

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21654

研究課題名（和文）大脳辺縁系に発症の原因が存在する慢性疼痛の分子メカニズムの解明と新規治療薬の開発

研究課題名（英文）Molecular mechanism of chronic pain with its onset in the limbic system and development of new therapeutic agents

研究代表者

島田 昌一（Shimada, Shoichi）

大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20216063

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：組織の損傷が治った後も継続する慢性疼痛のメカニズムを解析するために、条件付けによる疼痛誘発のマウスモデルを確立した。この条件付けにより誘発する痛み反応はフェンタニルによって減少したが、イブプロフェン、プレガバリン、フルボキサミンによっては減少しなかったことから、慢性疼痛に効果のある鎮痛薬の薬理学的特徴に類似していた。この条件付け疼痛に関与する神経をc-fos発現を指標に検討し、末梢神経や脊髄後角は関与せず、むしろ大脳辺縁系と繋がり深い脳内の数箇所の領域が関与していることを見出した。また、各種化合物を検討し、この条件付けによる疼痛に対してオピオイドと同等の鎮痛効果を示す化合物を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛は難治性の疾患で、唯一オピオイドのフェンタニルが高い治療効果を示す。特に米国では慢性疼痛の治療目的で、鎮痛薬として処方されたオピオイドがきっかけとなり薬物依存者が急増し、乱用による過剰摂取が原因となる死亡者数が年間の交通事故死亡者数5万人を大幅に超え、大きな社会的問題となっている。本研究では、オピオイドに替わる依存性のない慢性疼痛治療薬の開発を目指す。

研究成果の概要（英文）：To analyze the mechanism of chronic pain that persists after tissue damage has healed, we have developed a mouse model of conditioning-induced pain. The pain response elicited by this conditioning was reduced by fentanyl but not by ibuprofen, pregabalin, or fluvoxamine, which resembles the pharmacological characteristics of analgesics effective for chronic pain. We have observed c-fos expression and found that neither peripheral nervous system nor the dorsal horn of the spinal cord was involved, but rather several limbic areas in the brain are associated with this conditioning-induced pain. We have also examined various compounds and have found a compound that exhibited analgesic effects equivalent to opioids for pain caused by this conditioning.

研究分野：神経化学

キーワード：慢性疼痛 条件付け 大脳辺縁系 オピオイド 情動

1. 研究開始当初の背景

原因不明の慢性疼痛患者に対し、急性痛と同様の治療薬である NSAIDs やプレガバリン、さらに抗うつ薬等が使用されている。しかし、いずれを用いても効果は乏しく、唯一オピオイドがある程度の効果を示す。米国では慢性疼痛患者へのオピオイド処方がかっかけとなる依存症が増加し、その結果、乱用による過剰摂取が原因で死亡者数が年間7万人を超え、交通事故死亡者数を上回り大きな社会問題となっている。さらにオピオイドを生産販売してきたアメリカやイスラエルの大手製薬企業が、この問題で多額の訴訟を抱え、経営破綻に陥る会社も現れた。そのため米国では今後、慢性疼痛の患者に対するオピオイドの治療が困難となることは間違いなく、依存性のない新しい慢性疼痛治療薬の開発が急務となっている。

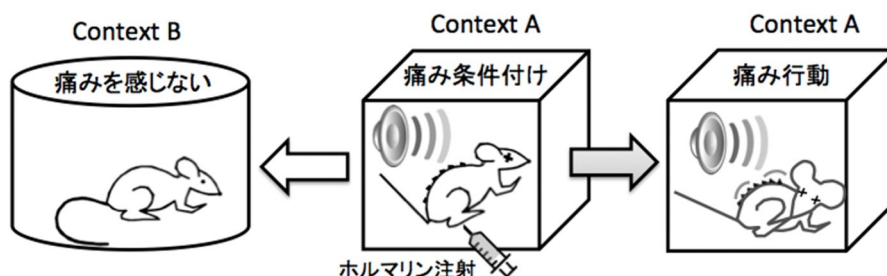
我々は以前より、心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の発症メカニズムの研究を行い、とくに恐怖記憶の消去について研究を進めてきた。一方、慢性疼痛の中には繰り返す痛みの経験から生じる痛みの記憶が条件づけとなり悪化するものがある。このような慢性疼痛の発症メカニズムは心的外傷後ストレス障害 (PTSD) の発症メカニズムに類似している可能性に注目し、条件づけによる疼痛誘発マウスを作製することで、慢性疼痛の病態の1つのモデルを作れるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

慢性疼痛の中には繰り返す痛みの経験から生じる痛みの記憶が条件づけとなり悪化するものがある。パブロフの条件反射と同様の条件づけは無自覚の間に形成される。このようなケースでは、元々の疼痛の原因となる組織の損傷が完治した後でも、痛みのみが残存し改善しない場合がある。痛みに関してこのような条件づけが脳内で形成されると、それが慢性疼痛などの長期にわたる難治性疼痛の原因の1つになると考えられ、その適切な治療法も見つかっていない。本研究の目的は、痛みの原因が除去された後でも条件づけによって痛みが続く実験モデルの開発を進めると共に、このような条件づけによって増強する疼痛に関わる神経回路とそのメカニズムを解析すること、さらに条件づけによって生じる難治性の疼痛の治療薬を新しく開発することにある。

3. 研究の方法

条件づけによって生じる情動に由来する痛みのメカニズムを検討するには、痛みの原因となる組織の損傷が無い場合でも、「痛み」としての感覚を再現できるような新規行動試験系の構築が必須である。そこで我々は、パブロフ型条件づけを用いた情動に由来する痛みの特化した行動試験系を構築した(図1)。



【図1】条件づけにより誘発される疼痛モデル

(1) Context A (図1、中央)において、DAY1, DAY2の2日間ホルマリンを足底に投与し、同時に音を鳴らし、痛みが与えられる環境(痛み環境)をマウスに記憶させ、条件づけをする。DAY4で、context Aで痛み条件づけをしたマウスをcontext Aと同様の環境(図1、右側)に入れ、同じ音を鳴らし、マウスの痛み様行動である足舐め行動を計測する(図、右側)。context Aで痛み条件づけをした違うグループのマウスを、痛み環境とは異なるcontext Bに入れてマウスの足舐め行動を計測する(図1、左側)。これらの2つのグループのマウスの行動を解析することにより、条件づけ刺激によって生じる痛み様行動を比較することができる。

(2) 次に既存薬がこの情動条件づけに由来する痛みにも効果があるかを検討する。

この条件づけで誘発される痛みに対して、疼痛治療薬として使われているプレガバリン、イブプロフェン、フルボキサミン、フェンタニルの効果を見る。

(3) 条件づけによる疼痛形成に關与する脳部位を明らかにする。

条件づけによる疼痛モデルを用いて、マウスに痛みを惹起した際に神経系のどの部位が活性化しているかを神経活動マーカーの c-fos を用いて、免疫組織化学により解析する。またホルマリンで痛み刺激をしたマウスと、痛み条件付したマウスに条件刺激の c-fos の発現パターンの比較を行い、条件付けの疼痛に關与する脳領域の特定を行う。

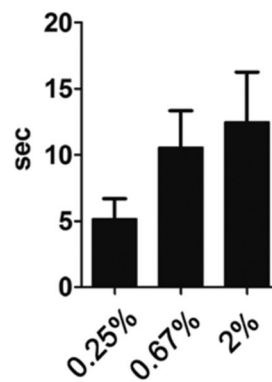
(4) 条件づけによる疼痛に対する新しい治療薬の検索
条件づけによる疼痛モデルにこれまで我々が開発してきた数種類の化合物を投与し、それぞれの鎮痛効果を観察する。

4. 研究成果

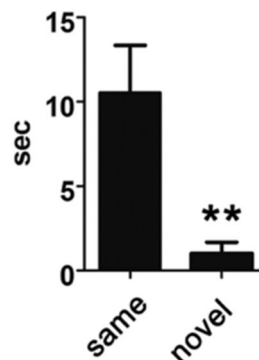
条件づけを行う際の無条件刺激として、ホルマリン溶液を足底に注射する。最適なホルマリン濃度を定めるため異なるホルマリン濃度を試した。図2の様に0.67%のホルマリン溶液20 μ lを足底に注入すると、2%のホルマリン注入に近い痛み反応を示し、かつ足底に炎症が残らないことが分かったので、0.67%のホルマリン溶液を足底に20 μ l注入することを無条件刺激とした。

この実験系を用いて、条件づけをしたマウスに条件刺激を与えたところ、lickingやbitingの痛み様の行動を示した(図3)。一方、条件づけをしたマウスに条件刺激とは異なる刺激を与えても痛み様の行動を示さなかった(図3)。これらの結果から、本研究で確立した条件づけマウスは痛み刺激を加えなくても条件刺激だけで痛み様行動を誘発することができることがわかった。

