

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19790869
 研究課題名（和文） 神経因性疼痛下のアセチルコリン神経機能の画像解析とそれに基づく鎮痛作用部位の解明
 研究課題名（英文） Elucidation of brain regions related to antiallodynic effects based on the molecular imaging of cholinergic nerve function under neuropathic pain conditions
 研究代表者
 上田 真史（Ueda Masashi）
 京都大学・医学研究科・助教
 研究者番号：40381967

研究成果の概要：

脳内に存在するニコチン性アセチルコリン受容体に結合する放射性プローブを用いて、慢性的な痛覚過敏状態（神経因性疼痛）でのニコチン受容体およびその神経系の機能変化を調べ、鎮痛作用に関与する部位を明らかにすることを計画した。その結果、神経因性疼痛状態で視床に存在するニコチン受容体が増加していることを見出した。実際に視床に薬物を投与したところ、鎮痛作用が認められたことから、視床に存在するニコチン受容体が神経因性疼痛抑制に関与する可能性が明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000	0	2,100,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	330,000	3,530,000

研究分野：放射性医薬品学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：分子イメージング・神経因性疼痛・アセチルコリン神経系・ニコチン性アセチルコリン受容体

1. 研究開始当初の背景

脳内に存在するニコチン受容体は、モルヒネなどの麻薬性鎮痛薬が効果を示しにくい神経因性疼痛に対しても鎮痛作用を発揮することから、その作用機序・作用部位の解明、さらにはニコチン性アセチルコリン神経系と神経因性疼痛の病態との関連に強い興味を持たれている。鎮痛作用に関与するニコチン

ン受容体の発現部位やその作用機序解明に関するこれまでの検討では、ニコチン受容体アゴニストを標的部位に投与したときの薬理作用の評価に終始しており、その部位における受容体およびアセチルコリン合成／分解酵素の発現あるいは内因性アゴニストであるアセチルコリンの放出量など、神経伝達機能に関する検討は全く行われていない。そこで研究代表者は、生体内での遺伝子発現・

タンパク質発現の変化を生きた状態で体外から非侵襲的に検出する分子イメージング技術を病態モデルへと応用し、神経因性疼痛とアセチルコリン神経機能との関連について検討を行うことで、作用部位や機序の解明に対して、これまでとは観点の異なる新たな知見が得られるのではないかと考えた。また、アセチルコリン神経系は鎮痛作用に関与するので、その機能が低下することが神経因性疼痛に繋がる可能性も考えられ、神経因性疼痛条件下におけるアセチルコリン神経機能を測定することは、鎮痛作用発現部位の同定のみならず病態を明らかにする上でも非常に意義深いと考え、本研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、放射性プローブを用いる分子イメージング手法により、神経因性疼痛状態での脳内ニコチン性アセチルコリン神経系の機能変化を捉え、神経因性疼痛に対するアセチルコリン神経系の関与を調査するとともに、鎮痛作用発現部位（治療標的部位）の解明を行うことを目的とした。

研究代表者はこれまでに脳内ニコチン受容体に結合する放射性プローブとして 5-^[11C]methyl-A-85380 (^[11C]5MA) や 5-^[123/125I]iodo-A-85380 (^[123/125I]5IA) を開発している。特に後者のプローブに関しては、安全性評価を行った上で臨床研究へと展開し、ヒト脳内ニコチン受容体密度の定量解析法も開発した。そこで、これらの技術を基盤とし、これまで全く検討が行われてこなかった神経因性疼痛とアセチルコリン神経機能との関連を放射性プローブを用いて明らかにする研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 外科的手術

① 神経因性疼痛モデルラットの作製

すべての動物実験は事前に京都大学の動物実験委員会の承認を受けた上で、京都大学の動物実験指針を遵守して行った。動物はSD系雄性ラット(体重200-250g)を用い、12時間の明暗サイクルで飼育し、エサ・水は自由摂取させた。

ペントバルビタール麻酔下、ラットの右後肢坐骨神経を部分的に結紮し、2週間あるいは1ヶ月飼育することにより、神経因性疼痛モデルラットを作製した(2週間群および1ヶ月群とする)。対照として、坐骨神経を結紮する直前までの手術を施した Sham 群を作製した。

② ガイドカニューレの埋め込み

坐骨神経結紮から1週間後、ペントバルビタール麻酔下、ラットを脳固定装置に固定し、頭蓋骨を暴露した後、ブレグマの位置に座標軸を設定した。脳室内投与を行う群には、ブレグマから右側に1.5 mm、尾側に0.8 mmの位置に、視床後外側腹側核(VPL)内投与を行う群にはブレグマから左側に3.3 mm、尾側に2.4 mmの位置に、ガイドカニューレを深さ2 mmまで埋め込んだ。周囲を歯科用セメントで固定、頭皮を縫合し、5日間以上の回復期間の後に実験に使用した。

(2) 行動薬理的評価

① フォンフレイ・フィラメントテスト

坐骨神経結紮直前および結紮2週間後に0.07-26 gの刺激を与えるフィラメントを用いてフォンフレイ・フィラメントテストを行った。すなわち、ラットを1匹ずつメッシュケージに置き、15~30分程度の馴化後、細いフィラメントから順に10回ずつ足底を刺激し、ラットが反応を示したフィラメントを閾値とした。坐骨神経結紮前後での閾値を比較し、両肢の閾値とも低下したラットを以下の検討に使用した。

② 薬物投与

側脳室内投与に際しては、ガイドカニューレに沿ってインジェクションカニューレを頭蓋骨下5 mmに挿入し、vehicle(生理食塩水)、種々の濃度の5IA(1-10 nmol)を30秒間かけて5 μL投与した。また、ニコチン受容体アンタゴニストであるメカミラミンを皮下投与し、30分後に5IAを側脳室内投与した場合の影響についても検討を行った。

VPL投与に際しては、ガイドカニューレに沿ってインジェクションカニューレを頭蓋骨下6.2 mmに挿入し、vehicle(生理食塩水)、種々の濃度の5IA(1-50 nmol)、メカミラミン(1-10 nmol)、5IAとメカミラミンの混合液(両者とも10 nmol)を1分15秒間かけて0.5 μL投与した。

側脳室・VPL投与に際しては、メカミラミン10 nmolをVPL投与し、その5分後に5IA 10 nmolを側脳室内投与した。

薬物投与前、投与15、30、60、90、120分後に閾値を測定し、その結果から以下の式に基づいてアロディニア抑制作用の指標である%maximal possible effect (%MPE)を算出した。

$$\%MPE = \frac{\text{薬物投与後の閾値} - \text{薬物投与前の閾値}}{\text{カットオフ値(26 g)} - \text{薬物投与前の閾値}} \times 100$$

③ 傾斜板テスト

フォンフレイ・フィラメントテストを行ったすべての投与経路で用いた最高濃度の薬

物を投与後、ラットを 30 度に傾斜したステンレス板上におき、ただちに毎秒 2 度の速度で板を傾斜させ、ラットが滑落したときの角度を測定した。薬物投与前の滑落角をコントロールとし、薬物投与 15、30、60、90、120 分後に測定を行い、コントロールの値と比較した。

(3) オートラジオグラフィ

① Ex vivo autoradiography

Sham 群、2 週間群、1 ヶ月群の各ラットの尾静脈より、 $[^{125}\text{I}]5\text{IA}$ を 2 MBq 投与し、60 分後に屠殺、全脳を摘出した。摘出した脳を凍結してマイクロトームにより厚さ $20\ \mu\text{m}$ の切片を作成し、イメージングプレートに暴露してオートラジオグラムを得た。皮質、線条体、海馬、視床、大縫線核、青斑核、小脳の画像上に関心領域を設定し、そこへ集積した放射能を定量した。

② In vitro autoradiography

Sham 群、2 週間群、1 ヶ月群の各ラットを屠殺後、マイクロトームにより厚さ $20\ \mu\text{m}$ の切片を作成した。ラット脳切片をトリスー塩酸緩衝液中 (pH 7.4)、種々の濃度の $[^{125}\text{I}]5\text{IA}$ と 25°C 、60 分間インキュベートし、その後氷冷した緩衝液および蒸留水で洗浄した。非特異的結合は、 $300\ \mu\text{M}$ の (-)ニコチン存在下でインキュベートすることにより求めた。乾燥させた切片をイメージングプレートに曝露後、得られた画像に①と同じ関心領域を設定し、Scatchard 解析を行って受容体最大結合能 (Bmax 値) を算出した。

4. 研究成果

(1) 5IA の鎮痛作用の基礎検討

初めに 5IA の鎮痛作用について基礎的に検討するため、1-10 nmol を側脳室内投与したところ、投与 15 分後をピークとする用量依存的な鎮痛作用が認められた (図 1)。

またデータには示さないものの、この作用はメカミラミンの前投与により完全に拮抗されたことから、所期の通りニコチン受容体を介して発現していることが明らかとなった。

(2) 神経因性疼痛時の受容体変化

$[^{125}\text{I}]5\text{IA}$ を尾静脈より投与したところ、神経因性疼痛モデルラットの視床において、Sham 群よりも高集積が認められた (図 2)。定量解析を行ったところ、2 週間群、1 ヶ月群のどちらも Sham 群の 1.7 倍に集積が増加していた。一方、皮質や海馬など検討したその他の領域では集積に差は認められなかった。

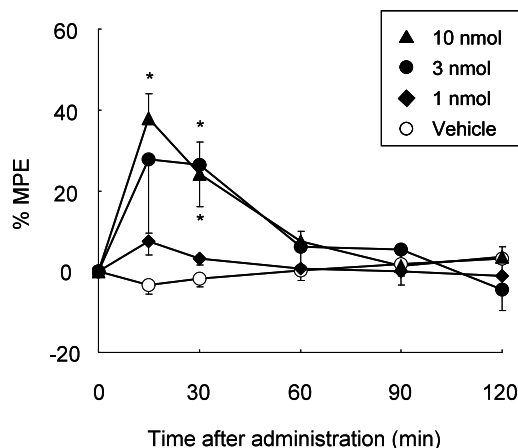


図 1 側脳室内投与における 5IA の鎮痛作用 (* $P < 0.05$ vs. Vehicle)

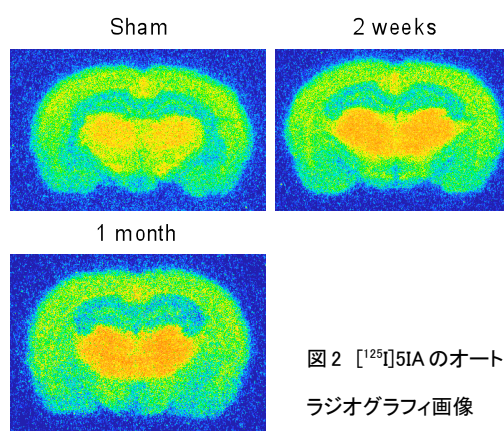


図 2 $[^{125}\text{I}]5\text{IA}$ のオートラジオグラフィ画像

さらに、ここで認められた集積の差の原因を検討するため、インビトロオートラジオグラフィで飽和結合実験を行ったところ、2 週間群、1 ヶ月群の視床の Bmax 値はそれぞれ 21, 20 fmol/mg tissue であり、Sham 群 13 fmol/mg tissue に比べて 1.5 倍大きかった。エキスピゴオートラジオグラフィの結果と同様、皮質や海馬など検討したその他の領域では Bmax 値に差は認められなかった。この結果から、神経因性疼痛モデルラットの視床ではニコチン受容体密度が増加しており、それにより $[^{125}\text{I}]5\text{IA}$ の集積が増加したことが明らかとなった。

(3) 視床 VPL 核における検討

① 外因性アゴニストの鎮痛作用

視床においてのみニコチン受容体密度の増加が認められたことから、視床に存在するニコチン受容体が増加することで慢性疼痛状態を緩和しようとしているのではないかと考えた。中でも視床 VPL 核は痛覚伝達に関与することが報告されていることから、VPL 核に発現するニコチン受容体が刺激されることで痛覚伝達が遮断され、鎮痛作用が発現する可能性を考え、それについて検討を行っ

た。

5IA (1-50 nmol) を VPL 核へ投与し、鎮痛作用を評価したところ、投与 15 分後をピークとする用量依存的な鎮痛作用が認められた (図 3)。データには示さないものの、同濃度の 5IA とメカミラミンの混合溶液を VPL 核に同時投与したところ、鎮痛作用は完全に抑制されたことから、この作用は VPL 核に存在するニコチン受容体を介して発現していることが明らかとなった。

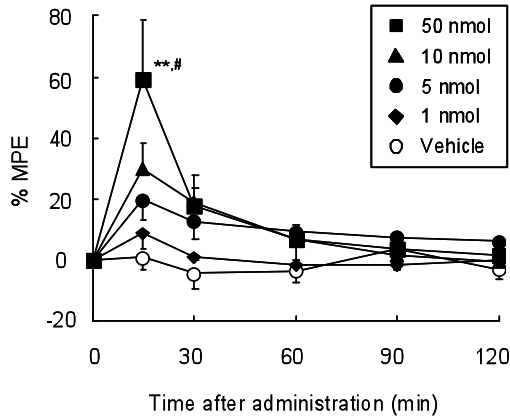


図 3 VPL 核内投与における 5IA の鎮痛作用
(** $P < 0.01$ vs. Vehicle, # $P < 0.05$ vs. 1 nmol)

さらに、5IA 側脳室内投与時に発現する鎮痛作用に VPL 核がどの程度関与するのかを明らかにする目的で、VPL 核にメカミラミンを投与したあとに 5IA を側脳室内投与して鎮痛作用を評価した。その結果、メカミラミン処置によって 5IA の鎮痛作用は 70%抑制されたことから、側脳室内投与された 5IA のある程度の部分は VPL 核に作用して鎮痛作用を発現している可能性が示された (図 4)。さらに有意差は認められなかったものの、興味深いことにメカミラミン投与で痛覚閾値が減少する傾向が認められた。

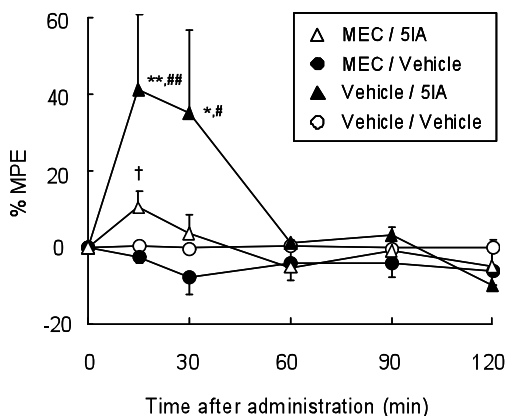


図 4 VPL 核遮断後の 5IA の鎮痛作用

(** $P < 0.01$, * $P < 0.05$ vs. Vehicle/Vehicle, ## $P < 0.01$, # $P < 0.05$ vs. MEC/Vehicle, † $P < 0.05$ vs. Vehicle/5IA)

②内因性アゴニストの鎮痛作用

メカミラミンの VPL 核投与により痛覚閾値の低下が認められたことから、用量をふって濃度依存性を検討した。その結果、5 および 10 nmol 投与群で鎮痛閾値の有意な低下が認められた (図 5)。メカミラミンはアンタゴニストであり、それ自体では発痛作用は有さないことから、今回認められた痛覚閾値の低下は、内因性アゴニストであるアセチルコリンに由来する鎮痛作用を抑制した可能性が考えられた。すなわち、神経因性疼痛状態では内因性アゴニストによる疼痛抑制機構が働いている可能性が考えられ、その機構に VPL 核のニコチン受容体が関与することが示唆された。

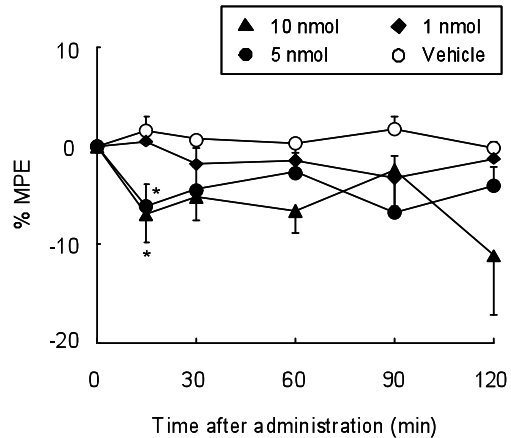


図 5 VPL 投与におけるメカミラミンの痛覚過敏作用
(* $P < 0.05$ vs. Vehicle)

(5) 結論

視床 VPL 核に存在するニコチン受容体が外因性アゴニストと内因性アゴニストの両方の鎮痛作用に関与する可能性が示され、神経因性疼痛の抑制に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計2件)

- ① 上田真史、佐治英郎.
脳神経伝達機構はどこまで解明されたか? -脳神経伝達機構の分子イメージング 3) アセチルコリン神経伝達機能.
PET Journal. 2008;2:24-26. (査読なし)
- ② Ueda M, Iida Y, Kitamura Y, Kawashima H, Ogawa M, Magata Y, Saji H.
5-Iodo-A-85380, a specific ligand for alpha 4 beta 2 nicotinic acetylcholine receptors, prevents glutamate neurotoxicity in rat cortical cultured neurons.
Brain Res. 2008;1199:46-52. (査読あり)

[学会発表] (計1件)

- ① 上田真史、飯田靖彦、富永亜希子、久下裕司、佐治英郎.
視床 VPL 核に存在するニコチン受容体を介する神経因性疼痛抑制作用の検討.
第 81 回日本薬理学会年会、2008 年 3 月 18 日、横浜.

[図書] (計0件)

[産業財産権]

- 出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 真史 (Ueda Masashi)
京都大学・医学研究科・助教
研究者番号：40381967

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし