

線維筋痛症をモデルとした慢性疼痛機序の解明と治療法の確立に関する研究

研究分担者：所属機関 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科分子薬理学分野
氏名 植田 弘師

【研究要旨】

線維筋痛症は全身性に痛みが生じる難治性慢性疼痛疾患であり、現状では根本的な治療法の確立に至っていない。我々はこれまでにこの病態の病因機構解明および治療基盤確立を目指した基礎研究において本疾患モデルマウス作製に成功し、様々な疼痛の特徴を報告してきた。今年度は、本モデルを用いてこれまでに治療薬として報告しているプレガバリンを脳室内への微量連続投与することにより、もはや薬物の投与を必要としない長期的な治療効果をもたらすことを明らかにした。さらにこのプレガバリン処置回復後のマウスに対して、既存の鎮痛薬を投与しその治療効果の性格付けを行った。

A. 研究目的

本研究は線維筋痛症(FM)の病因機構解明および治療基盤の確立を目指しており、具体的には動物モデルの作成と責任分子の同定および治療薬理学的解析を行うことである。本年度は、昨年度までに確立したFMモデルを用いて、プレガバリンの局所微量投与等を用いて、責任分子の同定を行うとともに持続投与による治療効果を解析することで本疾患の治療戦略を検討する。さらに、回復後の病態マウスに対して、既存の鎮痛薬を投与し、その治療効果の性格付けを行う。

B. 研究方法

実験動物には6週齢(体重18-22g)のC57BL/6J系雄性マウスを用いた。疼痛評価法には熱刺激あるいは機械刺激誘発性疼痛試験法を用いた。線維筋痛症モデルマウスの作製

繰り返し寒冷ストレス(ICS)モデル：マウスを夜間は低温で飼育し、昼間は30分ごとに室温(24℃)と低温(4℃)に変化させる環境を2日間繰り返した。また実験期間中、夜間および日中連続して室温(24℃)で飼育したマウスを対照群とした。

薬物投与方法

ICS暴露5日後(P5)からプレガバリンを2日毎に3回(P5,P8,P11)脳室内投与(0.1-1 μg)、または、1日1回(P5-P11)で腹腔内投与(0.1-1 mg/kg)し、それぞれ薬物投与後180分までの疼痛閾値の経時的変化を隔日に測定した。また、P11以降の投与中止後についても疼痛閾値を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は長崎大学動物実験委員会(IACUC)による許可を受け、長崎大学動物実験指針および疼痛実験に対する国際委員会に定められる方法準じて実施した。(承認番号：120405号)

C. 研究結果

1. ICSモデルマウスにおける脳室内隔日繰り返しプレガバリン投与による治療評価

ICSモデルマウスに対しプレガバリンの脳室内投与(0.1-1 μg)を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、用量依存的な疼痛閾値の上昇が観察され、投与180分後においても鎮痛効果は持続していた。特に1 μg投与群に関しては4日間におよぶ長期的な鎮痛効果が観察された。さらに、鎮痛効果の持続が認められる投与3日後から2日おきに合計3回プレガバリン1 μgの脳室内投与を処置したところ(P5,P8,P11)、薬物投与前の疼痛閾値は上昇し、3回目投与後にはほぼ完全に対照群と同程度の閾値にまで回復していた。その後薬物投与を中止しても少なくとも10日間は疼痛閾値の低下は観察されることなく治療効果が持続したままであった。

2. ICSモデルにおける全身性繰り返しプレガバリン投与による鎮痛評価

ICSモデルに対しプレガバリンの腹腔内投与(0.1-1 mg/kg)を行い、経時的に疼痛閾値を測定したところ、投与30分後において用量依存的な閾値の上昇が観察され、180分後においても鎮痛効果は持続していた。しかしながら、翌日にはその鎮痛効果は観察されず、疼痛閾値は低下していた。このことはこの鎮痛効果

が一過性であることを意味しているが、7日間連続投与を行っても薬物耐性を示さず、急性の鎮痛効果が観察された

3. プレガバリン処置回復後マウスにおけるモルヒネ鎮痛評価

上記1で報告したプレガバリン脳室内隔日繰返し処置(P5,P8,P11)したICSモデルマウスに対して、腹腔内にモルヒネ(1 mg/kg)を投与し熱刺激試験法により経時的に疼痛閾値を評価したところ、モルヒネ投与による鎮痛効果は確認されなかった。一方、ICS非暴露マウスではモルヒネ投与により、投与後10分から急性の鎮痛効果が確認され投与後60分までその効果は持続していた。

D. 考察

1. ICSモデルにおける脳室内隔日繰返しプレガバリン投与による治療評価

本研究室における過去の報告で、カルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ 拮抗薬であるプレガバリンの腹腔内および脳室内投与によりICSモデルに対して強力な鎮痛作用を示すことを明らかにしている。特に、脳室内投与では1回の投与で少なくとも4日間は持続するということが明らかにしている。そのことから、疾患モデルマウスにおいてプレガバリンの作用点が上位脳に存在することが推測され、本研究ではプレガバリンを脳室内に2日おきに3回投与する実験を行ったところ、繰返しの長期的な鎮痛効果が認められ、さらに繰返し投与することで薬物投与前の疼痛閾値が上昇しICS非暴露マウスと同程度まで回復した。さらに、投与中止後も鎮痛閾値の回復効果を維持することも明らかにした。このメカニズムについては今後の課題であるが、脳室内繰返しプレガバリン投与による長期的な鎮痛効果の維持が、痛みの悪循環を断ち切ることが一因であると考えられる。

2. ICSモデルにおけるプレガバリンの鎮痛評価

ICSモデルに対してプレガバリンの全身投与を繰返し行ったところ、その急性の鎮痛効果は維持しており、薬物耐性が生じないことを明らかにした。一方、全身投与を繰返し行っても、疼痛閾値を改善する効果は認められなかった。この結果はプレガバリンが線維筋痛症治療薬として繰返し有効性を示すとともに、本疾患モデルマウスにおいてプレガバリンの作用点であるカルシウムチャンネル $\alpha 2\delta$ 分子の制御異常が長期的に生じていることを明らかにした。今後は、作用機序解明のためにカルシウムチャンネル関連遺伝子群の定量解析

や責任分子および責任領域の特定が課題となる。

3. 脳室内隔日繰返しプレガバリン処置後ICSマウスにおけるモルヒネの鎮痛評価

これまでに本研究室では、ICSモデルマウスでは2週間以上続く長期的かつ全身性の疼痛過敏を示すとともに麻薬性鎮痛薬であるモルヒネに対し鎮痛効果を示さないオピオイド抵抗性を示すことを報告している。そこで、プレガバリンにより疼痛閾値の回復したマウスに対し、そのモルヒネ鎮痛効果を検討した。その結果、プレガバリン処置マウスではモルヒネ抵抗性は改善しないことが明らかとなった。このことは、プレガバリンによる長期的な治療効果が内在性オピオイド系を介するとされる下行性抑制系とは独立したものである可能性を示唆している。

E. 結論

本年度では、まず線維筋痛症に対する鎮痛薬として使用されているプレガバリンの局所および繰返し投与による治療効果をICSモデルにおいて検討したところ、脳室内に隔日繰返し投与することで疼痛閾値が完全に回復する治療効果を見出した。また、腹腔内繰返し投与においては一過性の鎮痛効果は得られたものの回復効果は認められなかった。さらに、プレガバリン処置回復後のICSマウスではモルヒネ抵抗性を引き続き示すことをから、プレガバリン治療効果は上位脳における下行性抑制系とは、独立した鎮痛系の存在を示唆する結果が得られた。本研究は、これまで不明であった線維筋痛症に対する発症および治療メカニズムの解明に関して分子基盤となる研究である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1)Ma L, Nagai J, Sekino Y, Goto Y, Nakahira S, Ueda H: Single application of A2 NTX, a botulinum toxin A2 subunit, prevents chronic pain over long periods in both diabetic and spinal cord injury-induced neuropathic pain models. *J Pharmacol Sci.* 119(3):282-286,2012

2)Halder SK, Matsunaga H, Ueda H:Neuron-specific non-classical release of prothymosin alpha: a novel neuroprotective

damage-associated molecular patterns.

J Neurochem. 123(2):262-75,2012

3) Halder SK, Yano R, Jerold Chun, **Ueda H**: Involvement of LPA1 receptor signaling in cerebral ischemia-induced neuropathic pain. *Neuroscience.* (in press)

4) **植田弘師**、松下洋輔: 神経障害性痛の責任分子と治療創薬について. **ペインクリニック** 33(7):911-922, 2012

5) **Ueda H**, Matsunaga H, Halder, SK: Prothymosin plays multifunctional cell robustness roles in genomic, epigenetic, and nongenomic mechanisms. *Ann N Y Acad Sci.* 1269(1):34-43, 2012

6) **Ueda H**, Matsunaga H, Olaposi Omotuyi I, Nagai J: Lysophosphatidic acid: Chemical signature of neuropathic pain. *Biochim Biophys Acta.* 1831(1):61-73, 2013

7) **植田弘師**、永井潤: 神経障害性疼痛における生理活性脂質LPAの生合成機構および病態機能、**ペインクリニック**33(11): 1575-1583, 2012

8) 植田弘師、永井潤: 慢性疼痛創薬標的としてのリゾホスファチジン酸、**遺伝子医学MOOK**24号, 2013 (*in press*)

2. 学会発表

1) 永井潤、**植田弘師**: JNK/c-jun シグナル伝達を介するリゾホスファチジン酸誘発性脱髄機構、第54回日本脂質生化学会、2012年6月8日(福岡)

2) **植田弘師**: 慢性痛動物モデルにおけるLPAを介する痛みのメカニズムと痛み治療のしくみ、日本ペインクリニック学会第46回大会、2012年7月7日(島根)

3) 矢野亮、**植田弘師**: パクリタキセル誘発性神経障害性疼痛におけるリゾホスファチジン酸の役割、第34回日本疼痛学会、2012年7月20日(熊本)

4) 迎武紘、荒木康平、**植田弘師**: 脳室内プレガバリンおよび全身性ドネペジルの繰り返し投与が線維筋痛症モデルマウスの慢性疼痛を完治させる、第34回日本疼痛学会、2012年7月20日(熊本)

5) 荒木康平、迎武紘、**植田弘師**: ミルタザピンの繰り返し投与が線維筋痛症モデルマウスの慢性疼痛を完治させる、第34回日本疼痛学会、2012年7月21日(熊本)

6) 住谷昌彦、池田和隆、**植田弘師**、厚生労働省 TR-CancerPain 班: がん性疼痛患者の疼痛強度には P2Y12 需要遺伝子多型が関与する、第34回日本疼痛学会、2012年7月21日(熊本)

7) **Ueda H**: Epigenetic silencing of sodium channel, TRP channels and opioid receptor in neuropathic pain. Milan 2012 14th WORLD CONGRESS ON PAIN, Topical Workshop, Aug 28, 2012 (Milan, Italy).

8) **Ueda H**, Nishiyori M, Araki K, Mukae T: Repeated challenges of systemic mirtazapine cause permanent pain relief in mouse experimental fibromyalgia model. Milan 2012 14th WORLD CONGRESS ON PAIN, Poster Session, Aug 31, 2012 (Milan, Italy).

9) Mukae T, **Ueda H**: Repeated challenges of donepezil cause permanent pain relief in mouse experimental fibromyalgia model. Milan 2012 14th WORLD CONGRESS ON PAIN, Poster Session, Aug 31, 2012 (Milan, Italy).

10) 西依倫子、迎武弘、**植田弘師**: 繰り返しストレスモデルと薬物治療、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、シンポジウム、2012年9月15日(長崎)

11) **植田弘師**: 慢性疼痛のしくみ: 神経障害性疼痛から線維筋痛症まで、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、会長講演、2012年9月15日(長崎)

12) **植田弘師**: 線維筋痛症動物モデルにおける薬物治療、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、教育セミナー、2012年9月16日(長崎)

13) **植田弘師**: 慢性疼痛とバイオマーカーに関する最近の研究、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、シンポジウム、2012年9月16日(長崎)

14) 迎武紘、荒木康平、**植田弘師**: 線維筋痛症モデルマウスにおける脳室内プレガバリンおよび全身性ドネペジルの繰り返し投与による治療効果の検討、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、口頭発表、2012年9月16日(長崎)

15) 荒木康平、迎武紘、**植田弘師**: 繰り返し寒冷ストレス(ICS)モデルマウスにおける抗うつ薬ミルタザピンの繰り返し全身投与による完全治療効果、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、口頭発表、2012年9月16日(長崎)

16) 森田愛、荒木康平、迎武紘、品川綾香、西依倫子、**植田弘師**: 繰り返し寒冷ストレス(ICS)暴露による線維筋痛症病態モデルマウスの性格付けと抗うつ薬による薬理的解析、日本線維筋痛症学会 第4回学術集会、ポスタ

一発表、2012年9月15、16日(長崎)
17) Ma L, Ueda H: MALDI-TOF-MS analysis of lysophosphatidic acid production during neuropathic pain. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry, Oral Session, Oct 2, 2012 (Kobe)

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1 特許取得

1) 植田弘師

出願番号:(国際)PCT/JP2012/062776

発明者:植田弘師

発明の名称:神経変性疾患モデル非ヒト哺乳動物

出願人:長崎大学

出願日:2012年5月25日

2) 植田弘師

出願番号:特願2012-262007

発明者:植田弘師

発明の名称:血液脳関門障害改善剤

出願人:長崎大学

出願日:2012年11月30日

3) 植田弘師

出願番号:特願2012-267599

発明者:植田弘師

発明の名称:線維筋痛症の予防または治療薬

出願人:長崎大学

出願日:2012年12月6日

4) 植田弘師

出願番号:(国際)PCT/JP2013/051547

発明者:植田弘師

発明の名称:ドネベジルを含む線維筋痛症の治療剤

出願人:長崎大学

出願日:2013年1月25日

5) 植田弘師

出願番号:13/756,247

発明者:植田弘師

発明の名称:HB-EGF欠損トランスジェニック動物及びその作製方法

出願人:長崎大学

出願日:2013年1月31日

6) 植田弘師

出願番号:(国際)PCT/JP2013/053436

発明者:植田弘師

発明の名称:血液脳関門障害改善剤

出願人:長崎大学

出願日:2013年2月13日

2 実用新案登録

なし

3 その他

なし