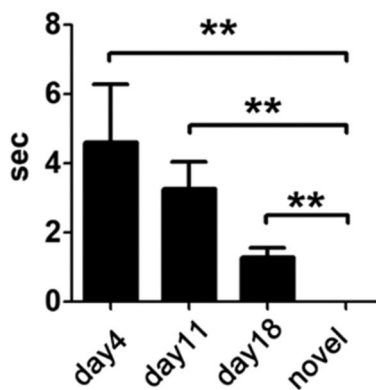
次に、このマウスで成立した条件づけが、どのくらい長い間保持されているかを調べる実験を行った。実験1日目と2日目条件づけをしたマウスはその後18日目でも、条件反応を引き起こすことが分かった(図4)。さらに、この条件づけマウスに、条件刺激だけで誘発される痛み様行動をどの様な薬剤が抑制することができるかを検討した。条件刺激によって誘発される痛み様反応はフェンタニルによって減少したが、イブプロフェン、プレガバリンまたはフルボキサミンでは減少しなかったことから、慢性疼痛に効果のある鎮痛薬の薬理的な特徴に類似していることが分かった(図5)。次に、この条件付け疼痛に神経系のどの部位が關与しているかを検討するため、神経活動のマーカーであるc-fos発現を各部位で検討した。その結果、条件付けで誘発される痛みは、末梢神経や脊髄後角は關与せず、むしろ大脳辺縁系と繋がり深い脳内の数箇所領域が關与していることが分かった。また、各種化合物を検索した結果、この条件付けによる疼痛に対してオピオイドと同等の鎮



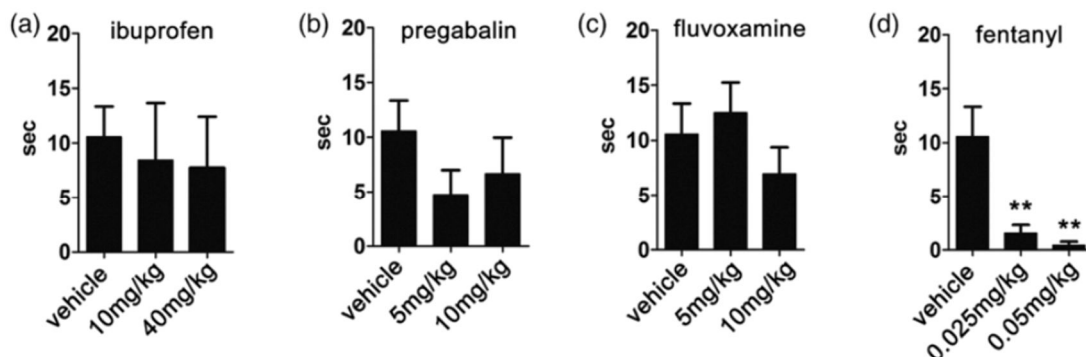
【図2】ホルマリンによる痛み様行動



【図3】条件刺激による痛み様行動



【図4】条件づけの痛み行動が保持される期間



【図5】各種鎮痛薬の条件づけ痛み反応に対する効果

痛効果を示す新しい化合物を見出した。さらにこの化合物は、条件付けの痛みによって上昇する脳内のc-fos発現も抑制した。これらの結果から、我々が確立した条件付けによる疼痛誘発モデルは、その発症に脳が關与する慢性疼痛の一つのモデルとなりうると考えられた。この慢性疼痛モデルに効果を示す化合物をリード化合物とし、創薬に向けた研究に発展させたい。

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 Nakamura Yukiko, Okano Yukiko, Sato Mizuka, Kobayashi Midori, Yamaguchi Takumi, Sumi Takuya, Koyama Yoshihisa, Kondo Makoto, Usui Noriyoshi, Shimada Shoichi	4. 巻 32
2. 論文標題 Pain-like behavior in mice can be induced by the environmental context in which the pain stimulus was previously given	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 386-393
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/WNR.0000000000001607	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 Ueda Norichika, Kondo Makoto, Takezawa Kentaro, Kiuchi Hiroshi, Sekii Yosuke, Inagaki Yusuke, Soda Tetsuji, Fukuhara Shinichiro, Fujita Kazutoshi, Uemura Motohide, Imamura Ryoichi, Miyagawa Yasushi, Nonomura Norio, Shimada Shoichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Bladder urothelium converts bacterial lipopolysaccharide information into neural signaling via an ATP-mediated pathway to enhance the micturition reflex for rapid defense	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21167
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-78398-9	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 Kobayashi Yuki, Imamura Ryoichi, Koyama Yoshihisa, Kondo Makoto, Kobayashi Hikaru, Nonomura Norio, Shimada Shoichi	4. 巻 10
2. 論文標題 Renoprotective and neuroprotective effects of enteric hydrogen generation from Si-based agent	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5859
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-62755-9	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0件

〔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	中村 雪子 (Nakamura Yukiko) (90548083)	大阪大学・医学系研究科・特任講師 (14401)	
研究分担者	近藤 誠 (Kondo Makoto) (50633012)	大阪公立大学・医学研究科・教授 (24405)	
研究分担者	小山 佳久 (Koyama Yoshihisa) (40397667)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究分担者	臼井 紀好 (Usui Noriyoshi) (00784076)	大阪大学・医学系研究科・准教授 (14401)	

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