

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：34401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25462456

研究課題名(和文) アクロメリン酸Aによる難治性疼痛モデルを用いた難治性疼痛のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of mechanism of neuropathic pain using acromelic acid A-induced allodynia model

研究代表者

南 敏明 (MINAMI, TOSHIAKI)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号：00257841

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：毒茸のドクササコの成分であるアクロメリン酸Aの脊髄腔内投与による早期(投与後1時間)と晚期(投与後1週間)のアロディニアの発現機序について検討し以下の知見を得た。グルタミン酸受容体-1酸化窒素経路に關与する全ての薬剤が早期のアロディニアは抑制したが、晚期のアロディニアは抑制しなかった。一方、アストロサイトを抑制するLAAの投与では晚期のアロディニアは抑制された。

以上のことより、アクロメリン酸A惹起のアロディニアの発現機構と維持機構が異なり、早期から晚期の移行期に細胞内シグナル伝達経路が変更されている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： We previously showed that intrathecal administration of acromelic acid A (ACRO-A) provoked tactile allodynia in mice. In order to clarify their involvement in ACRO-A-induced allodynia, we investigated the effects of various agents at early and late-phase allodynia. All of agents (Ca<sup>2+</sup> channel <sup>2</sup> ligands, NMDA and AMPA receptor antagonists, nNOS, and Ca<sup>2+</sup>/calmodulin kinase II inhibitors) blocked allodynia in the early-phase group; however, they did not block allodynia in the late-phase group. In order to block glial activation, astrocytic inhibitor LAA or microglia inhibitor minocycline was administrated. Microglial activation was observed 1week after ACRO-A injection and was significantly inhibited with minocycline treatment. Moreover, only LAA was found to inhibit late-phase allodynia. We demonstrate that NMDA receptor activation is involved only in ACRO-A-induced allodynia in the early phase, and that spinal astrocytic activation contributes to allodynia in the late phase.

研究分野：疼痛治療学

キーワード：神経障害性疼痛 アロディニア グルタミン酸受容体 アクロメリン酸 アストロサイト ミクログリア

### 1. 研究開始当初の背景

ドクササコ(*Clitocybe acromelalga*)は、毒茸で摂取すると4~5日後に四肢末端に灼熱痛とアロディニアが出現し、1カ月以上も持続する。神経が機械的に傷害されることやヘルペスウイルス・エイズウイルスなどによる感染以外では、ドクササコの摂取(食中毒)が唯一アロディニアを引き起こす。ドクササコの成分は、アクロメリン酸Aなどからなる。研究代表者らは、このアクロメリン酸Aに注目し、アクロメリン酸Aをマウス脊髄腔内に投与し触覚刺激を加えるとアロディニアが出現すること、アクロメリン酸Aによるアロディニアは数週間持続すること、アクロメリン酸Aは $10^{-15}$ gと非常に微量な用量でアロディニアを出現させること、アクロメリン酸Aによるアロディニアは、NSAID、オピオイドでは抑制されないことを明らかにした(**Br. J. Pharmacol. 142: 679-688, 2004.**)。さらに、アクロメリン酸Aによるアロディニアの発現機構を明らかにするため、アクロメリン酸A誘導体のフェニルスルファニル置換ピロリジンカルボン酸と、フェノキシ置換ピロリジンカルボン酸を合成し、フェノキシ置換ピロリジンカルボン酸はアロディニアを惹起させるが、フェニルスルファニル置換ピロリジンカルボン酸ではアロディニアを発現させず、アクロメリン酸Aによるアロディニアを抑制することを明らかにした。マウス脊髄腔内投与のフェニルスルファニル置換ピロリジンカルボン酸は、侵害性機械刺激、侵害性熱刺激だけではなくホルマリンテストの炎症性疼痛に対しても効果を示さない、一方、L5SNT (L5 spinal nerve transection) モデルマウスの脊髄腔内にフェニルスルファニル置換ピロリジンカルボン酸を投与すると、用量依存性に処置側の閾値を改善させた (**Eur. J. Pharmacol. 575: 75-81, 2007.**)。その成果の一部は、「神経因性疼痛を抑制するピロリジン類縁体及びその製造法」として特許出願をした (**特願 2006-157874**)。

