

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：24701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670684

研究課題名(和文) 刺激特異説に基づき神経線維をターゲットとした新たな痛み治療法の開発

研究課題名(英文) New pain therapy targeting primary afferents based on labelled line theory

## 研究代表者

川股 知之(Kawamata, Tomoyuki)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：80336388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、1本の神経で機械刺激・熱刺激・化学刺激などの複数の刺激による痛みを感知すると考えられてきた。最近、マウスでは異なる痛み刺激は異なる末梢神経を活性化させる可能性が示唆されている(labeled line theory)。本研究では、各種痛みモデルでlabeled line theoryを検証し、分子ではなく特定の神経線維をターゲットする全く新たな鎮痛法開発を目的とした。本研究により、術後痛モデルや炎症痛モデルで観察される熱性痛覚過敏はTRPV1陽性神経によって、機械性痛覚過敏はIB4結合神経によって感知されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Since many pain-sensing afferents can respond to several modalities including heat, mechanical, and chemical stimuli, they have been considered to be polymodal. However, recently, it has been reported that mice sense pain according to the labeled line theory that a specific stimulus activate a particular primary afferent. the purpose of the current study was to examine whether pathophysiological pain was transmitted according to the labeled line theory in mice. The results of the study showed that TRPV1-positive afferents were selectively involved in incision- and inflammation-induced thermal hyperalgesia, while IB4-binding afferents were selectively involved in mechanical hyperalgesia. These results can lead to a new strategy for relieving pathophysiological pain.

研究分野：麻酔学・疼痛学

キーワード：末梢神経 痛覚過敏 熱 機械

## 1. 研究開始当初の背景

痛み、かゆみ、触覚などの異なる体性感覚はそれぞれ異なる末梢神経によって伝達され (labeled line theory) 中枢レベルで互いに修飾し合って、最終的に脳で認知される。痛みは、熱・機械・化学刺激などによって惹起されるが、ヒトはこれらの痛みをどのように識別しているのだろうか? これまでの有力な説はパターン説である。痛みを感知・伝達する末梢神経はポリモーダルであり、1本の神経で熱・機械・化学刺激による痛みを感知するが、刺激によって神経の活動パターンが異なり、その違いによって痛みの種類を認識するという考え方である(1)。しかしながら、最近、特定の末梢神経が特定の痛み刺激を選択的に感知・伝達する labeled line theory が一部の痛みで合致することが報告されている(2)。また、申請者もこれまでの研究で、がん疼痛モデル動物で観察される自発痛がカプサイシン受容体 (TRPV1) 陽性神経の選択的脱落によって完全に消失すること、すなわち、自発痛関連行動が TRPV1 陽性神経によって選択的に伝達されていることを見いだした(3)。しかしながら、臨床上問題となる病的な痛みが特定の末梢神経を活性化し伝達されるかは明らかではない。もし、病的な痛みが特定の末梢神経によって感知・伝達されるならば、神経線維をターゲットとした新しい痛み治療法が開発される可能性がある。

## 2. 研究の目的

本研究では、“臨床上問題となる種々の病的な痛みが同様に labeled line theory に合致するか”を各種痛み動物モデルを用いて明らか

かにする。さらに、痛みのモダリティと末梢神経の神経化学的特徴の対応について明らかにする。そして新たな治療法開発の基盤とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 選択的末梢神経脱落マウスの作成

雄性 C57BL/6 (5-6 週齢) を使用した。無髓神経はペプチド含有神経と非含有神経に分類される。ペプチド非含有無髓神経のマーカーは IB4 であり、神経毒であるサポリンを IB4 と結合させた IB4 サポリンを投与することにより選択的に脱落させることができる。ペプチド含有無髓神経の中には TRPV1 陽性神経が含まれ、カプサイシン投与によって選択的に脱落させることができる。そこで、全身麻酔下に、カプサイシンをくも膜下投与、もしくは、IB4 サポリンを坐骨神経内投与することにより、TRPV1 陽性神経脱落マウスおよび IB4 陽性神経脱落マウスを作成した。対照動物には溶媒のみ投与した。投与後、10 日間の回復期間をおいた。予備実験でこれらの化合物の投与 10 日間後には、それぞれ TRPV1 陽性神経、および IB4 結合性神経は消失し、その後、3 週間持続することを確認している。

### (2) 選択的末梢神経脱落マウスによる各種痛みモデルの作成

化合物投与 10 日間後に運動機能試験、熱および機械刺激に対する逃避潜時と逃避閾値を測定した後に、炎症性痛モデル、神経障害性痛モデル、または皮膚切開痛モデルを作成した。

### (3) 行動評価

痛みモデルの作成後、経時的に行動試験を行った。行動試験として、熱に対する逃避潜時、

Von Frey filament (VFF) に対する逃避閾値、自発痛関連行動（フリッピング、なめ行動）を測定記録した。

(4) 免疫組織学的評価

経時的な行動試験終了後、4%パラフィルムアルデヒドで灌流固定し、脊髄組織を採取した。TRPV1 抗体および IB4 を用いて、脊髄での TRPV1 陽性神経の発現と IB4 結合神経の発現及び消失を評価した。

(5) 網羅的遺伝子発現解析

IB4 陽性神経脱落マウスと対照マウスの後根神経節を採集し、網羅的遺伝子発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) 選択的末梢神経脱落マウスの行動評価

TRPV1 陽性神経脱落マウスおよび IB4 陽性神経脱落マウスともに、歩行や姿勢反射には異常なかった。IB4 陽性神経脱落マウスは、侵害熱刺激に対する逃避潜時、VFF に対する逃避閾値は対照マウスと同様であった。一方、TRPV1 陽性神経脱落マウスでは VFF に対する逃避閾値は対照マウスと同様であったが、侵害熱刺激に対する逃避潜時は対照マウスに比べ有意に延長した。行動評価後、TRPV1 陽性神経脱落マウスおよび IB4 陽性神経脱落マ

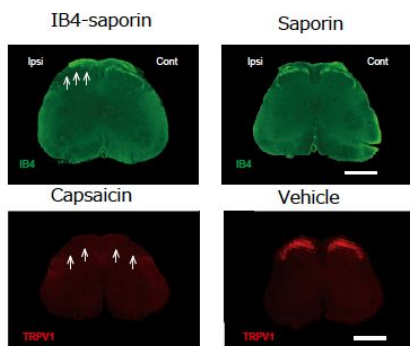


図 1. 神経毒の効果

上) IB4結合神経発現に対するIB4サポリンの効果  
 : IB4サポリン投与側でIB4結合神経が脱落している  
 下) TRPV1陽性神経発現に対するcapsaicinの効果  
 : capsaicin投与マウスではTRPV1陽性神経が脱落している

ウスでの TRPV1 陽性神経の発現と IB4 結合神経を評価したが、それぞれ TRPV1 陽性神経の発現と IB4 結合神経の脱落が観察された (図 1)。

(2) 皮膚切開痛モデルマウスの解析

対照マウスでは、皮膚切開により熱性痛覚過敏と機械性痛覚過敏が惹起された。TRPV1 陽性神経脱落マウスでは、機械性痛覚過敏は対照マウスと同様であったが、熱性痛覚過敏は生じなかった。一方、IB4 陽性神経脱落マウスでは、熱性痛覚過敏は対照マウスと同様であったが、機械性痛覚過敏は生じなかった (図 2)。

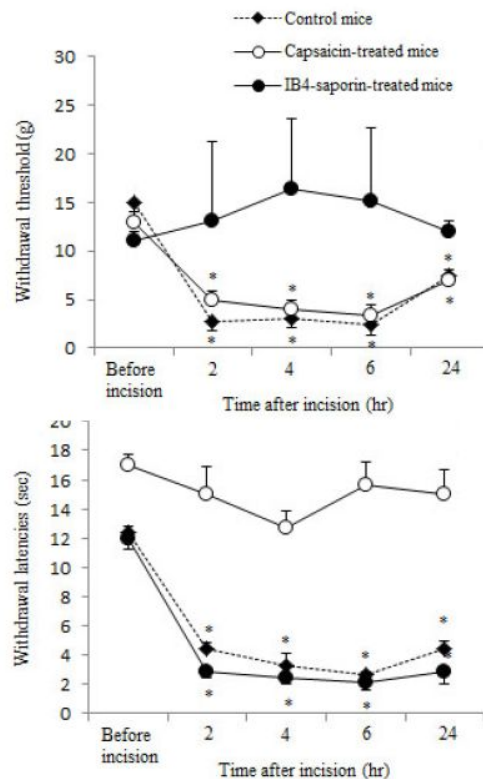


図 2. 皮膚切開痛モデルでの行動解析  
 上) VFF に対する逃避閾値  
 下) 熱に対する逃避潜時

(3) 炎症痛モデルマウスの解析

対照マウスでは、CFA の足底皮下投与により熱性痛覚過敏と機械性痛覚過敏が惹起された。TRPV1 陽性神経脱落マウスでは、機械性

痛覚過敏は対照マウスと同様であったが、熱性痛覚過敏は生じなかった（図3）。一方、IB4 陽性神経脱落マウスでは、熱性痛覚過敏は対照マウスと同様であったが、機械性痛覚過敏は生じなかった（図4）。

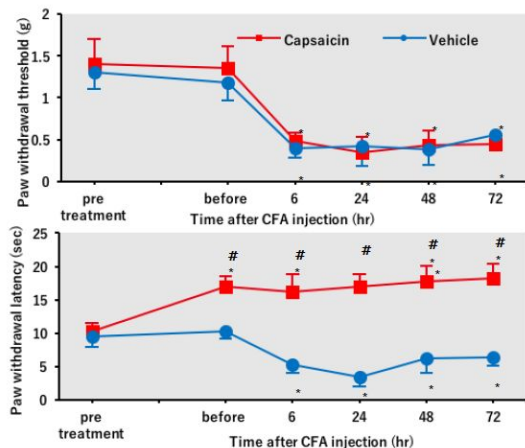


図3. 炎症痛に対するTRPV1陽性神経の関与  
上) VFFに対する逃避閾値  
下) 熱に対する逃避潜時

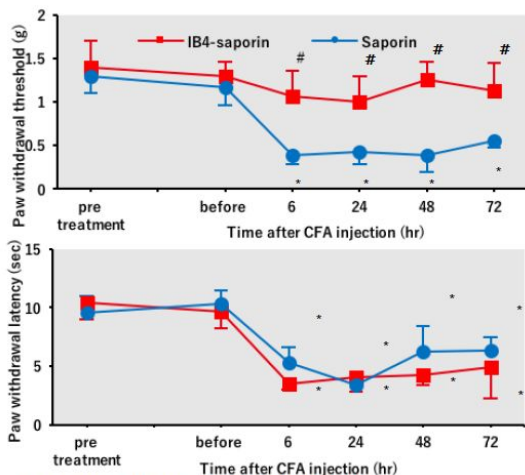


図4. 炎症痛に対するIB4結合神経の関与  
上) VFFに対する逃避閾値  
下) 熱に対する逃避潜時

#### (4) 神経障害性痛モデルマウスの解析

神経障害性痛モデルとして、spared nerve injury モデルを作成した。本モデルでは、熱性痛覚過敏は顕著でないため、機械性痛覚過敏について検討した。その結果、TRPV1 陽性神経脱落マウス、IB4 陽性神経脱落マウスともに対照マウスと同様に機械性痛覚過敏が惹起された

#### (5) 網羅的遺伝子発現解析

IB4 陽性神経脱落マウスと対照マウスの後根神経節を採集し、網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、発現が2倍以上異なる興味ある2つの遺伝子が得られた。

以上により、TRPV1 陽性神経は炎症および皮膚切開による熱性痛覚過敏の伝達を、IB4 結合神経は炎症および皮膚切開による機械性痛覚過敏の伝達を担っていることが明らかとなった。一方で、神経障害性痛による機械性痛覚過敏には TRPV1 陽性神経も IB4 結合神経も関与していないことが明らかとなった。したがって、これらの神経線維をターゲットとすることにより痛みの modality 特異的に鎮痛が可能となることが示唆された。また、IB4 陽性神経脱落マウスと対照マウスの後根神経節の網羅的遺伝子発現解析から興味ある2つの遺伝子が得られ、炎症および皮膚切開による機械性痛覚過敏に関与する分子であることが推測された。

#### <引用文献>

1. PerI ER. Nat Rev Neurosci 2007
2. Cavanaugh DJ et al., PNAS 2009
3. Fuseya S, Kawamata T et al., A1616, ASA 2011

#### 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. Fuseya S, Yamamoto K, Minemura H, Yamamori S, Kawamata T, Kawamata M. Systemic QX-314 reduces bone cancer r pain through selective inhibiti

n of transient receptor potential vanilloid subfamily 1-expressing primary afferents in mice. *Anesthesiology* 2016 (in press)

DOI:10.1097/ALN.0000000000001152

(査読あり)

2. Tanaka H, Kawamata T, Nose H, Genn o H, Kawamata M. Evaluation of physical activity of anesthesiologists in the operating room during daily working using a triaxial accelerometer. *Arch Environ Occup H* 2015;70:77-80.

DOI: 10.1080/19338244.2013.778809

(査読あり)

3. Abe Y, Iba K, Sasaki K, Chiba H, Kanaya K, Kawamata T, Oda K, Amizuka N, Sasaki M, Yamashita T. Inhibitory effect of bisphosphonate on osteoclast function contributes to improved skeletal pain in ovariectomized mice. *J Bone Miner Metab* 2015; 33:125-34

DOI: 10.1007/s00774-014-0574-x

(査読あり)

4. Hirayama M, Ogata M, Kawamata T, Ishibashi H. Muscarinic receptor-mediated excitation of rat intracardiac ganglion neurons. *Neuropharmacology* 2015;95:395-404.

DOI: 10.1016/j.neuropharm.2015.04.014

(査読あり)

5. Ishida M K, Kawamata T, Tanaka S, Shindo, Kawamata M. Calcitonin gene-related peptide is involved in inflammatory pain but not in postoperative pain. *Anesthesiology* 2014; 121:1068-79

DOI:10.1097/ALN.0000000000000364

(査読あり)

〔学会発表〕(計 5件)

1. 川股知之. PCA 過去・現在・未来. 日本ペインクリニック学会第 49 回大会(大阪) 2015.7.23-25

2. 川股知之. 手術麻酔におけるオピオイドの将来. 日本麻酔科学会第 62 回学術集会(神戸) 2015.5.28-30

3. Kawashima K, Nakahata K, Tanioku T, Kawamata T: The eNOS Gene Polymorphism Is Associated With Ergometrine-Induced Myocardial Ischemia During Cesarean Delivery. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, New Orleans, USA, 2014.10.11-15

4. 川股知之: 骨がん痛のメカニズム-TRPV2 と骨がんによる体動時痛. 第 29 回日本整形外科学会 基礎学術集会(鹿児島) 2014.9.9

5. 川股知之: 末梢で痛みを sense する. 日本ペインクリニック学会第 48 回大会(東京) 2014.7.24

〔図書〕(計 11件)

1. 川股知之. ペインクリニックのための頭痛診療. 真興交易(株)医書出版部、2015、s147-54.
2. 川股知之. 第 8 巻 臨床に役立つ神経障害性痛の理解. 文光堂、2015、p75-6
3. 川股知之. 誰にでも理解できる緩和ケアの実践書. 克誠堂出版、2015、p100-7
4. 布施谷仁志、川股知之. メカニズムから読み解く 痛みの臨床テキスト. 南江堂、2015、p35-9
5. 布施谷仁志、川股知之. メカニズムから読み解く 痛みの臨床テキスト. 南江堂、2015、p40-5
6. 川股知之: ペインクリニックのための新キーワード 135. 真興交易(株)

- 医書出版部, 2014, pp64-65.
7. 川股知之:第 4 卷 腰痛のサイエンス.  
文光堂, 2014, pp50-55.
  8. 川股知之:第 5 卷 痛み診療キーポイント.文光堂, 2014, pp51.
  9. 川股知之:第 5 卷 痛み診療キーポイント.文光堂, 2014, pp160.
  10. 栗山俊之、川股知之: エペインクリニック治療においておさえておくべき薬物相互作用. 真興交易(株) 医書出版部、2014、s335-s362 .
  11. 坂本明之、川股知之: 症例で身につくがん疼痛治療薬 .羊土社、2014、pp96-8 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川股 知之 (KAWAMATA, Tomoyuki )

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 80336388

(2)研究分担者

なし