

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 21 日現在

機関番号：13601
研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2009～2011
課題番号：21390432
研究課題名（和文） カルシトニン遺伝子関連ペプチドファミリーによる痛みの機序解明
研究課題名（英文） Involvement of calcitonin gene-related peptide family in various pain states
研究代表者 川真田 樹人（KAWAMATA MIKITO） 信州大学・医学部・教授 研究者番号：90315523

研究成果の概要（和文）： α CGRP 遺伝子欠損マウスと CGRP 受容体拮抗薬を用いて、術後痛および炎症性疼痛モデルを作製し CGRP の関与を検討した。本研究では、1) 疼痛の種類により α CGRP の関与が異なり、2) 炎症性疼痛モデルにおいて自発痛・熱性痛覚過敏に脊髄レベルで関与し、さらに 3) α CGRP は強く長い痛みに関与することが明らかとなった。臨床において疼痛のタイプにより、CGRP 受容体拮抗薬が有効である可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We studied the involvement of α CGRP in incisional pain model and inflammatory pain model by using α CGRP knockout mice and CGRP receptor antagonist. Our study suggested that 1) α CGRP was involved in inflammatory pain but not in incisional pain model, 2) α CGRP was involved in spontaneous pain and thermal hyperalgesia in inflammatory pain model in the dorsal horn spinal cord, and 3) α CGRP was involved in some strong and long lasting pain. Thus, antagonists of CGRP receptors may be useful for some kinds of pain such as inflammatory pain.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：CGRP ファミリー、血管新生、CGRP、アドレノメデュリン

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経因性疼痛や炎症性疼痛など、持続的な疼痛状態では、単一末梢神経から、アミノ酸（グルタミン酸）、ATP、ペプチドなど、様々な種類の興奮性伝達物質が脊髄で放出され、同時に複数の受容体が活性化することで、細胞内シグナル伝達を介し、脊髄神経の過剰興奮をきたす（Yaksh et al., PNAS, 1999; Perl, Nature Rev Neurosci, 2007）。

この時、軸索反射により末梢性にも興奮性伝達物質が放出され、末梢の痛覚線維の感受性亢進もきたす。これまで、グルタミン酸や ATP と、それら受容体（AMPA, NMDA, P2X3）に関する研究は発展したが、SP や CGRP などのペプチドについては、未だ不明な点が多い。最近、SP よりも、CGRP が痛みにも重要で、血圧や交感神経調節などの調節にも、重要な内因性リガンドであると考えられるようにな

った。さらに、CGRP ファミリーであるアドレノメデュリン (AM) は、降圧作用、血管新生、微小循環の改善など、多彩な生理機能を有するだけでなく、痛みの伝達物質とも考えられ、CGRP 以上の長時間の痛覚過敏を起こすことから、CGRP より痛みに重要な内因性リガンドの可能性がある (Ma et al., PNAS, 2006)。

(2) CGRP や AM を脊髄や末梢投与すると、長時間の痛覚過敏が形成されるが (Sun et al., J Neurophysiol, 2004; Ma et al., PNAS, 2006)、これらの詳細なメカニズムについては不明である。CGRP ファミリーの受容体である、膜 7 回貫通型のカルシトニン受容体様受容体 (CLR) は、単独ではリガンドが結合しても機能せず、膜 1 回貫通型のレセプタ活性調整タンパク (RAMP1-RAMP3) が CLR と共役することで、はじめて機能する。すなわち、RAMP-1 と CLR で CGRP 受容体を構成し、RAMP-2 あるいは RAMP-3 と CLR で AM 受容体を構成すると考えられる。こうして、RAMP が CGRP ファミリーの G-protein-coupled receptor: GPCR の膜への輸送や、リガンド特異性を決定する。このように、受容体の構成が複雑なため、痛み研究において、CGRP ファミリーの研究が遅滞していたと思われる。

2. 研究の目的

サブスタンス P (SP) や、カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) などのペプチドは、痛みの伝達・修飾物質として重要であるが、その詳細な機序は未だ不明である。本研究では、独自に作製されたノックアウトマウスを用いて、(1) CGRP ファミリーである CGRP と、アドレノメデュリン (AM) が、痛みに関与しているメカニズムを明らかにして、(2) カルシトニン受容体様受容体 (Calcitonin receptor-like receptor: CLR) と、受容体活性調節タンパク (RAMP) をターゲットとした、新たな鎮痛法の開発を目指す。

3. 研究の方法

マウスにおける行動生理学的検討と生化学的定量を行い、炎症性疼痛、手術痛における、CGRP と AM の関与を解析する。

行動学的検討：独自に作製された α CGRP ノックアウトマウス (信州大学医学研究科新藤隆行教授より供与) を用い、疼痛行動を記録する。Complete Freund adjuvant (CFA) を足底に投与した炎症性疼痛モデルと、足底切開を行った皮膚切開モデルを作製し自発痛、

熱性痛覚過敏、機械性痛覚過敏を測定する。

また、外科的切開を皮膚受容野に加え、炎症性物質による機能変化との差異を検討する。

また、足底と脊髄を取り出し、CGRP の AM の定量を行う。また後根神経節 (Dorsal root ganglion: DRG) と脊髄で、CGRP と AM の免疫染色を行う。さらに、Etracellular signal-regulated kinases (ERKs) のリン酸化が痛覚過敏の原因との報告があり (Carrasquillo & Gereau IV, J Neurosci, 2007)、CGRP 受容体-MEK-ERK シグナル伝達が、疼痛発現に重要との報告がある (Ferreira et al., Pain, 2005)。そこで本研究でも、mRNA およびリン酸化 ERK の定量をウエスタンブロット法で行い、DRG と脊髄における免疫染色を行う。

4. 研究成果

(1) 術後痛、炎症性疼痛モデルにおける後肢腫脹の検討

術後痛、炎症性疼痛モデル作製 4 時間後より患側の足底径が基準値と比較して有意に増加した。観察期間を通して野生型 (WT マウス)、 α CGRP 遺伝子欠損マウス (KO マウス) 間に差はなかった。本結果より術後痛、炎症性疼痛ともに、末梢における炎症の指標である後肢腫脹に α CGRP は関与しないことが示唆された。(図 1)

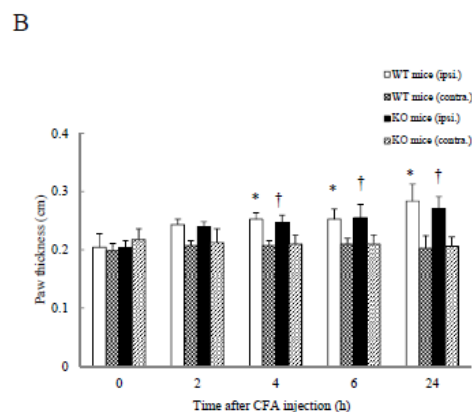
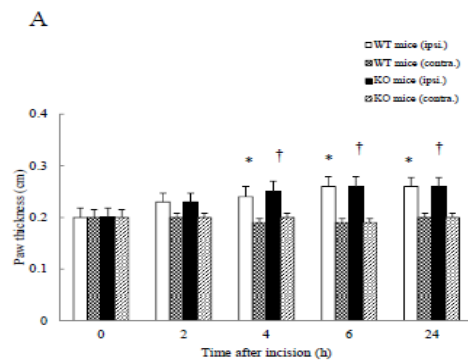


図1 後肢足底径の経時的変化

WTマウス、 α CGRPKOマウスにおける術後痛(A)、炎症性疼痛(B)モデル作成後の足底径の経時的変化を示す。

(2) 術後痛モデルにおける α CGRPの自発痛、熱性痛覚過敏、機械性痛覚過敏への関与(図2)

(A) モデル作製2-6時間後にWTマウス、 α CGRPKOマウスともに Guarding pain score (GPS) は基準値と比較して有意に増加した。観察期間を通して両群間に差はなかった。

(B) モデル作製2-72時間後にWTマウス、 α CGRPKOマウスともに侵害性熱刺激に対する逃避潜時が減弱したが、観察期間を通して、両群間に差はなかった。

(C) モデル作製2-72時間後にWTマウス、 α CGRPKOマウスともに侵害性機械刺激に対する逃避閾値が基準値と比較して有意に低下したが、観察期間を通して両群間に差はなかった。

以上より、術後痛モデルにおいて、 α CGRPは自発痛、熱性痛覚過敏、機械性痛覚過敏に関与しないことが示された。

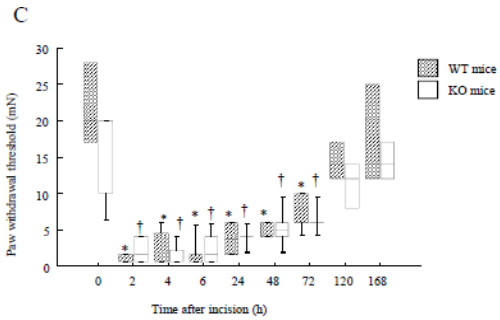
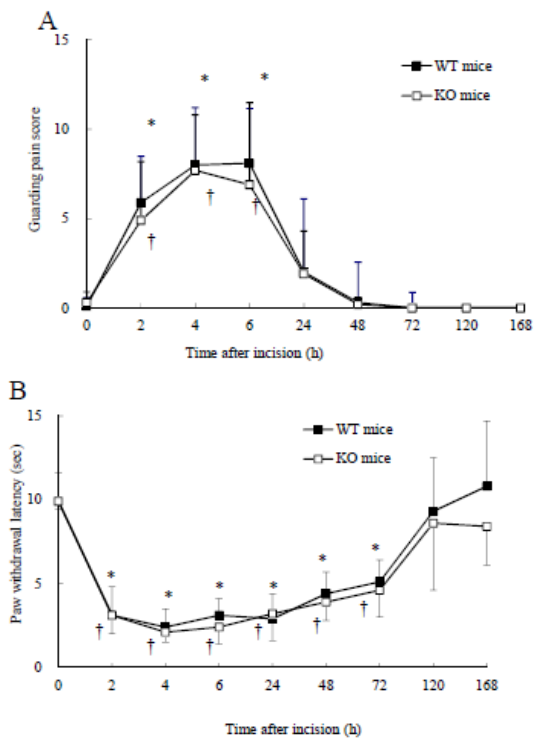


図2 術後痛モデルにおける行動評価

(A) Guarding pain score、(B) 侵害性熱刺激に対する逃避潜時、(C) 機械刺激に対する逃避閾値

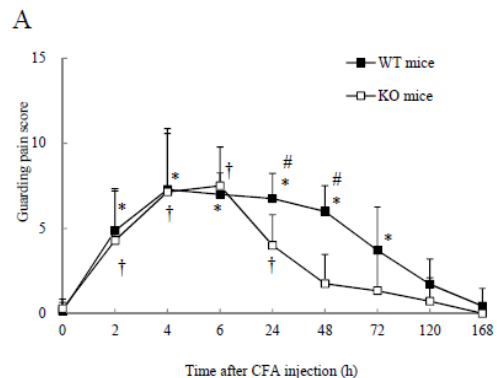
(3) 炎症性疼痛モデルにおける α CGRPの自発痛、熱性痛覚過敏、機械性痛覚過敏への関与(図3)

(A) α CGRPKOマウスはモデル作製2-24時間後に、WTマウスは2-72時間後にGPSが基準値と比較して有意に増加した。24, 48時間後ににおいてKOマウスのGPSはWTマウスと比較して有意に減少した。

(B) α CGRPKOマウスはモデル作製2-120時間後、WTマウスは2-168時間後に侵害性熱刺激に対する逃避潜時が基準値と比較して有意に減弱した。24-72時間後に α CGRPKOマウスの逃避潜時はWTマウスと比較して有意に増加した。

(C) モデル作製2-120時間後にWTマウス、 α CGRPKOマウスともに機械刺激に対する逃避閾値が基準値と比較して有意に低下した。

以上より、 α CGRPは炎症性疼痛モデルにおいて自発痛、熱性痛覚過敏には関与するが、機械性痛覚過敏には関与しないことが示された。



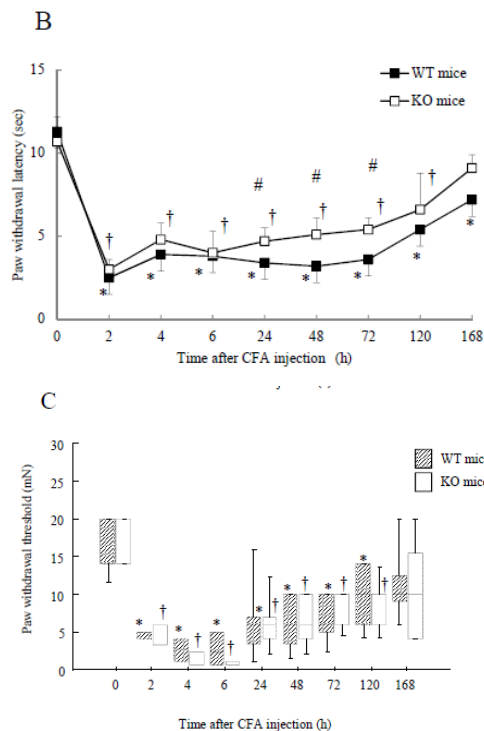


図3 炎症性疼痛モデルにおける行動評価 (A) Guarding pain score、(B) 侵害性熱刺激に対する逃避潜時、(C) 機械刺激に対する逃避閾値

(4) CGRP 受容体拮抗薬 (CGRP₈₋₃₇) の炎症性熱性痛覚過敏に対する効果 (図4)

CGRP₈₋₃₇ の脊髄くも膜下投与により、炎症性熱性痛覚過敏は容量依存性に有意に減弱した。一方、CGRP₈₋₃₇ の後肢皮下炎症部位への局所投与では、炎症性熱性痛覚過敏は変化しなかった。以上より、αCGRP は炎症疼痛モデルにおいて、熱性痛覚過敏に脊髄で関与していることが示された。

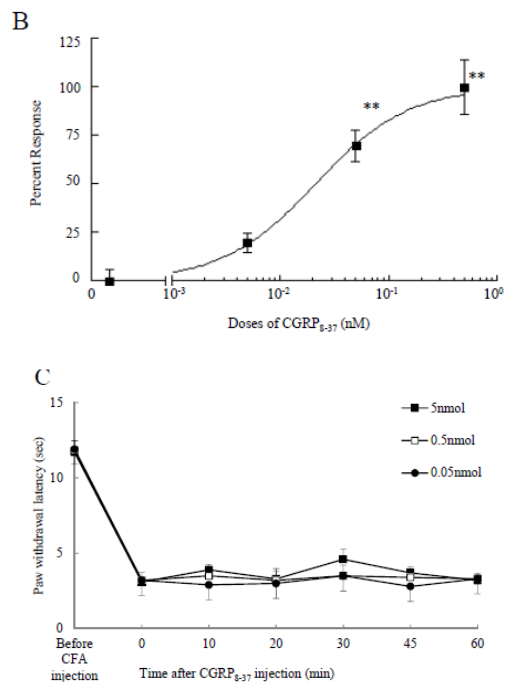
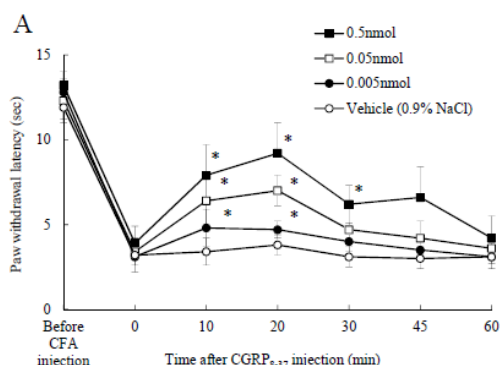
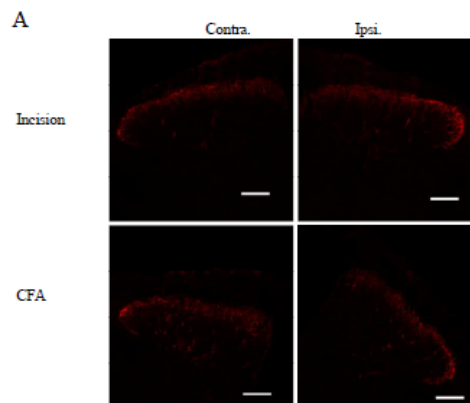


図4 CGRP₈₋₃₇ の炎症性熱性痛覚過敏に対する効果 (A) 脊髄くも膜下投与、(B) 脊髄くも膜下投与における容量反応曲線、(C) 後肢皮下炎症部位への局所投与

(5) 免疫組織染色による脊髄後角での CGRP 発現検討 (図5)

WT マウスにおいて、術後痛モデル・炎症性疼痛モデル作製 4、24 時間後の脊髄後角での CGRP 発現を定量解析した。モデル作製 4 時間後では、両モデルともに患側と健側での発現は変わらなかったが、24 時間後では炎症性疼痛モデルにおいて患側での発現が健側と比較して有意に増加した。以上より、炎症性疼痛モデルにおいて脊髄後角表層における αCGRP が自発痛、熱性痛覚過敏に関与し、さらに、24 時間以上続く長い痛みに関与することが示唆された。



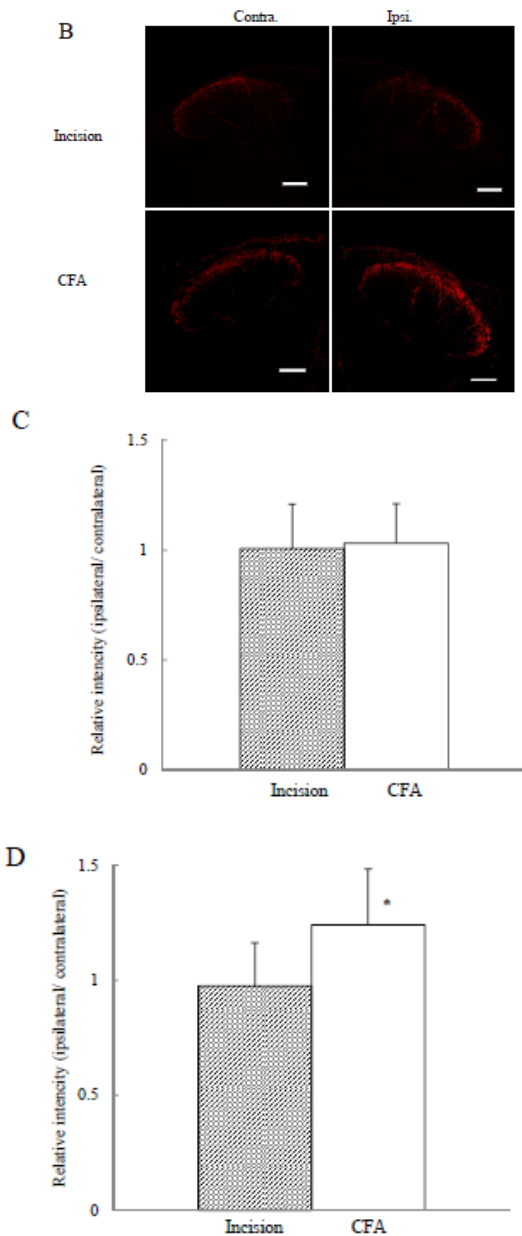


図 5 野生型マウスにおける脊髄後角 CGRP の発現。(A) モデル作製 4 時間後、(B) モデル作製 24 時間後、(C) モデル作製 4 時間後の CGRP 発現の定量評価、(D) モデル作製 24 時間後の CGRP 発現の定量評価

(6) 免疫組織染色による脊髄後角における c-Fos 発現の検討 (図 6)

WT マウスにおいて、術後痛モデル作製 4 時間後は患側の脊髄後角での発現が健側と比較し有意に増加していたが 24 時間後には消失した。炎症性疼痛モデルは、4、24 時間後ともに患側での発現が健側と比較し有意に増加していた。 α CGRPKO マウスの炎症性疼痛モデルにおいて、4 時間後は患側での発現が有意に増加していたが、24 時間後には消失した。

以上より、炎症性疼痛モデルは、術後痛と比較して末梢からの脊髄への侵害刺激の入力が 24 時間以上続き、 α CGRP は炎症性疼痛モデルにおいて 24 時間後の c-fos 発現に関与していることが示された。

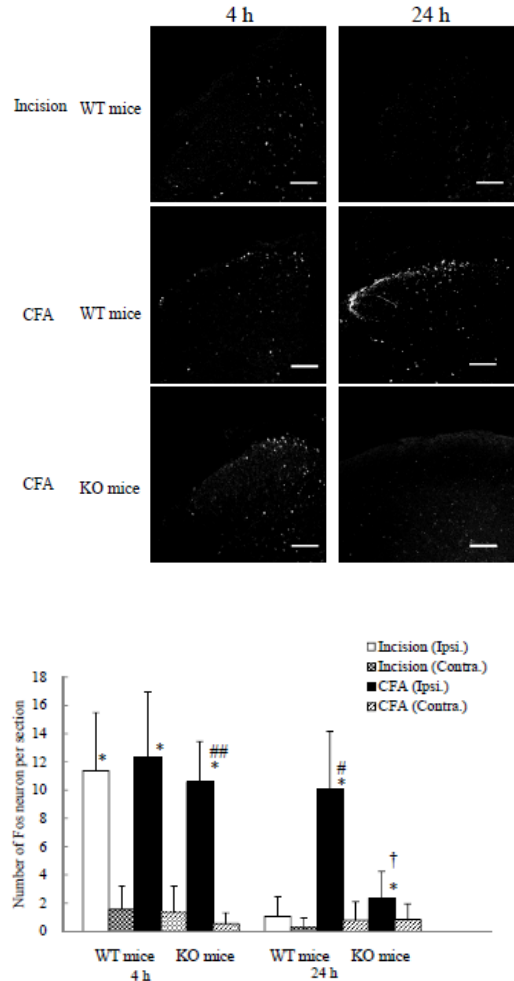


図 6 脊髄後角における c-fos タンパクの発現。

(7) 研究成果のまとめ

- WT マウスにおける行動評価と脊髄での c-fos 発現の検討から、自発痛・熱性痛覚過敏は術後痛モデルと比較して炎症性疼痛モデルにおいて長く続いた。
- α CGRPKO マウスを用いた行動評価と CGRP 受容体拮抗薬の投与、脊髄後角での CGRP の免疫組織学的検討より、 α CGRP は術後痛モデルにおいて、自発痛・熱性痛覚過敏・機械性痛覚過敏に関与しなかった。一方炎症性疼痛モデルでは、自発痛、熱性痛覚過敏に脊髄レベルで関与したが、機械性痛覚過敏には関与しなかった。
- 患側脊髄後角表層での CGRP 発現増加が

炎症性熱性痛覚過敏に関与することが示唆された。

④ α CGRPKO マウスを用いた行動評価と脊髄での c-fos 発現の検討、CGRP の脊髄での発現の経時的検討により、 α CGRP は 24 時間以上自発痛が続く強く長い痛みにより脊髄へ放出され、疼痛を引き起こすモダリティーによって CGRP の関与が異なることが明らかとなった。以上より、臨床において、CGRP 受容体拮抗薬は偏頭痛の治療薬としてすでに臨床応用されているが、疼痛の種類により効果が異なり、術後痛には有効でないが、関節炎のような持続する炎症性疼痛や炎症を伴う術後痛には有効である可能性が示唆された。

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 6 件)

- ① Ikeno S, Nagano M, Tanaka S, Nishimura C, Kawamata T, Kawamata M. Gastric tube insertion under visual control with the use of the Pentax-AWS®. J Anesth 2011;25:475-476 (査読有)
- ② Terashima Y, Kawamata M, Takebayashi T, Tanaka S, Tanimoto K, Yamashita T. Changes in synaptic transmission of substantia gelatinosa neurons in a rat model of lumbar radicular pain revealed by in vivo patch-clamp recording. Pain 2011;152:1024-1032. (査読有)
- ③ Sugiyama D, Imoto K, Kawamata M, Furue H. Descending noradrenergic controls of spinal nociceptive synaptic transmission. Pain Research 2011;26:1-9. (査読有)
- ④ Narimatsu E, Niiya T, Kawamata T, Kawamata M, Yamakage M. Effects of atropine and pralidoxime on neuronal actions of paraoxon in rat hippocampal slices. Neurosci Res. 2010 68:276-84. (査読有)
- ⑤ Japanese Complex Regional Pain Syndrome Research Group. Development of comprehensive diagnostic criteria for complex regional pain syndrome in the Japanese population. Pain. 2010 ;150:243-9. (査読有)
- ⑥ Narimatsu E, Niiya T, Kawamata T, Kawamata M, Yamakage M. Effects of

atropine and pralidoxime on neuronal actions of paraoxon in rat hippocampal slices. Neuroscience Research

2010;68:276-284. (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Ishida K, Kawamata T, Shindo T, Ishida T, Kawamata M. α CGRP is involved in inflammation- but not incision induced thermal hyperalgesia. Anesthesiology: A995, 2011.10.17,Chicago
- ② Ishida K, Tanaka S, Kawamata T, Shindo T, Kawamata M. CGRP is involved in an animal model of postoperative pain. Anesthesiology: A1503, 2010.10.19,San Diego

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川真田 樹人 (KAWAMATA MIKITO)

信州大学・医学部・教授

研究者番号：90315523

(2) 研究分担者

川股 知之 (KAWAMATA TOMOYUKI)

信州大学・医学部・准教授

研究者番号：80336388

田中 聡 (TANAKA SATOSHI)

信州大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：60293510

新藤 隆行 (SHINDO TAKAYUKI)

信州大学・医学系研究科・教授

研究者番号：90345215

成松 英智 (NARIMATSU EICHI)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70295343