### 2. 研究の目的

アクロメリン酸Aをマウス脊髄腔内に投与して、非侵害性触覚刺激を1週間加えることにより難治性疼痛モデルを作製することを確立した。この難治性疼痛モデルを用いて、行動薬理、免疫染色、脊髄後角・後角神経節の[Ca]<sup>2+</sup>イメージングとin vitro ARG法により、難治性疼痛のメカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

ddY-マウスの雄の脊髄腔内にアクロメリン酸A 1fgを投与し、アロディニアを惹起させた。NMDA受容体NOS系に作用すると考えられているCaチャンネル2リガンド(pregabalin, gabapentin, L-leucine, L-isoleucine)、NMDA受容体拮抗薬(MK-801)、Ca<sup>2+</sup>透過性AMPA受容体拮抗薬(JSTX)、NOS阻害薬(L-NAME)、CaMKII阻害薬(KN-92, KN-93 (KN-92はKN-93のinactive analog))を脊髄腔内にアクロメリン酸Aと同時に投与したもの(早期アロディニア)とアクロメリン酸Aの1週間後に投与したもの(晚期アロディニア)を行動学的に比較した。

アクロメリン酸A投与後1時間と1週間後の脊髄後角のnNOS活性をNADPHジアホラーゼ染色により組織化学的に比較した。

ミクログリア活性を阻害するとされているミノサイクリンをアクロメリン酸Aの脊髄腔内投与前日から4日間(前処置群)または翌日から4日間(後処置群)毎日30mg/kg腹腔内投与し、アロディニアをアクロメリン酸A投与7日目まで観察した。また、脊髄後角でのミクログリア活性をACRO-A投与1時間後(早期)と1週間後(晚期)にIba1染色により組織化学的に検討した。

アクロメリン酸Aの髄腔内投与1週間後のマウスの髄腔内にアストロサイトに特異的な毒素であるLAAを投与し、行動学的に評価した。

### 4. 研究成果

アクロメリン酸A脊髄腔内投与による早期アロディニアと晚期アロディニアの発現機序について検討した結果以下の知見を得た。

アクロメリン酸A惹起のアロディニアは、早期アロディニアと晚期アロディニアの行動学的には極めて似た反応を示しているにもかかわらず、NMDA受容体NOS系経路に関与する全ての薬剤が早期のアロディニアを抑制したが、晚期のアロディニアを抑制しなかった。

NADPHジアホラーゼ染色の染色強度を定量すると、アクロメリン酸A脊髄腔内投与1時間後には強調されていたが、1週間後には強調されていなかった。また、nNOSの活性陽性細胞数は1時間後も1週間後も変化はなかった。すなわち、アクロメリン酸Aは、早期にはnNOSを活性化するが、晚期には活性化しないと考えられる。

Iba1染色により、ミクログリアはアクロメリン酸A投与により晚期に著明に活性化された。しかし、ミノサイクリンの投与によりミクログリア活性は抑制されたにもかかわらず、アロディニアは抑制されなかった。一方、アストロサイトを抑制するLAAの投与では晚期のアロディニアは抑制された。

以上のことより、アクロメリン酸A惹起のアロディニアの発現機構と維持機構が異なり、早期から晚期の移行期に細胞内シグナル

伝達経路が変更されてい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 10 件)

1. Uchida H, Matsumura S, Okada S, Suzuki T, Minami T, Ito S.  
RNA editing enzyme ADAR2 is a mediator of neuropathic pain after peripheral nerve injury.  
FASEB J. 査読あり.  
31(5), 2017, 1847-1855.  
doi: 10.1096/fj.201600950R.
2. Kawabata K, Nishimura I, Fujiwara T, Terauchi S, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E.  
Intrathecal administration of low-dose nociceptin/orphanin FQ induces allodynia via c-Jun N-terminal kinase and monocyte chemoattractant protein-1.  
Eur J Neurosci. 査読あり.  
43(11), 2016, 1499-1508.  
doi: 10.1111/ejn.13247.
3. Okamoto K, Ohashi M, Ohno K, Takeuchi A, Matsuoka E, Fujisato K, Minami T, Ito S, Okuda-Ashitaka E.  
Involvement of NIPSNAP1, a neuropeptide nocistatin-interacting protein, in inflammatory pain.  
Mol Pain. 査読あり.  
12, 2016.  
pii: 1744806916637699.  
doi: 10.1177/1744806916637699.
4. Tu NH, Katano T, Matsumura S, Pham VM, Muratani T, Minami T, Ito S.  
Role of c-Jun N-terminal kinase in late nerve regeneration monitored by in vivo imaging of thy1-yellow fluorescent protein transgenic mice.  
Eur J Neurosci. 査読あり.  
43(4), 2016, 548-60.  
doi: 10.1111/ejn.13139.
5. Omoto H, Matsumura S, Kitano M, Miyazaki S, Minami T, Ito S.  
Comparison of mechanisms of allodynia induced by acromelic acid A between early and late phases.  
Eur J Pharmacol. 査読あり.  
760, 2015, 42-48.  
doi: 10.1016/j.ejphar.2015.03.075.
6. 南 敏明, 中尾謙太  
痛み治療と心療内科  
日本心療内科学会誌. 査読あり.  
19, 2015, 178-184.
7. 間嶋 望, 南 敏明  
その他の抗痙攣薬の薬物相互作用  
ペインクリニック. 査読なし.  
35, 2014, S491-S502.
8. Tay AS, Liu EH, Lee TL, Miyazaki S, Nishimura W, Minami T, Chan YH, Low CM, Tachibana S.  
Cerebrospinal fluid of postherpetic neuralgia patients induced interleukin-6 release in human glial cell-line T98G.  
Neurochem Int. 査読あり.  
63(5), 2013, 517-521.  
doi: 10.1016/j.neuint.2013.08.007.
9. Miyazaki S, Minami T, Mizuma H, Kanazawa M, Doi H, Matsumura S, Lu J, Onoe H, Furuta K, Suzuki M, Ito S.  
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).  
Eur J Pharmacol. 査読あり.  
710(1-3), 2013, 120-127.  
doi: 10.1016/j.ejphar.2012.10.023.
10. 南 敏明, 間嶋 望, 中平淳子

## プロスタグランジンと痛み

Anesthesia 21 Century 査読なし.  
15, 2013, 2986-2993.

### 〔学会発表〕(計 6 件)

1. Kitano M, Komasa N, Jin D, Nakao K, Matsunami S, Takai S, Minami T.  
Chymase inhibitor TY51469 alleviates cancer pain in mice bone metastasis model.  
16<sup>th</sup> World Congress on Pain.  
26-30 September 2016, Yokohama.
2. Nakao K, Komasa N, Kitano M, Nakao K, Matsunami S, Takai S, Minami T.  
Yoku-kan-san alleviates cancer pain by suppressing MMP-9 in mice bone metastasis model.  
16<sup>th</sup> World Congress of Anaesthesiologists.  
28 August-2 September 2016, Hong Kong.
3. 南 敏明.  
慢性疼痛に対する非オピオイド性鎮痛薬の使用法.  
日本ペインクリニック学会第 50 回大会.  
2016 年 7 月 7-9 日, 横浜.
4. 中尾謙太, 駒澤伸泰, 北埜 学, 松波小百合, 高井真司, 南 敏明.  
マウスがん性痛モデルにおける抑肝散の有効性の評価.  
日本麻酔科学会第 63 回学術集会.  
2016 年 5 月 26-28 日, 福岡.
5. 北埜 学, 駒澤伸泰, 中尾謙太, 松波小百合, 高井真司, 南 敏明.  
マウスがん性痛モデルにおけるキマーゼ阻害薬の鎮痛効果.  
日本麻酔科学会第 63 回学術集会.  
2016 年 5 月 26-28 日, 福岡.
6. 尾本 遥, 南 敏明., 松村伸治, 宮崎信一郎, 伊藤誠二.  
アクロメリン酸 A による早期と晩期のアロディニアの比較.  
日本麻酔科学会第 60 回学術集会.  
2013 年 5 月 23-25 日, 札幌.

### 〔図書〕(計 5 件)

1. 兵田 暁, 南 敏明.  
技術情報協会.  
多発性硬化症による痛みと薬物療法.  
2015, 482-486.
2. 藤原俊介, 南 敏明.  
文光堂.  
椎間関節ブロック.  
2014, 227.
3. 南 敏明.  
文光堂.  
痛みの受容器-化学刺激.  
2014, 24.
4. 宮崎信一郎, 南 敏明.  
文光堂.  
痛み治療には薬物療法か神経ブロックか? -適応, 有効性を考えて -.  
2013, 314-315.
5. 西村 渉, 南 敏明.  
文光堂.  
遷延性術後痛の病態と予防法.  
2013, 238-242.

### 〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.osaka-med.ac.jp/deps/ane/Ane-index-J.html>

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

南 敏明 (MINAMI Toshiaki)

大阪医科大学・医学部・教授

研究者番号: 00257841

#### (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

(平成 26 年 4 月 16 日まで研究分担者)

#### (3) 研究分担者

藤原 俊介 (FUJIWARA Shunsuke)

大阪医科大学・医学部・講師  
研究者番号： 60535813

(4)研究分担者

中平 淳子 (NAKAHIRA Junko)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 30465603  
(平成 26 年 4 月 16 日から研究分担者)

(5)研究分担者

駒澤 伸泰 (KOMASAWA Nobuyasu)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号： 20529226  
(平成 26 年 4 月 16 日から研究分担者)

(6)連携研究者

古田 享史 (FURUTA Kyoji)  
岐阜大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号： 40173538