬理学西南部会, 2009 年 11 月 27 日 (松山)
- ⑤ Akimoto N., Honda K., Matsumoto E., Ushijima Y., Matsuzaki Y., Nakajima S., Saito R., Takano Y., The effect of minocycline on neuropathic pain model in mice, International Student Symposium, Kyusyu Brain Days, 2009 年 11 月 7 日, 九州大学 (福岡)
- ⑥ Migita K., Honda K., Yamada J., Takano Y., Ueno S., The association with P2X2 and P2X3 receptors in dorsal root ganglion on streptozotocin-induced diabetic neuropathy, Neuroscience 2009, 2009 年 10 月 18 日, Chicago, USA
- ⑦ Takano Y., Mechanism of neuropathic pain in the spinal cord, Invited Lecture in Medical School Pamukkale University, 2009 年 5 月 20 日, Denizil, Turkey
- ⑧ 本多健治, 秋元 望, 松本恵理子, 松崎雄, 斎藤 亮, 高野行夫, 神経因性疼痛モデルにおけるミノサイクリンの抗アロディニア作用, 日本ペインクリニック学会 43 回大会, 2009 年 7 月 17 日, 名古屋国際会議場 (名古屋)
- ⑨ 右田啓介, 本多健治, 高野行夫, 山田順子, 上野伸哉, 神経因性疼痛モデルマウスの大脳皮質 II/III 層錐体細胞におけるシナプス応答, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日 (横浜)
- ⑩ 松本恵理子, 秋元望, 松崎雄, 本多健治, 右田啓介, 斎藤亮, 上野伸哉, 高野行夫, ミノサイクリンによる神経因性疼痛抑制効果, 第 82 回日本薬理学会年会, 2009 年 3 月 17 日 (横浜)
- ⑪ 増田大治, 中村祐介, 宮川雅行, 平原康寿, 本多健治, 斎藤亮, 有森和彦, 中川裕

之, 坂本浩隆, 河田光博, 高野行夫, 糖尿病・食塩負荷モデルラットにおいて動脈圧受容器反射は減弱する; 弧束核におけるアルドステロン感受性神経, 第82回日本薬理学会年会, 2009年3月16日(横浜)

- ⑫ 平原康寿, 中村祐介, 増田大治, 宮川雅行, 岩切智美, 奥村学, 本多健治, 斎藤亮, 有森和彦, 高野行夫, 糖尿病・食塩負荷高血圧ラットにおいて動脈圧受容器反射は減弱する, 薬学会九州支部大会, 2008年12月6日(宮崎)
- ⑬ 中村祐介, 平原康寿, 増田大治, 宮川雅行, 本多健治, 斎藤亮, 有森和彦, 高野行夫, 食塩負荷糖尿病モデルラットにおける動脈圧受容器反射の減弱に対するレニン-アンジオテンシン系の関与, 第61回日本薬理学会西南部会, 2008年11月28日(米子)
- ⑭ MATSUMOT E, HONDA K., AKIMOTO N., MATSUZAKI Y., KAWATA S., MIGITA K., UENO S., SAITO R., TAKANO Y., The spinal microglia contributes to the development of neuropathic pain in mice, Neuroscience 2008, 2008年11月18日, Washington D. C., USA
- ⑮ Matsumoto E., Kawata S., Akimoto N., Honda K., Migita K., Y. Matsuzaki, S. Ueno, Saito R., Takano Y., Involvement of spinal glial cells in neuropathic pain, 3rd Asian Pain Symposium, 2008年7月19日(Fukuoka)
- ⑯ 本多健治, 西村亜紀子, 松本 恵理子, 松崎 雄, 秋本 望, 斎藤 亮, 高野行夫, 神経因性疼痛における脳内ムスカリン受容体とGABA作動性神経の役割, 第30回日本疼痛学会, 2008年7月20日(福岡)
- ⑰ 川田哲史, 松本恵理子, 本多健治, 右田啓介, 斎藤亮, 上野伸哉, 高野行夫, 神経因性疼痛に対する脊髄グリア細胞の関与, 日本薬学会第128年会, 2008年3月27日(横浜)
- ⑱ 本多健治, 高野行夫, モルヒネ鎮痛、耐性、依存におけるバツプレシン受容体の関与, 第81回日本薬理学会年会シンポジウム, 2008年3月18日(横浜)
- ⑲ 片渕史織, 平原康寿, 福田未音, 中村祐介, 本多健治, 斎藤亮, 高野行夫, 高食塩負荷糖尿病モデルラットにおいて動脈圧受容器反射機能は減弱する, 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月16日(横浜)
- ⑳ 本多健治, 西村亜紀子, 松本恵理子, 川田哲史, 斎藤亮, 高野行夫, 神経因性疼痛に対するMcN-A-343の鎮痛効果における脊髄上位GABAA受容体の関与, 第81回日本薬理学会年会, 2008年3月17日(横浜)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

本多 健治 (HONDA KENJI)  
福岡大学・薬学部・助教  
研究者番号: 60140761

### (2) 研究分担者

斎藤 亮 (SAITO RYO)  
福岡大学・薬学部・講師  
研究者番号: 80122696  
高野 行夫 (TAKANO YUKIO)  
福岡大学・薬学部・教授  
研究者番号: 50113246  
右田 啓介 (MIGITA KEISUKE)  
弘前大学・大学院医学研究科・助教  
研究者番号: 10352262  
(H20→H21: 連携研究者)

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: