

疼痛症状における概日時計機能の解析と新規鎮痛標的分子の探索

安河内, 冴

<https://hdl.handle.net/2324/6787543>

出版情報 : Kyushu University, 2022, 博士 (臨床薬学) , 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (2)



疼痛症状における概日時計機能の解析と新規鎮痛標的分子の探索

薬剤学分野 3PS19101M 安河内 冨

【序論】

「痛み」は有害な刺激から生体を防御するための危険信号を伝える重要なシグナルであるが、痛みの原因が排除された後も持続する慢性疼痛は、患者の QOL を著しく低下させる。このような慢性疼痛は、炎症やがんの浸潤などによる神経の炎症などによって引き起こされ、その罹患者は世界人口の 20% に上ると推定されている。慢性疼痛に対しては、既存の鎮痛薬が奏効しない場合も多く、新たな作用機序に基づいた鎮痛薬の開発や緩和療法の構築が望まれている。一方、関節リウマチ、糖尿病、ヘルペスウイルス感染、がんの浸潤に伴う疼痛など、様々な要因が複合的に絡み合っただけでなく、発症する痛みにも概日リズムが認められる。当研究室では神経障害性疼痛モデルマウスを用いた検討で、脊髄アストロサイトに発現する serum and glucocorticoid-inducible kinase-1 (SGK-1) が神経障害による疼痛症状の概日リズムを制御していることを見出している¹。このことは、疼痛の概日リズムに着目したメカニズムの解析を通じて、新たな鎮痛標的分子の探索や同定が可能になることを示している。本研究では、神経障害性疼痛の概日リズムに着目した新規鎮痛薬の同定と、がん性疼痛モデルマウス（担がんマウス）における疼痛症状の概日リズム制御メカニズム解析を通じた新規鎮痛標的分子の探索を試みた。

【方法】

実験動物：神経障害性疼痛モデルマウスは日本チャールス・リバー株式会社 (Kanagawa, Japan)、日本クレア (Tokyo, Japan)、Taconic Biosciences (Germantown, NY, USA) より購入した ICR 雄性マウス、FVB 雄性マウスおよび breast cancer resistance protein (BCRP) ノックアウト (Abcg2^{-/-}) マウスを用い、坐骨神経を部分結紮 (partial sciatic nerve ligation; PSL) することで作製 (PSL マウス)、処置後 1 週間経過後に実験に使用した。担がんマウスは日本クレアより購入した C3H/HeJ 雄性マウスの坐骨神経周囲に、マウス線維肉腫細胞 NCTC2472 を 2.5×10^5 cells/mL 含む DMEM 培地と matrigel (BD, San Jose, CA) を等量ずつ混合した細胞懸濁液 10 μ L を直接滴下して移植し、移植後 3-4 週目に実験に使用した。

疼痛行動試験：von Frey Filament (North Coast Medical) を用いた up and down 法により、機械刺激に対する痛み行動の測定を行った。マウスをメッシュケージの上の個室に入れ、1 時間程度順応させ、その後床下面よりフィラメントの湾曲状態を 3 秒程度保持し、疼痛に対しての逃避行動の有無を確認した。

薬物投与：髄腔内投与は、Hamilton マイクロシリンジを付けた 30G の注射針を用いて、第 5/6 腰髄の椎骨の間に刺入して薬液を 10 μ L/mouse で投与した。経口投与はゾンデを用い、各薬液を 630 μ mol/kg で投与した。

脊髄中細胞分離法：脊髄中神経細胞、ミクログリア、アストロサイトを分離するために、fluorescence-activated cell sorting (FACS) および magnetic-activated cell sorting (MACS) による細胞分離を行った。マウスにペントバルビタール (100 mg/mL) を 0.1 mL 腹腔内投与し、立ち直り反射および種々の刺激に対する反射が消失したことを確認したのち、心臓を露出させ左心室より PBS 20 mL を灌流して脱血した。脊髄組織を摘出し、目的部位である第 4/5 腰髄を単離後、collagenase D および dispase を

含む酵素液により消化し、一部は MACS によって神経細胞の分離を、残りはミエリンデブリの除去を MACS で行なったのち、各種細胞抗体で染色後 FACS Aria III (BD Biosciences)を用いてミクログリアとアストロサイトの分離を行った。

統計解析：独立多群の比較には一元または二元配置分散分析法 (One-way or Two-way ANOVA)および Tukey-Kramer test、Dunnnett's test を用いた。独立二群間の比較には Student's t-test を用いた。有意水準は 5%以下とした。

【結果・考察】

第一章：SGK-1 を標的とした神経障害性疼痛に対する新規治療医薬品の探索

SGK-1 の活性阻害作用を有する医薬品を探索するため、無細胞系でヒト SGK-1 酵素活性を評価できるスクリーニング系を構築した。SGK-1 の阻害試薬である GSK650394 をポジティブコントロールとし、国内で承認されている既存薬 1,271 種類を含むライブラリーを用いて探索を行った。その結果、GSK650394 と同程度まで SGK-1 酵素活性を阻害する候補薬として sulfasalazine (SSZ) および benserazide が選出された。これら候補薬を神経障害性疼痛モデルマウス (partial sciatic nerve ligation mice; PSL マウス) に対して髄腔内投与したところ、SSZ を投与した場合にのみ有意な疼痛緩和効果が認められたことから、以降は SSZ に着目した検討を行なった。

一般的に、SSZ は経口投与で用いられ、小腸において腸内細菌が産生するアゾレダクターゼによって 5-aminosalicylic acid と sulfapyridin の各活性代謝物へ分解される。そこで、SSZ およびその活性代謝産物を経口投与し、PSL マウスの疼痛症状に対する緩和効果について検討を行ったが、いずれの薬物も有意な薬効を示さなかった。髄腔内投与した SSZ が鎮痛作用を示したにも関わらず、経口投与では緩和効果を示さなかったことから、SSZ は代謝されずに、その構造が保持された状態で脊髄に到達することが疼痛緩和効果の発揮に重要であることが示唆された。そこで次に、経口投与後の SSZ のバイオアベイラビリティを改善し、脊髄移行性を増加させる手法について検討を行った。

SSZ は小腸に発現する薬物輸送トランスポーターBCRP の基質となり細胞外へ排泄されることで消化管からの吸収が妨げられる。また、血液脳脊髄関門に発現する BCRP によっても中枢への移行が妨げられることが指摘されている。そこで、BCRP KO (*Abcg2*^{-/-}) マウスを用いて PSL マウスを作製し (PSL-BCRP KO マウス)、疼痛強度と脊髄内 SSZ 含量を解析したところ、SSZ の経口投与は PSL-BCRP KO マウスに対して鎮痛効果を示し、脊髄内 SSZ 含量も増加していた。この結果から、SSZ が経口投与では神経障害性疼痛に対して緩和効果を発揮できなかった原因が、BCRP による吸収抑制に起因することが明らかになったことから、BCRP の薬物輸送活性を阻害する既存薬 febuxostat (FBX)との併用投与を検討した。野生型の PSL マウスに SSZ と FBX を併用経口投与したところ、BCRP KO マウスで観察された場合と同様な脊髄内 SSZ 含量の増加と有意な疼痛緩和効果が認められた。これらの結果から、SSZ のバイオアベイラビリティを改善することで SSZ は経口投与でも神経障害性疼痛に対して鎮痛効果を示すことが明らかになり、複数の既存薬を合剤とすることで、新たな薬効や投与経路の簡便化が可能になることが示唆された² (図 1)。

Sulfasalazine + Febuxostat (oral administration)

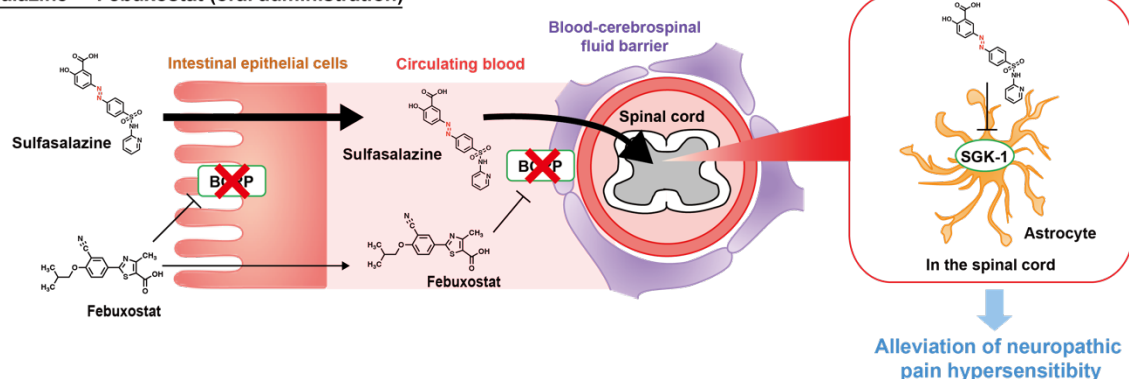


図 1) SSZ と FBX の併用投与による神経障害性疼痛に対する鎮痛効果 SSZ 単独で経口投与した場合、小腸に発現する BCRP により消化管からの吸収が抑制され、さらに血液脳脊髄関門に発現する BCRP によって脊髄内への移行が妨げられるため神経障害性疼痛に対して緩和効果を発揮できない。BCRP 阻害作用を有する FBX と併用投与した場合、FBX が BCRP を阻害することで SSZ のバイオアベイラビリティおよび脊髄移行性が上昇し、神経障害性疼痛に対して緩和効果を発揮できるようになることが明らかになった。

第二章：時計遺伝子に着目したがん性疼痛の概日リズム形成メカニズムの解析

坐骨神経周囲に肉腫細胞 NCTC2472 を移植して担がんマウスを作製し、腫瘍の増殖に起因する疼痛閾値の時刻変動を解析したところ、明期後半で疼痛が緩和し、暗期後半で疼痛が増悪する明瞭な概日リズムが認められた。神経損傷による疼痛症状の発症時には、脊髄後角でのグリア細胞の増加やプリン受容体などの発現増加が認められる。そのため、がん性疼痛の発症時も神経損傷の場合と同様に脊髄中で、これら形態的・分子的な変化が見られるか検討したところ、グリア細胞の増加は認められず、主要な疼痛関連因子の発現も変化していなかった。このことから、がん性疼痛は神経損傷による疼痛とは異なるメカニズムで制御されている可能性が示唆された。

そこで、がん性疼痛の概日リズムに着目した解析を行い、腫瘍移植によって脊髄中で発現が増加し、がん性疼痛の概日リズムと対応した発現変動を示す因子を探索した結果、cancer-induced pain factor (CIPF; 仮称)が候補因子として選出された。正常マウスに対して CIPF リコンビナントタンパクを髄腔内投与すると疼痛症状が誘導され、CIPF 中和抗体を担がんマウスに対し髄腔内投与するとがん性疼痛に対して鎮痛効果を示したことから、CIPF ががん性疼痛の概日リズム形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

CIPF の発現リズムについては報告がなく、また腫瘍移植による発現増加メカニズムについても未解明であったことから、その発現リズム制御機構について解析を行なった。はじめに、担がんモデルマウスの脊髄における CIPF の産生細胞を同定するため、FACS および MACS によって神経細胞およびグリア細胞を分離して発現量を測定したところ、CIPF は主にミクログリアで産生され、腫瘍の増殖によって、その発現量は増加することが明らかになった。また、CIPF の発現リズム制御機構を明らかにするために、MG-6 に対して各種時計遺伝子を過剰発現させ、CIPF の発現量を測定したところ、ROR α を過剰発現させた際に、顕著な CIPF の発現増加が観察された。ROR α は ROREs を介して標的遺伝子の転写を促進する時計遺伝子であり、Rev-erb α は ROREs に対して ROR α と競合的に作用し、ROR α による標的遺伝子の転写を抑制する時計遺伝子である。そこで、ROR α と Rev-erb α が CIPF の転写活性に及ぼす影響を解析した結果、ROR α によって誘導された CIPF の転写活性は、Rev-erb α によって有意に抑制された。これらの結果から、CIPF の発現リズムは ROREs を介して ROR α と Rev-erb α によって制御されていることが示唆された (図 2)。

