

令和 6 年 4 月 12 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17815

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛が慢性化すると脊髄後角における疼痛メカニズムは変化するのか？

研究課題名(英文) Do the mechanisms of pain change in the spinal dorsal horn during chronic phase of neuropathic pain?

研究代表者

五代 幸平 (Godai, Kohei)

鹿児島大学・医歯学域鹿児島大学病院・講師

研究者番号：20767488

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヘム分解酵素ヘム・オキシゲナーゼ-1(HO-1)を中枢神経で阻害することで、神経障害性疼痛における α_2 リガンドの鎮痛効果が減弱すること。また α_2 リガンドが脊髄後角でHO-1を介してミクログリアやアストロサイトといったグリア細胞の活性化を抑制していることが判明した。 α_2 リガンドは脊髄後角において内因性オピオイドであるエンケファリンを増加させた。以上、神経障害性疼痛治療薬 α_2 リガンドの鎮痛効果に脊髄のHO-1が重要であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は難治性であり、しばしば慢性化する。神経障害性疼痛治療薬 α_2 リガンドは神経障害性疼痛の第一選択薬であるが、その鎮痛機序は十分に解明されていない。本研究により、 α_2 リガンドの鎮痛効果に脊髄のHO-1が重要であることが判明した。 α_2 リガンドをより効果的に使用できれば、慢性神経障害性疼痛患者の治療効果改善に貢献することが期待できると考える。

研究成果の概要(英文)：Intrathecal injection of Heme-Oxygenase-1 (HO-1) inhibitors abolished the mechanical antiallodynic effects of calcium channel α_2 ligands. Calcium channel α_2 ligands increased HO-1 and endogenous opioid precursor preproenkephalin gene expression and decreased the expression of glial markers, interleukin-1, and inducible nitric oxide synthase. As conclusions, this study suggests that spinal HO-1 plays a crucial role in the analgesic effects of calcium channel α_2 ligands through the attenuation of glial activation and endogenous opioid release.

研究分野：麻酔科学

キーワード：ヘム・オキシゲナーゼ-1 神経障害性疼痛 α_2 リガンド グリア

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は末梢・中枢神経損傷や機能異常による難治性・慢性の疼痛であり、先進国での有病率は1-7%程度である。神経障害性疼痛の第一選択薬は、カルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ リガンドや三環系抗うつ薬、セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬 (SNRI) であるが、望ましい治療効果を得られる患者は1/3以下と有効性は高くない。神経障害性疼痛のメカニズムは以下のものが知られている。末梢痛覚神経興奮性の亢進 (末梢性感作)、後根神経節や脊髄後角におけるカルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ サブユニットの発現増加とミクログリアの集積による、興奮性神経伝達物質放出の促進 (中枢性感作)、脳幹から脊髄後角へ投射する内因性鎮痛機構 (下行性疼痛抑制系) の機能不全。

$\alpha 2\delta$ リガンドや三環系抗うつ薬、SNRI はラット・マウスを用いた神経障害性疼痛モデルでは投与後1時間で鎮痛効果を認める。一方で、実際の患者では、これらの薬剤の鎮痛効果が現れるのに数日から数週間を要する。神経障害性疼痛モデルでは神経損傷後1-2週間の急性期に実験を行うため、神経損傷の急性期と慢性期の違いにより疼痛メカニズムが異なっている可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経障害性疼痛の慢性期において急性期に認められる脊髄後角のミクログリア集積とカルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ サブユニットの発現増加がどのように変化し、その変化が神経障害性疼痛治療薬の鎮痛効果にもたらす影響を解明することである。

神経障害性疼痛の急性期と慢性期で、脊髄後角におけるミクログリア集積とその極性、 $\alpha 2\delta$ サブユニットの発現はどのように変化するのか。

神経障害性疼痛の急性期と慢性期での脊髄後角におけるミクログリア極性や $\alpha 2\delta$ サブユニット発現変化が、神経障害性疼痛治療薬の鎮痛効果にもたらす影響はなにか。

神経障害性疼痛慢性期において、脊髄後角におけるミクログリア極性や $\alpha 2\delta$ サブユニット発現変化を制御することで、神経障害性疼痛治療薬の鎮痛効果を改善することができるのか。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルの作成

8-10週齢の雄性 C57BL6 マウスを使用した。坐骨神経の Spared Nerve Injury (SNI) により神経障害性疼痛を発生させた。これは坐骨神経3分枝のうち、総腓骨神経・脛骨神経を結紮切離し腓腹神経のみ温存することで腓腹神経領域に神経障害性疼痛を生じさせるモデルである。イソフルラン麻酔下に、大腿部を切開し総腓骨神経・脛骨神経を結紮切離し腓腹神経のみ温存。筋膜と皮膚を6-0絹糸で縫合した。

(2) 疼痛反応の評価

疼痛反応は、von Frey filament (0.008-2.0 g) による機械式刺激に対する逃避行動 (後肢を挙げる) により評価した。足底の損傷を防ぐために、2.0g をカットオフ値とした。マウスの後肢足底に filament を少し曲がるまで押し付け逃避行動を観察した。この操作を5回繰り返し3回以上逃避反応がある最も小さい値を機械的閾値とした。薬剤の効果は Maximum Possible Effect (MPE, %) で判定した。MPE = (薬剤投与後機械的閾値 - ベースライン機械的閾値) ÷ (カットオフ値 - ベースライン機械的閾値) × 100 として計算を行った。

(3) Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

深麻酔下に心臓切開を行い、マウスを安楽死させた。L3-4 の脊髄後角を採取した。Sepasol reagent を用いて RNA を抽出し、High-Capacity RNA-to-cDNA Kit を用いて cDNA を合成した。TaqMan Fast Advanced Master Mix と ABI Prism StepOnePlus Real-Time PCR System を用いて mRNA の測定を行った。

(4) 試薬および投与方法

SNI から7日後に血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP (10 mg/kg) とともにプレガバリン (30 mg/kg)、ガバペンチン (30 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与した。また、SNI から7日後にプレガバリン (30 mg/kg)、ガバペンチン (30 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与、その後血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP (400 nmol) を足底投与した。さらに、SNI から7日後にプレガバリン (30 mg/kg)、ガバペンチン (30 mg/kg) をそれぞれ腹腔内投与、その後血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP (100 nmol/kg) もしくは血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP (100 nmol/kg) を髄腔内投与した。

(5) 統計分析

結果は Mean ± SEM で表示した。群間比較は ANOVA で行い、Tukey 法で各群の差を検討した (Graphpad Prism 7.0)。P 値 0.05 未満を有意とした。

4. 研究成果

神経障害性疼痛において、H0-1 は $\alpha 2\delta$ リガンドの鎮痛効果に関与している (Godai et al. Pain Rep 2018)。しかし、H0-1 は全身に発現しており、中枢神経と末梢神経のいずれの部位で H0-1 が

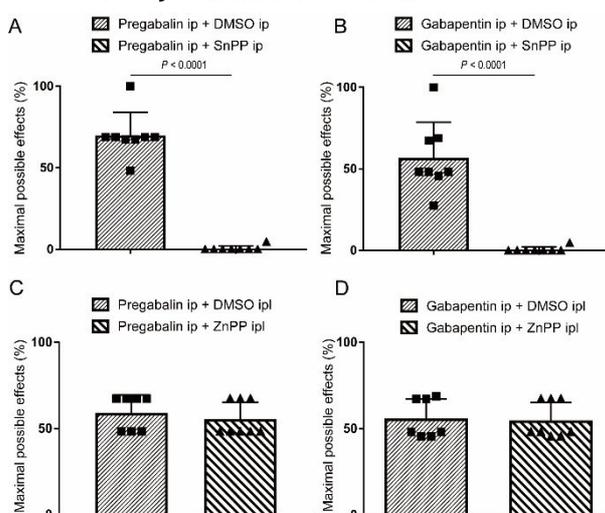
$\alpha 2\delta$ リガンドの鎮痛効果に関与しているかは不明であった。そのため、以下の検討を行った。
 (1) 血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP の腹腔内投与および血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP 足底投与の $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果への影響

血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP の腹腔内投与によって、 $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果は消失した。

一方で、血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP の足底投与では、 $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果に変化はなかった。

以上のことから、末梢組織での H0-1 は $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果に関与していないことが判明した。

図 1. SnPP (腹腔内) および ZnPP (足底) の $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果への影響



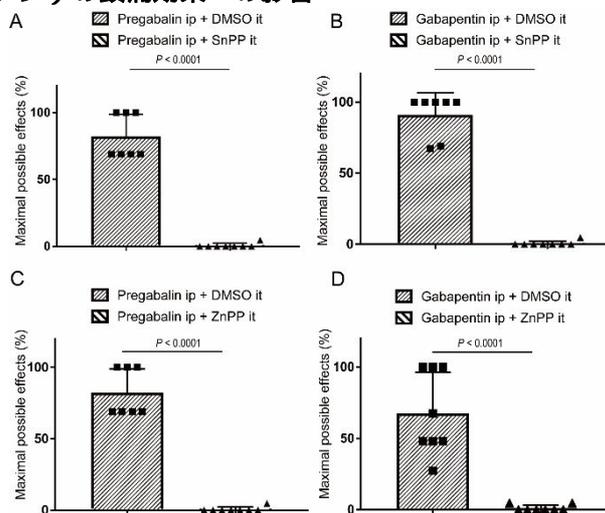
(2) 血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP および血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP 髄腔内投与の $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果への影響

血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP の髄腔内投与によって、 $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果は消失した。

また、血液脳関門非透過性 H0 阻害薬 ZnPP の髄腔内投与によっても、 $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果は消失した。

以上のことから、中枢神経での H0-1 が $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果に重要であることが判明した。

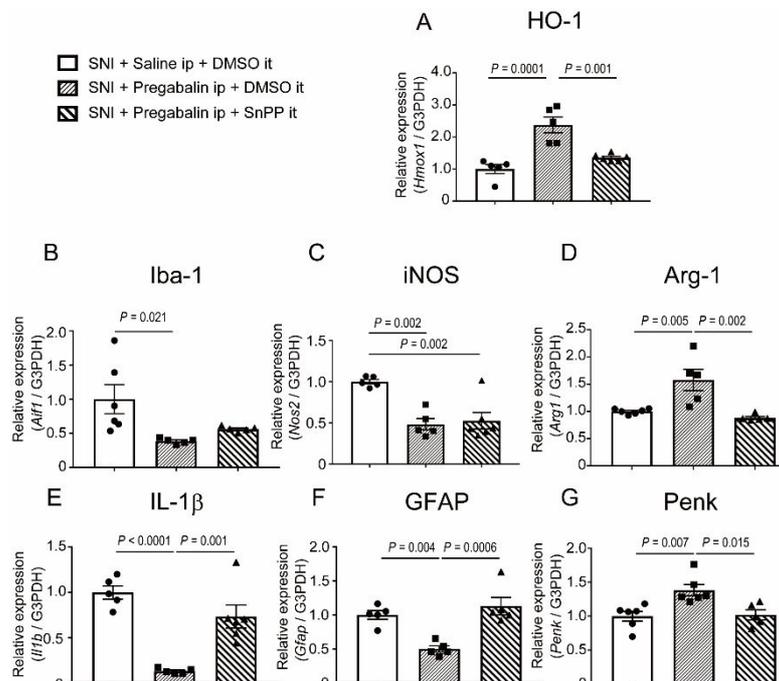
図 2. SnPP および ZnPP (髄腔内投与) の $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン・ガバペンチン) の鎮痛効果への影響



(3) $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン) への血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP 髄腔内投与における脊髄後角に対する効果

プレガバリンは脊髄後角で H0-1・M2 ミクログリアマーカー (Arg-1)・内因性オピオイド (Penk) の mRNA 発現を増加させ、ミクログリアマーカー (Iba-1)・アストロサイトマーカー (GFAP)・炎症性サイトカイン IL-1 の mRNA 発現を減少させた。その変化は血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP (100 nmol/kg) の髄腔内投与で消失した。

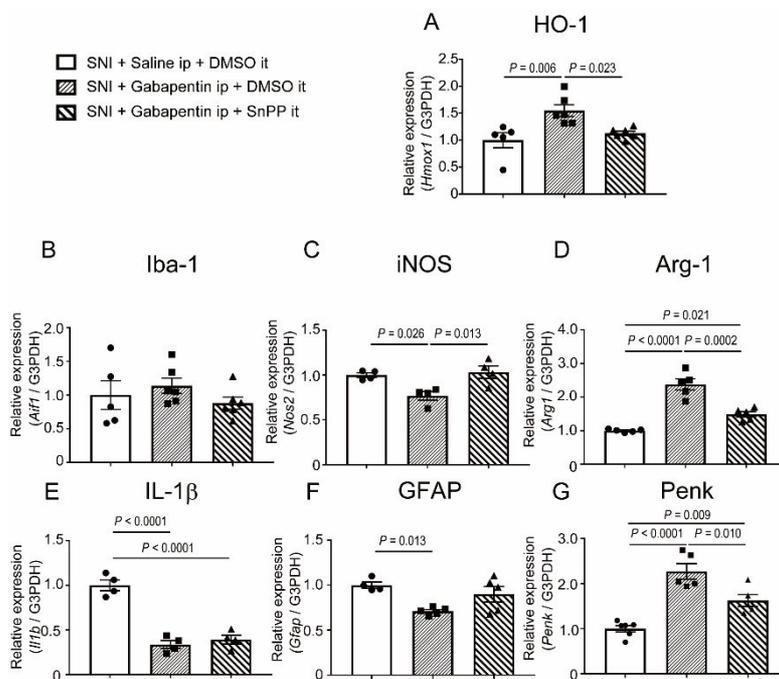
図 3. $\alpha 2\delta$ リガンド (プレガバリン) への血液脳関門透過性 H0 阻害薬 SnPP 髄腔内投与における脊髄後角に対する効果



(4) $\alpha 2\delta$ リガンド (ガバペンチン) への血液脳関門透過性 HO 阻害薬 SnPP 髄腔内投与における脊髄後角に対する効果

ガバペンチンは脊髄後角で HO-1・M2 ミクログリアマーカー (Arg-1)・内因性オピオイド (Penk) の mRNA 発現を増加させ、M1 ミクログリアマーカー (iNOS)・アストロサイトマーカー (GFAP) の mRNA 発現を減少させた。その変化は血液脳関門透過性 HO 阻害薬 SnPP (100 nmol/kg) の髄腔内投与で消失した。

図 4. $\alpha 2\delta$ リガンド (ガバペンチン) への血液脳関門透過性 HO 阻害薬 SnPP 髄腔内投与における脊髄後角に対する効果



以上、神経障害性疼痛治療薬 $\alpha 2\delta$ リガンドの鎮痛効果に脊髄の HO-1 が重要であることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Godai Kohei, Moriyama Takahiro	4. 巻 767
2. 論文標題 Heme oxygenase-1 in the spinal cord plays crucial roles in the analgesic effects of pregabalin and gabapentin in a spared nerve-injury mouse model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 136310 ~ 136310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2021.136310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 五代幸平
2. 発表標題 末梢性神経障害性疼痛のメカニズム—ミクログリアに着目して—
3. 学会等名 日本麻酔科学会 第69回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------