

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：34401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659294

研究課題名(和文)オートラジオグラフィ・カルシウムイメージングによる脳・脊髄の痛みの可視化

研究課題名(英文)Visualization of the change in pain by the autoradiography and calcium imaging in the brain and spinal cord

研究代表者

宮崎 信一郎(MIYAZAKI, SHINICHIRO)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：30411359

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円、(間接経費) 660,000円

研究成果の概要(和文)：アクロメリン酸誘導体PSPA-4は、アロディニア誘発作用と抗アロディニア作用の二面性を有し、脳・脊髄でカイニン酸受容体に結合することが示唆された。一方で、PSPA-4は、カイニン酸とは異なるカルシウム活性を示し、既知のカイニン酸受容体とは異なる経路でアロディニアに関与していることが示唆された。痛みを可視化するには放射性同位体で標識可能な新たな化合物が必要である。

NMDA、AMPA受容体に比較し、カイニン酸受容体の役割の解明は遅れているが、今回の結果よりPSPA-4は、アクロメリン酸Aの作用メカニズムの解明だけではなく、中枢神経および末梢神経での痛みの伝達機構の解明に寄与する可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：PSPA-4, an acromelic acid (Acro-A) analogue, attenuated the Acro-A-induced allodynia at low doses and induced allodynia at high doses. In vitro autoradiography, [¹¹C]PSPA-4 was specifically bound to the rat brain and spinal cord, and the binding was significantly displaced by kainic acid. And, PSPA-4 increased intracellular Ca²⁺ concentration of cultured dorsal root ganglion neurons responding to glutamate, much higher than kainate in of them. Taken together, that PSPA-4 attenuated allodynia at low doses and induced allodynia at high doses via a binding site different from known kainate antagonists. In order to visualize the change of pain, a new analogue which has stronger radioactivity is necessary for in vitro autoradiography.

The development of PSPA-4 will enable us to make a breakthrough in the understanding of the action mechanism not only of Acro-A, but also of pain transmission in the periphery and central nervous system.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・疼痛学

キーワード：アロディニア 神経障害性痛 アクロメリン酸 アクロメリン酸誘導体 オートラジオグラフィ カルシウムイメージング

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、難治性であり、既存の治療法に抵抗性を示すことから、その病態のさらなる解明および新たな治療法の開発が望まれている。日本固有の毒茸であるドクササコを摂取すると軽い嘔気などの初期症状を経て、4~5日後に四肢末端に灼熱痛と神経障害性疼痛の特徴であるアロディニア（触覚刺激で誘発される激しい痛み）が出現し、1カ月以上も持続する。アクロメリン酸 A はドクササコから抽出されたものであり、構造上から non-NMDA 受容体に作用すると考えられている。我々は、アクロメリン酸 A をマウスの髄腔内へ投与すると、1 fg の微量な用量でアロディニアを誘発することを見いだした。さらに、アクロメリン酸を単純構造化したアクロメリン酸誘導体導体 (2S,3R,4R)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1) を合成し、PSPA-1 が、アクロメリン酸 A 惹起のアロディニアを抑制することを見いだした。アクロメリン酸 A およびアクロメリン酸誘導体の作用部位は明らかではないものの、PSPA-1 は神経障害性疼痛に対する新たな治療薬として期待される。

今までアクロメリン酸 A は、non-NMDA 受容体を介して薬理作用を惹起すると考えられていた。しかし、アクロメリン酸 A 惹起のアロディニアが、non-NMDA 受容体拮抗薬で抑制されないこと、non-NMDA 受容体作動薬の AMPA、カイニン酸とは行動薬理的な結果が異なることより、アクロメリン酸 A が特異的に作用する新規の受容体の存在が示唆される。そして、アクロメリン酸 A のメカニズムが解明されれば、アクロメリン酸誘導体が今後の神経障害性疼痛の治療薬の手段となりうる。

2. 研究の目的

(1) ¹¹C で標識可能なアクロメリン酸誘導体 (2S,3R,4R)-3-Carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4) を新たに合成し、¹¹C]PSPA-4 を用いた in vitro autoradiography (ARG) 法で、アクロメリン酸 A およびアクロメリン酸誘導体の作用部位を解明する。

(2) ラットを用いた神経障害性疼痛モデルに¹¹C]PSPA-4 投与することで、in vitro ARG 法で¹¹C]PSPA-4 の結合部位、結合の程度を画像化する。カルシウムイメージング法で細胞の反応の強度を画像化する、以上により痛みの変化を可視化する。

3. 研究の方法

(1) PSPA-4 の薬理効果

PSPA-4 を無麻酔のマウスの髄腔内へ投与し、その反応を検討する。投与後、筆を用いてアロディニアの反応 (0, 無反応, 1, 軽度の啼泣, 2, 激しい啼泣または逃避) を 5 分間隔で 50 分間評価する。

(2) ¹¹C]PSPA-4 を用いた in vitro ARG 法対象とする標本は、Wistar ラットの脳と脊髄を使用する。20 nM 前後の ¹¹C]PSPA-4 に対して、nonspecific binding の薬剤を 10 μM 添加した溶液を脳・脊髄切片に反応させる。反応した ¹¹C]PSPA-4 の力価を画像化し評価する。

(3) 脊髄後根神経節 (DRG) でのカルシウムイメージング法

培養した DRG ニューロンを各薬剤 (PSPA-4、カイニン酸、アクロメリン酸 A、グルタミン酸) に暴露し、分子蛍光イメージングシステムカメラを用いて細胞内のカルシウムの変化を解析する。アクロメリン酸 A およびアクロメリン酸誘導体が、DRG でカルシウムの透過性をどのように変化させるかを検討する。

4. 研究成果

(1) PSPA-4 の薬理効果

PSPA-4 は、高用量 (1 pg) でアロディニア誘発作用を有し、一方、低用量 (1 fg) では、PSPA-1 と同様にアクロメリン酸 A 惹起のアロディニアを抑制した (図 1A)。PSPA-4 惹起のアロディニアは、カイニン酸受容体拮抗薬 1-(4-aminophenyl)-3-methylcarbonyl-4-methyl-3,4-dihydro-7,8-methylenedioxy-5H-2,3-benzodiazepine (GYKI53655) によって抑制された (図 2)。

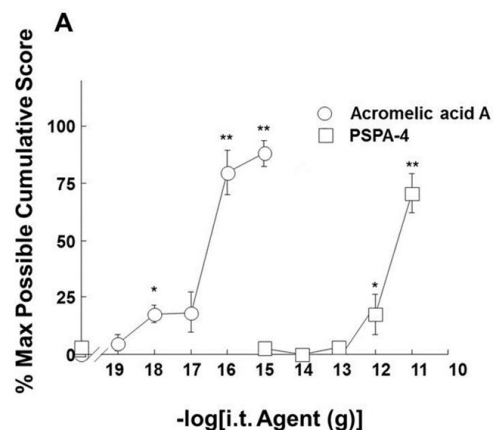


図1A PSPA-4 のアロディニア誘発作用

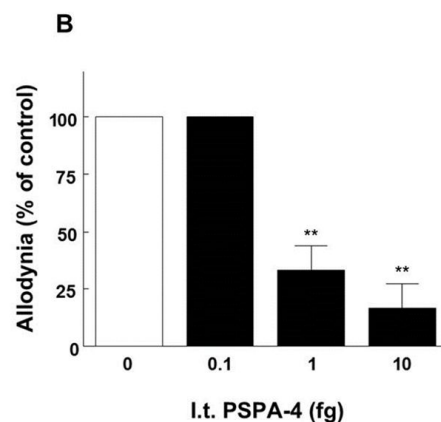


図1B PSPA-4 のアロディニア抑制作用

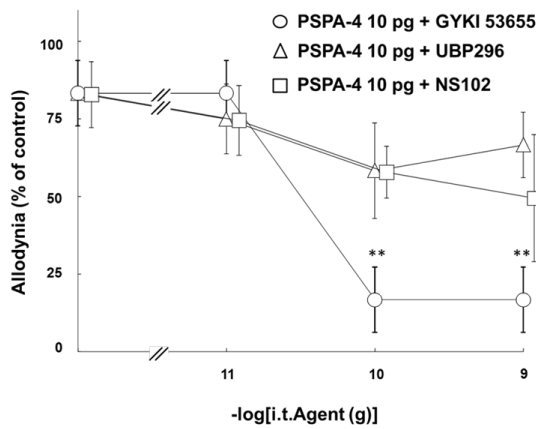


図2 PSPA-4惹起のアロディニアに対する
カイニン酸受容体拮抗薬の効果

(2) in vitro ARG 法

[¹¹C]PSPA-4 は、ラットの脳、特に海馬、尾状核被殻、皮質および脊髄全体に結合した。¹¹C]PSPA-4 の結合は、PSPA-1、PSPA-4、カイニン酸で阻害されたが、GYKI53655 では、阻害されなかった (図3)。

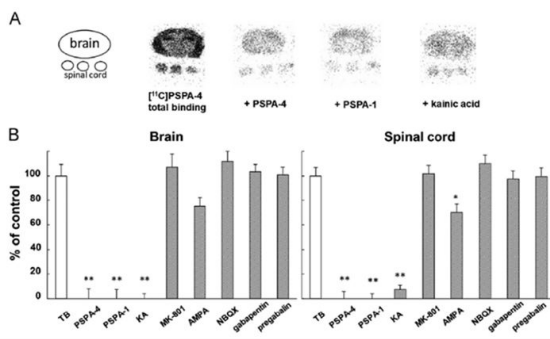


図3 [¹¹C]PSPA-4 in vitro ARG

[³H]カイニン酸の結合部位は、[¹¹C]PSPA-4 と類似し、脊髄では、後角に強い結合を認めた。その結合は、PSPA-4、PSPA-1 の存在下で阻害されたことより、PSPA-4 は、カイニン酸受容体に結合していることが示唆された。(図4)

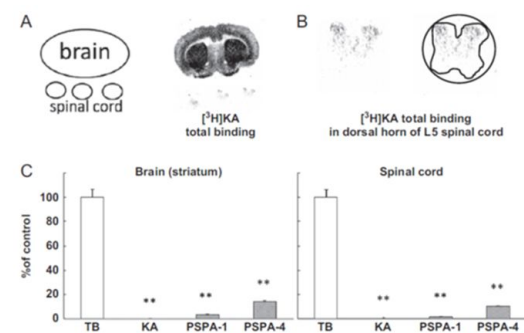


図4 [³H]PSPA-4 in vitro ARG

(3) DRG でのカルシウムイメージング法
PSPA-4 は DRG 培養細胞内のカルシウム濃度を上昇 (27.9 ± 12.7%) させ、カイニン酸 (9.5 ± 4.0%) とは異なる反応を示した。また、カイニン酸受容体を脱感作させる concanavalin A で前処置を行うと、PSPA-4 による細胞内カルシウム濃度の上昇は減弱した (図5)。

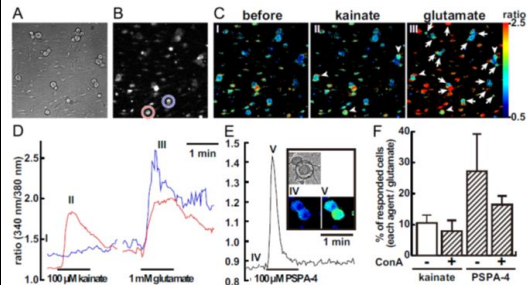


図5 DRGでのカルシウムイメージング

(4) 神経障害性痛モデル (ラット) の脳・脊髄を用いた in vitro ARG 法

神経障害性痛モデルの脳・脊髄に特異的な [¹¹C]PSPA-4 の結合部位を見出せなかった。また、神経障害性痛モデルの脳での [¹¹C]PSPA-4 の結合部位は、痛み刺激が伝わっている右半球と、痛み刺激が伝わっていない左半球で比較して差は認めなかった。これらの事から、[¹¹C]PSPA-4 を用いた in vitro ARG 法は、神経障害性痛に関する部位に特異的に結合し痛みを可視化するには、[¹¹C]PSPA-4 の比放射能が低く、困難と考えられた。現在、共同研究チームは新たな PSPA-4 類縁体を開発中である。

