

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893140

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛におけるボツリヌス毒素の鎮痛効果メカニズムの検討

研究課題名(英文) Analgesic mechanism of Botulinum toxin in neuropathic pain

研究代表者

丸濱 功太郎 (Maruhama, Kotaro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60712792

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：ラットの培養三叉神経節細胞、またラット頬髭中央部に蛍光標識したBoNT/A重鎖をそれぞれ加え、三叉神経節細胞におけるBoNT/Aの局在をそれぞれ共焦点レーザー顕微鏡装置にて観察した。その結果、培養三叉神経節細胞内に標識蛍光の局在が観察された。また三叉神経節細胞内に末梢に投与した標識蛍光の局在が観察された。さらに軸索輸送阻害剤であるコルヒチン前投与により、三叉神経節細胞内の標識蛍光輝度が有意に低下した。よって、軸索により輸送されたBoNT/Aが、一次求心ニューロン細胞体の存在する神経節に到達し、神経伝達物質遊離を抑制する可能性を示唆することが理解できた。

研究成果の概要(英文)：BoNT/A heavy chain (Hc) was labeled with Thiol-Reactive Probes (Alexa-488) and injected into the dissociated rat trigeminal ganglion somata and the rat facial skin. Localization of BoNT/A-Hc was monitored in trigeminal ganglion neurons by confocal laser scanning microscopy. BoNT/A-Hc was taken up by trigeminal ganglion neurons. This uptake was inhibited by colchicine treatment, which blocks axonal transport. Our data suggest that retrograde axonal transport of BoNT/A to sensory ganglion occurs following peripheral administration.

研究分野：医歯薬学

キーワード：ボツリヌス毒素 神経伝達物質 三叉神経 神経障害性疼痛 軸索輸送

## 1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛は、既存の鎮痛薬が十分に奏功しない難治性疼痛として臨床で大きな問題となっている。しかしながら、従来から治療に用いられる抗てんかん薬や抗うつ薬は、めまいなどの中枢性副作用が強く、継続服用不可能である患者も少なくない。

中枢性副作用が少なく疼痛を軽減する治療法の一つの戦略として末梢知覚神経節が注目されている。慢性疼痛モデルにおいて、末梢知覚神経節では神経興奮と神経伝達物質の遊離が増加しており、シナプスが存在しないにも関わらず近傍の知覚ニューロン同士で伝達物質を介した疼痛情報の伝達が報告されている (Devor et al. J Neurophysiol 1990)。

このように神経障害性疼痛のメカニズムが、この知覚神経節の興奮と異所性の神経伝達物質遊離の亢進に関連するならば、知覚神経節における神経伝達物質の遊離を抑制することにより、中枢性副作用のない新しい神経障害性疼痛の治療法となる可能性がある。

申請者はこれまで、精製した A 型ボツリヌス毒素 (BoNT/A) を三叉神経障害性疼痛モデルラットの末梢皮膚に投与することにより、三叉神経節での神経伝達物質の遊離が減少し、鎮痛効果が得られることを明らかにした (Kitamura et al. Neuroscience 2009、Kumada et al. J Oral Rehabil 2012)。このことは、末梢に投与された BoNT/A が神経内を逆行性に軸索輸送される可能性を示唆するが、まだ直接的な証拠は得られていない。

## 2. 研究の目的

三叉神経障害性疼痛モデルラットにおいて、独自の方法で高度に精製した A 型ボツリヌス神経毒素 (BoNT/A) が鎮痛作用を示すことを明らかにしたが、その作用機序は未だ明らかにはなっていない。本課題では、頭頸部領域における慢性疼痛の一つである神経障害性疼痛に対するボツリヌス療法をエビデンスに基づいた治療法として確立するため、三叉神経における BoNT/A の鎮痛効果の分子メカニズムを解析する。

## 3. 研究の方法

BoNT/A の細胞膜タンパク質への結合部位である重鎖に蛍光標識を付与し、BoNT/A 重鎖を培養した三叉神経節細胞に投与する。また BoNT/A 重鎖を末梢組織に投与したラットから三叉神経節細胞を摘出する。以上、二つのモデルにおいて BoNT/A の三叉神経節細胞における局在をそれぞれ共焦点レーザー顕微鏡装置にて観察する。また、軸索輸送阻害剤であるコルヒチンを用いて、BoNT/A の軸索輸送を観察する (図 1)。

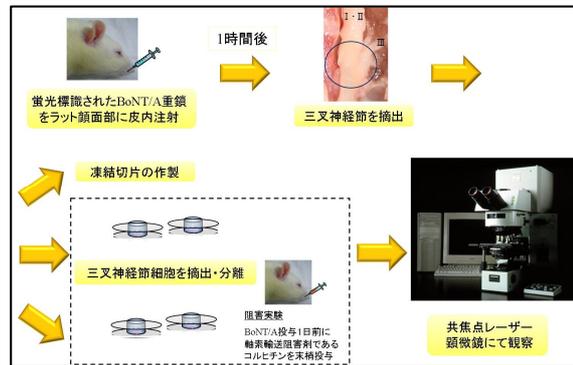


図 1. 実験手順

## 4. 研究成果

培養三叉神経節細胞へ蛍光標識された BoNT/A 重鎖を投与することにより、三叉神経節細胞細胞質内に標識蛍光の局在が観察された (図 2)。

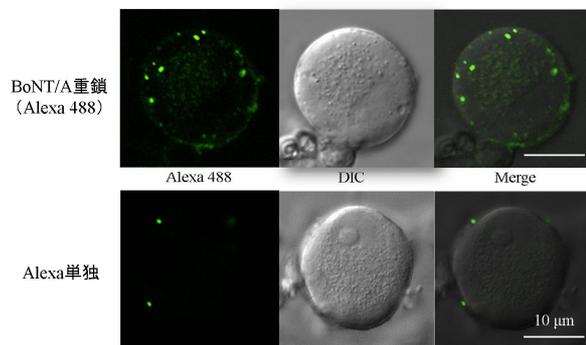


図 2. 培養三叉神経節細胞

末梢に投与した蛍光標識された BoNT/A 重鎖が、摘出した三叉神経節細胞細胞質内に標識蛍光の局在が観察された。さらに軸索輸送阻害剤であるコルヒチン前投与により、先ほど観察された三叉神経節細胞内の標識蛍光輝度が有意に低下した (図 3・4)。

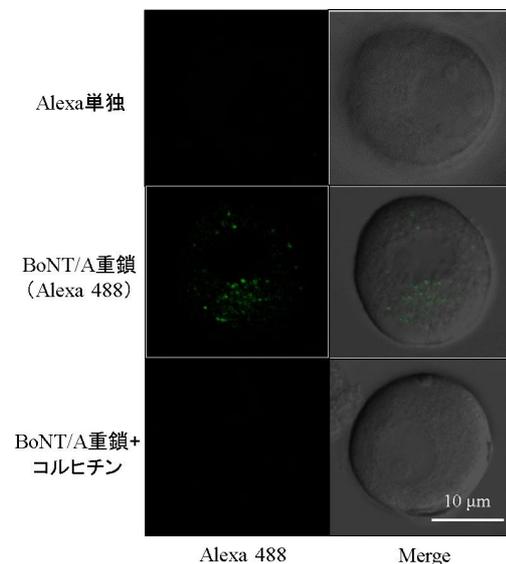


図 3. 三叉神経節細胞

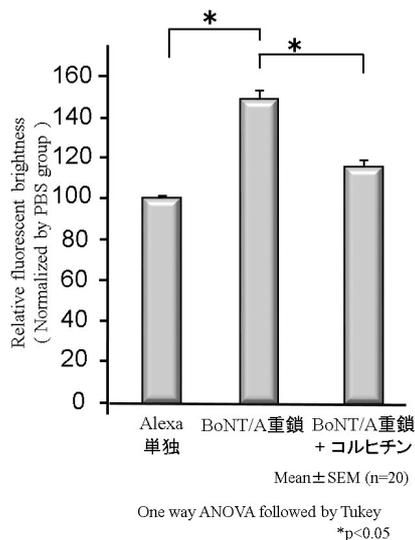


図4. 三叉神経節細胞内の蛍光輝度

よって、軸索により輸送された BoNT/A が、一次求心性ニューロン細胞体の存在する神経節に到達し、神経伝達物質遊離を抑制する可能性を示唆することが理解できた。

ただし、BoNT/A が末梢知覚神経節にとどまらず脊髄など上位中枢へ移行している可能性もあること、そして実際どのような神経情報伝達を制御しているかなど詳細については不明な点が多いこともあり、今後の検討課題である。

#### 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2件)

Terayama R, Kishimoto N, Yamamoto Y, Maruhama K, Tsuchiya H, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T. Convergent nociceptive input to spinal dorsal horn neurons after peripheral nerve injury. *Neurochemical research*, 査読有, 40:438-445, 2015.  
DOI: 10.1007/s11064-014-1484-y

Terayama R, Maruhama K, Tsuchiya H, Mizutani M, Iida S, Sugimoto T. Assessment of intraoral mucosal pain induced by the application of capsaicin. *Archives of Oral Biology*, 査読有, 59:1334-1341, 2014.  
DOI: 10.1016/j.archoralbio.2014.08.008

##### [学会発表](計7件)

松香芳三, 丸濱功太郎, 山本由弥子, 小熊恵二, 松下治. ボツリヌス毒素を利用した神経障害性疼痛治療. 日本細

菌学会総会, 2015.3.26, 長良川国際会議場(岐阜県)

K. Omoto, K. Maruhama, Y. Suzuki, K. Okura, Y. Matsuka. Relationship Between Neurotransmitter release within sensory ganglia and pain transmission. International Association for Dental Research, 2015.3.13, Hynes Convention Center (Massachusetts, U.S.A)

Katsuhiro Omoto, Kotaro Maruhama, Tomosada Sugimoto, Yoshizo Matsuka. Neural excitation with positron emission tomography after tooth mechanical stimulation. Society for Neuroscience 2014, 2014.11.18, Washington convention center (Washington DC, U.S.A)

大本勝弘, 丸濱功太郎, 田中紗友里, 大倉一夫, 杉本朋貞, 松香芳三. 末梢知覚神経節における神経伝達物質遊離抑制による情報伝達の変化. 日本口腔顔面痛学会学術大会, 2014.11.2, 東京医科歯科大学(東京都)

山本由弥子, 丸濱功太郎, 松香芳三, 美間健彦, 後藤和義, 横田憲治, 松下治, 小熊恵二. 末梢投与された A 型ボツリヌス神経毒素の三叉神経における局在と軸索輸送. 日本細菌学会中国・四国支部総会, 2014.10.5, 徳島文理大学薬学部(徳島県)

Kotaro Maruhama, Yoshizo Matsuka, Yumiko Yamamoto, Ryuji Terayama, Tomosada Sugimoto. The axonal transport and analgesic effect of newly developed Botulinum neurotoxin type A. *Neuroscience* 2014, 2014.9.11, パシフィコ横浜(神奈川県)

田中紗友里, 大本勝弘, 丸濱功太郎, 松香芳三. 末梢知覚神経節における神経伝達物質遊離抑制と鎮痛効果. 日本補綴歯科学会中国・四国支部学術大会, 2014.9.7, 倉敷芸文館(岡山県)

##### [図書](計0件)

##### [産業財産権]

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸濱 功太郎 (MARUHAMA KOTARO)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助  
教  
研究者番号：60712792