

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592733

研究課題名(和文)慢性疼痛時の脊髄モノアミントランスポーター発現変動の解明

研究課題名(英文)The study on the expression of monoamine transporters after onset of neuropathic pain

研究代表者

十川 千春 (Sogawa, Chiharu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：10253022

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円、(間接経費) 1,110,000円

研究成果の概要(和文)：神経因性疼痛は、神経障害を伴う難治性慢性疼痛のことであるが、その第一選択薬とされている抗うつ薬が、十分に効果を発揮しない場合が少なからずある。その理由として、抗うつ薬のターゲットであるモノアミントランスポーター(MAT)の病態変化に伴った発現変化が挙げられると考え、本研究では、発症機序の異なる種々の神経因性疼痛モデル動物の病態時におけるMAT発現を調べた。その結果、疼痛モデルの違いによって痛みに伴うMATの発現変化が異なることがわかり、病態に伴うMAT発現変化は抗うつ薬の疼痛制御に大きく関わると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain is defined with for a chronic or persistent pain to be generated by a pathophysiological alteration on the peripheral and/or central nervous system (CNS). Antidepressants are known as the inhibitors of monoamine neurotransmitter transporters (MATs) are therapeutically useful ligands for the treatment of neuropathic pain. However, they do not sometimes provide enough effects. We focused the change of MATs expression level in the CNS after the onset of the neuropathic pain. In this study, MATs mRNA level decreased in the brain stem after onset of the pain in limited neuropathic pain model. We suggested that the change of MAT expression in the CNS associated with therapeutic efficacy of antidepressants for the neuropathic pain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：神経因性疼痛 トランスポーター モノアミン 抗うつ薬 GABA

1. 研究開始当初の背景

神経因性疼痛は神経傷害に伴い誘導され、侵害受容器への刺激がないにもかかわらず生じる難治性の慢性疼痛で、口腔領域においても、外傷、帯状疱疹などからしばらく後に口腔粘膜、舌、歯に発症し、歯科臨床上問題となることが多い。抗うつ薬は、神経因性疼痛に対する薬物療法の第一選択薬として使用され、中でも第一世代の三環系抗うつ薬(TCA)はもっとも多く使用され鎮痛効果が支持されているが、TCA では鎮痛効果が十分得られない場合も少なからず報告されている。さらに、TCA よりも副作用の少ない新規抗うつ薬である選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)は、多くの臨床結果からTCAよりも鎮痛効果が劣るという報告があるなど、新規抗うつ薬の鎮痛効果は未だ明確となっていない。しかし、抗うつ薬が神経因性疼痛の治療薬として頻用されているにもかかわらず、治療効果が十分ではない原因は解明されておらず、臨床上大きな問題となっている。

抗うつ薬は、痛みの伝導路を制御する下行性抑制系神経(ノルアドレナリン(NA)やセロトニン(5-HT)神経の神経終末に存在する NA トランスポーター(NET)および 5-HT トランスポーター(SERT)を阻害し、5-HT や NA の再取り込みを選択的に阻害することにより下行性抑制路を賦活化し、効果を発揮するとされている。この機序からも疼痛発症時の下行性抑制路におけるNETやSERTの発現調節は、疼痛制御に深くかかわっていると考えられるが、意外なことに、慢性疼痛発症時におけるモノアミントランスポーター(MAT:NET、SERT およびドパミントランスポーター(DAT)の総称)発現変化あるいは機能変化については、これまで検討されて来なかった。

2. 研究の目的

本研究では、神経因性疼痛に対する治療において『なぜ抗うつ薬が無効なケースがあるのか?』について疼痛の病態変化に伴った中枢神経系における MAT 発現変動と、抗うつ薬

の鎮痛効果の相関を検証することによってその原因を明らかにすることを目的とする。慢性疼痛時において、上位中枢および脊髄では様々な可塑的变化を起こしていることが想定され、慢性疼痛の病態変化に伴い MAT 発現あるいは機能低下により下行性抑制路がすでに賦活化を起こしている可能性を考えた。具体的には、神経因性疼痛モデルを用いて、それらの疼痛反応と病態変化に伴う MAT の発現変動を解析することにより、抗うつ薬の効果を検討し、歯科臨床上問題となる口腔領域に発症する難治性慢性疼痛に対する抗うつ薬の有効性および有効な治療法選択のためのエビデンスを得る。

3. 研究の方法

(1)神経因性疼痛モデルとして、雄性 ddY 系マウスを用いて、疾患特異的な神経因性疼痛モデルである糖尿病性ニューロパチーモデル、慢性炎症により発症する神経因性疼痛モデルである完全フロインドアジュバンド慢性炎症モデル、一般的な神経障害性疼痛モデルである坐骨神経部分結紮モデルを作製し、解析に用いた。

(2)慢性疼痛発症後の MAT 発現変動を解析するため、NET mRNA、SERT mRNA および DAT mRNA に対する特異的プライマーを設計し、RT-PCR を行った。また、特に疼痛制御に関与すると思われる NET および SERT については、リアルタイム PCR 法にて mRNA 発現量を定量的に解析した。

(3)既存の TCA およびその他のトランスポーター阻害薬における神経伝達物質取り込み阻害効果を検証するため、各トランスポーター遺伝子導入発現系の構築を試み、得られた各トランスポーター定常発現細胞を用いてトランスポーター阻害薬の基質取り込み阻害実験を行った。

4. 研究成果

平成 23 年度は、坐骨神経結紮マウスを作製し、坐骨神経部分結紮後アロディニア発症を確認した後、脳内(大脳皮質、小脳、脳幹)および

脊髄内における MAT 発現を RT-PCR 法により解析した。脊髄において MAT はいずれも発現がみられなかった。一方、アロディニア発症マウスと対照マウス脳幹において DAT mRNA が増加傾向であったものの、疼痛制御に関わるとされる、NET および SERT mRNA 発現に差はみられなかった。

一方、抗うつ薬の疼痛作用において、一般的な TCA の標的である MAT の他に、抑制性神経の関わりも考慮するため、我々は GABA 神経終末において GABA 再取り込みを行う GABA トランスポーター (GAT) についても抗うつ薬の阻害作用を調べた。3 種の MAT および、4 種の GAT サブタイプ (GAT-1, GAT-2, GAT-3 および タイトン トランスポーター (BGT-1)) それぞれの遺伝子導入発現系を用い、11 種 TCA の効果を解析した結果、解析した TCA はいずれも、GAT サブタイプのうち BGT-1 に最も強い阻害作用をもつことが明らかとなった。以上の結果をもとに、GAT の中でも BGT-1 mRNA についてその発現変動を解析した結果、部分結紮後のアロディニア発症時における BGT-1 mRNA は脊髄、脳内各部位ともに対照マウスと有意な差がなかった。

平成 24, 25 年度は昨年度までの不完全神経損傷モデルである坐骨神経部分結紮モデルに加え、神経因性疼痛モデルとして、疾患特異的な神経因性疼痛モデルであるストレプトゾトシン誘発糖尿病性ニューロパチーモデル、慢性炎症により発症する神経因性疼痛モデルである完全フロインドアジュバンド誘発炎症モデルについてさらに解析を行った。

MAT のうちまず NET mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析した。対照群と比較した結果、糖尿病性ニューロパチーモデル、坐骨神経部分結紮モデルにおいては、脳幹 NET mRNA の発現量は対照群と差がなかったが、完全フロインドアジュバンド誘発炎症モデルにおいては、対照群と比較して NET mRNA 発現

量の有意な減少がみられた。

さらに、同モデル群において、SERT mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法にて定量的に解析した結果、NET 同様、対照群と比較して SERT mRNA 発現量の有意な減少がみられた。以上の結果から、慢性炎症時に起こっている中枢神経系の可塑的变化が NET のみならず SERT 発現も低下を引き起こし、これら MAT 発現低下が、下行性抑制路における NA 神経および 5-HT 神経の賦活化を起している可能性があり、抗うつ薬による疼痛制御に大きく影響すると考えられた。

本研究成果は、様々な原因の異なる神経因性疼痛発症後の MAT 発現変化と、抗うつ薬の有効性との相関を明らかにする一助となるものである。今後さらに神経因性疼痛の発症機序に対応した有効な鎮痛薬選択のためのエビデンスを得ることへと繋がるのが期待される。

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 5 件)

1. Jinzenji, A., Sogawa, C., Miyawaki, T., Wen, X., Yi, D., Ohyama, K., Kitayama, S., Sogawa, N., and Morita, K.: Antiallodynic action of 1-(3-(9H-Carbazol-9-yl)-1-propyl)-4-(2-methoxyphenyl)-4-piperidinol (NNC05-2090), a betaine/GABA transporter inhibitor. J. Pharmacol., Sci., in press. (査読有)
2. Sogawa, N., Hirai, K., Sogawa, C., Ohyama, K., Miyazaki, I., Tsukamoto, G., Asanuma, M., Sasaki, A. and Kitayama, S.: Protective effect of cepharanthin on cisplatin-induced renal toxicity through metallothionein expression., Life Sci., 92: 727-732, 2013. Doi: 10.1016/j.lfs.2013.01.031. (査読有)
3. Sogawa, N., Hazehara, Y., Kunitomo, K., Morita, Y., Bupsang, Y., Ohyama, K., Sogawa, C. and Kitayama, S.: Age-dependent changes in

the susceptibility to thiopental anesthesia in mice: analysis of the relationship to the functional expression of GABA transporter. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 103: 267-272, 2012. doi: 10.1016/j.pbb.2012.08.027. (査読有)

4. Gerile, Sogawa, C., Ohyama, K., Masuko, T., Kusama, T., Morita, K., Sogawa, N. and Kitayama, S.: Inhibitory action of antidepressants on mouse betaine/GABA Transporter (BGT1) heterologously expressed in cell cultures. *Int. J. Mol. Sci.* 13:2578-89. 2012. doi: 10.3390/ijms13032578. (査読有)
5. Sogawa, C., Sogawa, N., Ohyama, K., Kikura-Hanajiri, R., Goda, Y., Sora, I. and Kitayama, S.: *Curr Neuropharmacol.* 2011, 9(1):58-62. doi: 10.2174/157015911795017425. (査読有)

[学会発表](計 7 件)

1. Wen, X., Sogawa, C., Ohyama, K., Jinzenji, A., Miyawaki, T., and Sogawa, N.: Coexpression of H3R decrease NET uptake activity and membrane expression in CHO cells stably express NET. 第 87 回日本薬理学会年会、2014 年 3 月 21 日、仙台。
2. Sogawa, N., Sogawa, C., Ohyama, K., Wen, X., Yi, D. and Kitayama, S.: Regulation of noradrenaline transporter gene expression by nicotine. Neuroscience 2013 Annual Meeting, 2013 年 11 月 10 日、San Diego, USA.
3. Jinzenji, A., Sogawa, C., Miyawaki, T., Morita, K., Kitayama, S. and Sogawa, N.: Anti-allodynic action of NNC 05-2090, a betaine/GABA transporter inhibitor. Neuroscience 2013 Annual Meeting, 2013 年 11 月 9 日、San Diego, USA.
4. 秦泉寺紋子、十川千春、宮脇卓也、森田克也、十川紀夫、北山滋雄: 新規障害性疼痛に

対する GABA トランスポーター阻害薬の効果、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 21 日、岡山。

5. Sogawa, C., Ohyama, K., Sogawa, N. and Kitayama, S.: Characterization of human noradrenaline transporter gene at 5'-flanking region. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡。
6. Ohyama, K., Sogawa, C., Wen, X., Morita, K., Sogawa, N. and Kitayama, S.: Post-transcriptional regulation of noradrenaline transporter by nicotine. 第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡。
7. 北山滋雄、十川千春、大山和美、十川紀夫: ヒトノルアドレナリントランスポーター遺伝子 5' プロモーター領域の解析、第 122 回日本薬理学会近畿部会、2012 年 11 月 16 日、豊中。

[図書](計 2 件)

1. Sogawa, C., Sogawa, N. and Kitayama, S.: Site-directed Mutagenesis for the Identification of Ligand-binding Sites on Na⁺/Cl⁻-dependent Neurotransmitter Transporters. *Protein Purification and Analysis III - Methods and Applications*. 2014, preparing. ISBN: iConcept Press. Retrieved from <http://www.iconceptpress.com/books/protein-purification-and-analysis-iii--methods-and-applications/>
2. Sogawa, C., Sogawa, N. and Kitayama, S.: Immunocytochemical approaches to the identification of membrane topology of the Na⁺/Cl⁻-dependent neurotransmitter transporters. *Applications of immunocytochemistry*. Edt. Hesam Dehghani, INTECH. 2012: 117-134. ISBN 978-953-51-0229-8.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

十川 千春 (SOGAWA CHIHARU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10253022

(2)研究分担者

北山 滋雄 (KITAYAMA SHIGEO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80177873

(H23 H24)

十川 紀夫 (SOGAWA NORIO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教

授

研究者番号：30236153

森田 克也 (MORITA KATSUYA)

広島文化学園大学・看護学部看護学科・教授

研究者番号：10116684