

氏名（本籍）	新倉慶一	（神奈川県）
学位の種類	博士(薬学)	
学位記番号	甲第122号	
学位授与年月日	平成20年3月15日	
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当者	
学位論文の題名	Implication of β -endorphin released by activation of ascending pain pathways in attenuation of opioid reward in neuropathic pain states	
論文審査委員	主査	教授 鈴木 勉
	副査	教授 瀬山 義幸
	副査	教授 亀井 淳三

論文内容の要旨

緒言 神経障害性疼痛の原因となる疾患には、帯状疱疹後神経痛、糖尿病性ニューロパチー、進行がんなど様々な原因が挙げられるが、神経障害性疼痛の発症ならびにその維持機構は、非常に複雑なものであることが想定されている。神経障害性疼痛の発症メカニズムについては、様々な細胞内情報伝達系の関与が報告されており、なかでも、中枢神経系の細胞内情報伝達機構において多彩な役割を果たしている protein kinase C (PKC) が、神経障害性疼痛の発現および維持に非常に深く関与していることが報告されている。また、近年、血管内皮細胞や平滑筋細胞の発生、分化ならびに形態形成に関与する因子の同定が飛躍的に進み、そのシグナル伝達や機能が明らかとなってきた。血液中に存在する血液凝固因子の一つである thrombin や成長/増殖因子の一つである platelet-derived growth factor (PDGF) が、生体内における血管形成のみならず、創傷治癒、炎症反応ならびにがんにおける血管新生にも関与することが報告されている。一方、疼痛伝達に重要な役割を担う脊髄において、thrombin の受容体である protease-activated receptor (PAR) や PDGF 受容体が発現していること、また PAR が炎症性疼痛発現に関与することが示唆されていることから、thrombin や PDGF といった血液中に存在する因子が慢性疼痛発現に関与している可能性が推察される。しかしながら、慢性疼痛の中でも神経損傷に起因する神経障害性疼痛発現における脊髄の thrombin ならびに PDGF の役割については、未だ詳細に検討されていないのが現状である。そこで本研究では、神経障害性疼痛モデルを用い、神経障害性疼痛形成における脊髄内 PDGF/PAR 経路、さらにはこの経路と PKC γ の関わりについて詳細に検討した。

一方、痛みは人が生存していく中で必要不可欠な警告系であるが、痛みが慢性化すると、不安や抑うつ、さらには QOL の低下を引き起こすことが、臨床的に数多く報告されている。痛みは、末梢から入力した疼痛情報が一次知覚神経を通り、脊髄を介して、視床、大脳皮質へと伝達されることにより認知される。そのため末梢からの痛み刺激が上位中枢である脳の機能に影響を与えることで疼痛反応を複雑に修飾し、痛みの慢性化ならびに情動障害を惹起している可能性が考えられる。また、慢性疼痛およびがん疼痛といった強

度の疼痛治療に用いられている morphine は、1986 年に WHO 方式“がん疼痛治療法”が発表されて以来、わが国の臨床における使用量は年々増加の一途をたどっているものの、他の先進諸国と比べ、日本における morphine の使用量は少なく、除痛率も思うように向上していないのが現状である。この原因として、患者、その家族ならびに医療従事者自身に morphine の依存形成に対する懸念があり、morphine の使用を躊躇してしまうことが考えられる。しかしながら、morphine は、がん疼痛などの慢性疼痛緩和のために適正使用された場合、精神依存が問題にならないことが明らかとなっている。また基礎研究においても、慢性疼痛下では morphine による精神依存が形成されないことが報告されており、神経障害性疼痛下における morphine 精神依存不形成機構には、中脳辺縁ドパミン神経系の起始核である腹側被蓋野における μ -オピオイド受容体の機能変化が一部関与していることが明らかにされている。この中脳辺縁領域における μ -オピオイド受容体の機能低下には、脊髄からの持続的な痛み刺激に対する生理的な反応として遊離される内因性オピオイドペプチドが関与している可能性が考えられる。そこで、本研究では神経障害性疼痛が引き起こす上位中枢の変化を検討する目的で、脊髄の活性化が引き起こす脳機能変化について検討を行った。さらには神経障害性疼痛による morphine 精神依存不形成に対する内因性オピオイドペプチドである β -endorphin の役割について詳細な解析を行った。

神経障害性疼痛発現における PDGF/PAR/PKC γ 経路の役割

坐骨神経結紮による神経障害性疼痛は、thrombin 阻害薬の髄腔内投与により有意に抑制された。また thrombin 自体を単回髄腔内投与すると持続的な熱痛覚過敏反応が観察された。さらに、結紮群の脊髄において PAR の G タンパク質活性化作用の促進および PAR 免疫活性の増大が認められ、この PAR は脊髄後角表層に分布する PKC γ との同一局在を示した。このことから、PAR/PKC γ 経路が神経障害性疼痛の発現に関与していることが考えられる。一方、PDGF 免疫活性は主として脊髄の神経細胞ならびに一部のアストロサイトに局在し、また、PDGF 受容体のキメラタンパク質 (PDGFR/Fc) ならびに PDGF 受容体依存的なチロシンキナーゼ阻害薬の髄腔内投与により、神経障害性疼痛は有意に抑制された。さらに近年、thrombin により PDGF の発現や血小板からの遊離が促進されることが報告されている。そこで、脊髄における thrombin と PDGF の相互作用を検討する目的で、thrombin の髄腔内投与による熱痛覚過敏反応に対する PDGFR/Fc 髄腔内投与の影響について検討を行った。その結果、thrombin の髄腔内投与に引き起こされる熱痛覚過敏反応は PDGFR/Fc を髄腔内投与することにより有意に抑制された。さらに脊髄において thrombin 受容体陽性細胞内に PDGF 免疫活性が強く認められたことから、PDGF は神経細胞における thrombin 受容体陽性細胞内に含有されていることが明らかとなった。以上、これらの結果から、脊髄の thrombin の遊離に伴う PAR を介した PKC γ の活性化、さらにはこの経路を介した PDGF の遊離増加ならびにそれに伴った PDGF 受容体の活性化が、神経障害性疼痛発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

脊髄 PKC γ の活性化に伴った脳機能変化

近年、脊髄の PKC 特に PKC γ が神経障害性疼痛に深く関与していることが報告されている。そこで脊髄 PKC γ の活性化が直接上位中枢の活性化を引き起こすか否かを検討する目的で、PKC 活性化薬である PDBu (phorbol 12,13-dibutyrate) を PKC γ の knockout およびその wild-type マウスの髄腔内に直接投与し引き起こされる脳機能変化を functional magnetic resonance imaging (fMRI) を用いて blood oxygenation level dependent (BOLD) 法に従い検討した。その結果、PKC γ wild-type マウスでは、痛覚伝導路の中継核である視床外側および内側領域、さらには痛覚伝導路の最終終着点である体性感覚野領域において PDBu 投与後 1 時間より BOLD signal の著明な増加が認められ、これは少なくとも投与後 6 時間まで続いた。さらに情動行動を司る帯状回領域、さらには報酬系である側坐核および腹側被蓋野領域においては PDBu 投与 3 および 4 時間後から遅延性の BOLD signal の増加が認められた。一方、PKC γ knockout マウスで同様の検討を行ったところ、これらの反応は全く認められなかった。以上の結果より、PDBu 単回髄腔内投与により引き起こされる脊髄 PKC の活性化が、痛みの上行性経路に関与する領域のみならず、情動に深く関与する帯状回さらには、腹側被蓋野領域や側坐核領域などの報酬効果発現に関与する領域の初期の活性化を引き起こすことが示唆された。

脊髄 PKC の活性化に伴った morphine 精神依存不形成機構における β -endorphin の関与

次に、痛みの調節に内因性オピオイドが深く関与していることから、脊髄 PKC の活性化と内因性オピオイドである β -endorphin の関連を詳細に検討する目的で、 β -endorphin の knockout マウスを用いて PDBu 髄腔内投与により誘発される疼痛様症状や熱痛覚過敏反応について検討した。その結果、 β -endorphin knockout およびその wild-type マウスに PDBu を髄腔内投与することにより、引つき (scratching)、舐め (licking)、噛み (biting) 行動 (SLB 行動)、ならびに尾を激しく振る行動、啼鳴反応、といった疼痛関連行動さらには熱刺激に対する痛覚過敏反応が認められ、また、両群間にこれらの行動発現率の差は認められなかった。これまでに当教室で PDBu の髄腔内投与により morphine 誘発報酬効果が抑制されることを報告していることから、morphine により誘発される報酬効果に対する脊髄 PKC 活性化の影響と β -endorphin の役割について検討を行った。その結果、wild-type マウスに PDBu 髄腔内投与したところ、morphine 誘発報酬効果の抑制が認められた。一方、 β -endorphin knockout マウスにおいても同様の検討を行ったところ、 β -endorphin knockout マウスでは PDBu 髄腔内投与による morphine 誘発報酬効果の抑制は認められなかった。このことから、 β -endorphin は脊髄 PKC の活性化による疼痛反応の発現には関与しないものの、morphine 精神依存不形成機構においては、重要な役割を担っていることが明らかとなった。

神経障害性疼痛下における morphine 精神不形成機構における β -endorphin 役割

まず、神経障害性疼痛下における morphine の精神依存形成に重要な役割を担っている中脳辺縁ドパミン神経の変化について解剖学的な検討を行った。その結果、坐骨神経を結紮することにより、腹側被蓋野

においてドパミン神経の活性化の指標となるリン酸化 tyrosine hydroxylase (p-TH) 免疫活性の著明な減弱が認められた。さらにこの現象は、側坐核に投射している神経細胞上で認められた。このことより、神経障害性疼痛により腹側被蓋野から側坐核に投射しているドパミン神経の活性低下が引き起こされていることが明らかとなった。次にβ-endorphin に対する特異的抗体を腹側被蓋野へ微量注入し、μ-オピオイド受容体作動薬である [D-Ala²,N-MePhe⁴,Gly⁵-ol] enkephalin (DAMGO) 誘発報酬効果を検討したところ、坐骨神経結紮により引き起こされる DAMGO 誘発報酬効果の抑制は完全に消失した。さらにこの神経障害性疼痛下における morphine 誘発報酬効果における β-endorphin の関与についてより詳細に検討する目的で、β-endorphin knockout マウスを用いて検討を行った。その結果、wild-type マウスの非結紮群において認められる morphine 誘発報酬効果は、結紮群において有意に抑制された。一方、β-endorphin knockout マウスの結紮群においては、wild-type マウスで認められた morphine 誘発報酬効果の抑制は完全に消失した。次に、腹側被蓋野領域を含む中脳底部細胞膜分画標本における DAMGO 誘発 G タンパク質活性化作用を検討したところ、wild-type マウスの結紮群において、非結紮群と比較して G タンパク質活性化作用の著明な減弱がみられた。しかしながら、β-endorphin knockout マウスにおいては、坐骨神経を結紮しても DAMGO 誘発 G タンパク質活性化作用の減弱は認められなかった。また、側坐核領域を含む前脳辺縁部細胞膜分画標本におけるドパミン誘発 G タンパク質活性化作用を検討したところ、β-endorphin knockout マウスと wild-type マウスのいずれにおいても坐骨神経結紮による G タンパク質活性化作用に変化は認められなかった。さらに、側坐核における morphine 誘発細胞外ドパミン遊離量の変化について検討したところ、wild-type マウスの結紮群では非結紮群と比較して morphine 誘発細胞外ドパミン遊離量促進作用の有意な抑制が認められた。しかしながら、β-endorphin knockout マウスの結紮群において、この抑制は完全に消失し、ドパミン遊離量の著明な増加が認められた。以上の結果から、神経障害性疼痛下における腹側被蓋野での μ-オピオイド受容体の機能低下には、β-endorphin が重要な役割を担っている可能性が示唆された。また、μ-オピオイド受容体の機能低下に起因した側坐核での morphine 誘発ドパミン遊離促進作用の抑制が坐骨神経結紮による morphine 誘発報酬効果の抑制の要因であると考えられる。

結語 本研究の結果から、神経障害性疼痛の形成には、脊髄の thrombin/PAR/PKCγ/PDGF 経路が深く関与していることが明らかとなった。さらに脊髄における PKCγ の活性化は様々な脳部位の活性化を引き起こす、特に脳内報酬系に対して大きな影響を与えることが明らかとなった。また、神経障害性疼痛による脊髄 PKCγ の活性化は脳内 β-endorphin 遊離を誘導し、それに伴った μ-オピオイド受容体の機能低下を引き起こすことが明らかとなった。こうした脊髄から上位中枢への一連の変化が神経障害性疼痛下における morphine による精神依存不形成の主因である可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

がん疼痛の6割には神経障害性疼痛が含まれているが、適切な治療薬がないため、医療用麻薬と鎮痛補助薬が使用されているのが現状である。そこで、本論文では神経障害性疼痛モデルを用い、脊髄内 protease-activated receptor (PAR)/platelet-derived growth factor (PDGF) 経路、さらにはこの経路と PKC γ の関わりを検討している。また、神経障害性疼痛による脊髄の活性化が引き起こす脳機能変化についても検討を行っている。さらには神経障害性疼痛による morphine 精神依存の不形成に対する内因性オピオイドペプチド (-endorphin の役割についても多角的に詳細な検討を行っている。

坐骨神経結紮群の脊髄において PAR の G タンパク質活性化作用の促進および PAR 免疫活性の増大が認められ、この PAR は脊髄後角表層に分布する PKC γ との同一局在を示した。坐骨神経結紮による神経障害性疼痛は、PAR の ligand である thrombin 阻害薬の髄腔内投与により有意に抑制された。さらに、脊髄において PAR 陽性細胞内に PDGF 免疫活性が強く認められたことから、PDGF は神経細胞における thrombin 受容体陽性細胞内に含有されていることが明らかとなった。また、PDGF 受容体のキメラタンパク質 (PDGFR/Fc) の髄腔内投与により、神経障害性疼痛は有意に抑制された。さらに、thrombin の髄腔内投与により誘発される熱痛覚過敏反応は PDGFR/Fc を髄腔内投与することにより有意に抑制された。以上の結果より、脊髄の PAR を介した PKC γ の活性化、さらにはこの経路を介した PDGF の遊離増加、それに伴った PDGF 受容体の活性化が、神経障害性疼痛発現に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

PKC 活性化薬である PDBu (phorbol 12,13-dibutyrate) を PKC γ knockout と野生型マウスに髄腔内投与して誘発される脳機能変化を functional magnetic resonance imaging (fMRI) を用いて blood oxygenation level dependent (BOLD) 法に従い検討した。その結果、PKC γ 野生型マウスでは、痛覚伝導路の中継核である視床外側および内側領域、さらには痛覚伝導路の到達点である体性感覚野領域において PDBu 投与後 1 時間より BOLD signal の著明な増加が認められ、投与後 6 時間まで持続した。情動行動を司る帯状回領域、さらには報酬系の側坐核および腹側被蓋野領域では PDBu 投与 3 および 4 時間後から遅延性の BOLD signal の増加が認められた。一方、PKC γ knockout マウスでは、これらの反応が全く認められなかった。以上の結果より、PDBu 単回髄腔内投与により引き起こされる脊髄 PKC の活性化が、痛みの上行性経路に関与する領域のみならず、情動に深く関

与する帯状回、報酬効果発現に関与する腹側被蓋野領域や側坐核領域などの初期の活性化を引き起こすことが示唆された。

Morphine 誘発報酬効果に対する脊髄 PKC 活性化の影響と β -endorphin の役割を検討している。その結果、野生型マウスに PDBu を髄腔内投与したところ、morphine 誘発報酬効果の抑制が認められた。一方、 β -endorphin knockout マウスでは PDBu の髄腔内投与による morphine 誘発報酬効果の抑制は認められなかった。このことから、 β -endorphin は脊髄 PKC の活性化による morphine 精神依存不形成機構において、重要な役割を担っていることが明らかとなった。

Morphine の精神依存形成に重要な役割を担っている中脳辺縁ドパミン神経は、坐骨神経を結紮することにより、腹側被蓋野においてドパミン神経の活性化の指標となるリン酸化 tyrosine hydroxylase (p-TH) 免疫活性の著明な減弱が認められた。この現象は、側坐核に投射している神経細胞上で認められたことから、神経障害性疼痛により腹側被蓋野から側坐核に投射しているドパミン神経の活性低下が明らかとなった。次に、 β -endorphin に対する特異的抗体を腹側被蓋野へ微量注入し、 μ -オピオイド受容体作動薬である [D-Ala², N-MePhe⁴, Gly⁵-ol] enkephalin (DAMGO) 誘発報酬効果を検討したところ、坐骨神経結紮による DAMGO 誘発報酬効果の抑制は完全に消失した。さらに、 β -endorphin knockout マウスを用いて神経障害性疼痛下における morphine 誘発報酬効果、側坐核における morphine 誘発細胞外ドパミン遊離量および腹側被蓋野領域を含む中脳底部細胞膜分画標本における DAMGO 誘発 G タンパク質活性化作用を検討したところ、野生型マウスの結紮群において、非結紮群と比較して morphine 誘発報酬効果および細胞外ドパミン遊離量促進作用の抑制、DAMGO 誘発 G タンパク質活性化作用の減弱が認められた。一方、 β -endorphin knockout マウスの結紮群では野生型マウスの結紮群で認められたこれらの抑制および減弱反応は認められなかった。以上の結果から、神経障害性疼痛下における腹側被蓋野での μ -オピオイド受容体の機能低下には、 β -endorphin が重要な役割を担っている可能性を示唆している。また、 μ -オピオイド受容体の機能低下に起因した側坐核での morphine 誘発ドパミン遊離促進作用の抑制が坐骨神経結紮による morphine 誘発報酬効果の抑制の要因であるとしている。

以上、本研究の結果から、神経障害性疼痛の形成には、脊髄の PAR/PKC γ /PDGF 経路が深く関与していることが明らかにしている。さらに、脊髄における PKC γ の活性化は様々な脳部位を活性化し、特に脳内報酬系に対して大きな影響を与えることが明らかとなっている。また、神経障害性疼痛による脊髄 PKC γ の

活性化は脳内 β -endorphin 遊離を誘導し、それに伴った μ -オピオイド受容体の機能低下を引き起こすことが明らかとなった。こうした脊髄から上位中枢への一連の変化が神経障害性疼痛下における morphine による精神依存不形成の主因である可能性が示唆されている。

本論文は緩和医療の分野に大きく貢献する内容であり、正しく記載されている。したがって、本論文は博士（薬学）の学位論文として相応しい内容であると判断した。