近年、カイニン酸受容体が痛みの伝達に深く関与していることが示唆されている。特にカイニン酸受容体サブタイプの GluK1 受容体拮抗薬 MSV111-19 は、神経障害性疼痛などの慢性痛や急性痛に効果があると報告されている。PSPA-4 惹起のアロディニアは、カイニン酸受容体サブユニット GluK2/3 および GluK3 の拮抗薬である GYKI53655 によって抑制されたが、in vitro ARG 法では、[¹¹C]PSPA-4 の結合を阻害しなかった。この点は、PSPA-4 の解離定数 163.9 nM に比べ、GYKI53655 のカイニン酸受容体サブユニット GluK2/3 および GluK3 に対する親和性が低いことが関与していると考えられた。

DRG は、主にカイニン酸受容体サブユニット GluK1 が発現しているが、カイニン酸受容体サブユニット GluK1 における Q/R 調節現象のために、カイニン酸によるカルシウム透過性の反応は低い。一方で、PSPA-4 はカイニン酸とは異なり、カルシウムの透過性を上昇させるアゴニスト活性を示したため、PSPA-4 は既知のカイニン酸受容体とは異なる経路でアロディニアに関与していることが示唆され

た。
今回の結果で、PSPA-4 は、アロディニア誘発作用と抗アロディニア作用の二面性を有し、脳・脊髄でカイニン酸受容体に結合することが示唆された。一方で、PSPA-4 は、DRG においてカイニン酸とは異なる反応を示した。NMDA、AMPA 受容体に比較し、カイニン酸受容体の役割の解明は遅れているが、この結果より PSPA-4 は、アクロメリン酸 A の作用メカニズムの解明だけでなく、中枢神経および末梢神経での痛みの伝達機構の解明に寄与する可能性を秘めている。しかし、痛みの変化を可視化するには放射性同位体で標識可能な新たな化合物が必要である。

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 1 件)

Shinichiro Miyazaki, Toshiaki Minami, Hiroshi Mizuma, Masakatsu Kanazawa, Hisashi Doi, Shinji Matsumura, Jingshan Lu, Hiroataka Onoe, Kyoji Furuta, Masaaki Suzuki, Seiji Ito

The action site of the synthetic kainoid (2S,3R,4R)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4), an analogue of Japanese mushroom poison acromelic acid, for allodynia (tactile pain)

European Journal of Pharmacology、査読有、710、2013、120-127

DOI: 10.1016/j.ejphar.2012.10.023

[学会発表](計 2 件)

宮崎信一郎、アクロメリン酸誘導体を用いたオートラジオグラフィ・カルシウムイメージングによる脳・脊髄の痛みの可視化～新たな神経因性疼痛治療薬へのアプローチ～、日本麻酔科学会第 59 回学術集会、2012 年 6 月 7 日、神戸市

Shinichiro Miyazaki、The action site of the synthetic kainoid (2S,3R,4R)-3-carboxymethyl-4-(4-methylphenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-4), an analogue of Japanese mushroom poison acromelic acid, for allodynia (tactile pain)、14Th World Congress on Pain、2012 年 8 月 29 日、ミラノ市

6. 研究組織

(1)研究代表者

宮崎 信一郎 (MIYAZAKI Shinichiro)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：30411359

(2)研究分担者

森本 賢治 (MORIMOTO Kenji)

大阪医科大学・医学部・助教

研究者番号：20388250

南 敏明 (MINAMI Toshiaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：257841