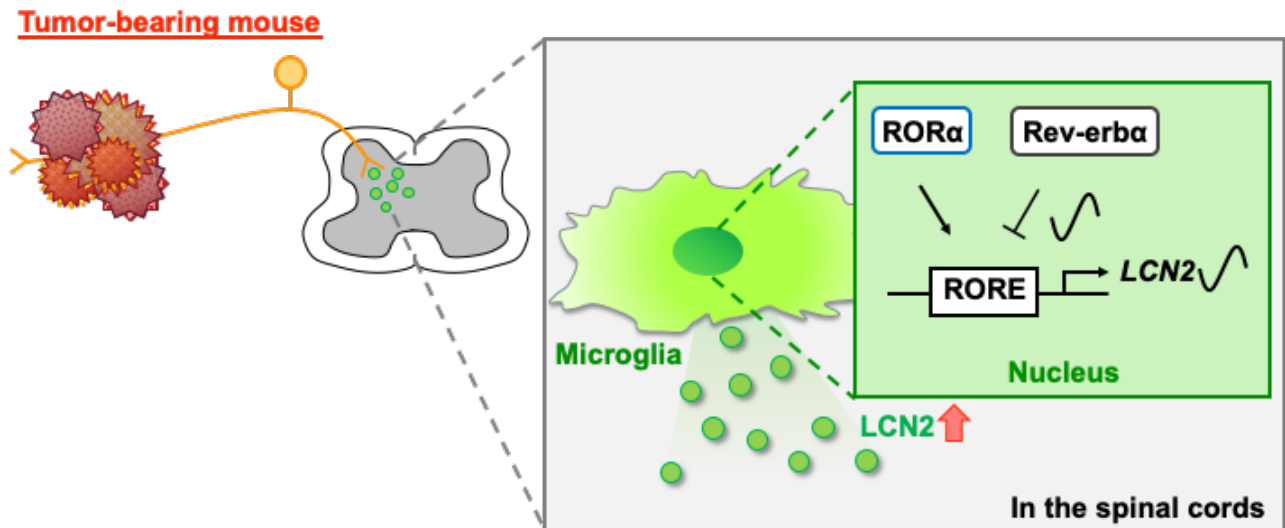


図 2) CIPF によるがん性疼痛の概日リズム制御機構 CIPF は腫瘍移植により発現増加し、主にミクログリアで産生されることが明らかになった。CIPF の発現リズムは ROR α と Rev-erb α が ROREs を介して制御しており、がん性疼痛の概日リズム形成に関与することが示唆された。

【結論】

本研究では、病態の概日リズム制御機構に着目し、ドラッグ・リポジショニングによる神経障害性疼痛に対しての有効な治療薬の探索と、がん性疼痛に対する新規鎮痛標的分子の探索を行った。第一章で同定された SSZ は、過去に見出された神経障害性疼痛の概日リズム制御因子 SGK-1 の活性を阻害することで鎮痛効果を示した。一方、がん性疼痛の概日リズムは脊髄に発現する CIPF によって制御されていることが明らかになった。これらの結果は、神経の障害により引き起こされる疼痛症状と、複合的な要因によって引き起こされるがん性疼痛では概日リズムの形成機構が異なることを示唆しており、疼痛病態における概日リズム形成機構の理解には多角的な解析が必要であることを明示している。本研究では疼痛の概日リズムを基盤にした解明を行うことで、新規鎮痛標的分子の同定や新しい作用機序を有した鎮痛薬の探索が可能になることを示した。本研究を通じて得られた成果や方法論によって、慢性疼痛に対する新たな治療法の構築につながることを期待したい。

【参考文献】

1. Koyanagi S et al., Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nat Commun* 7:13102, 2016.
2. Yasukochi S et al., Sulfasalazine alleviates neuropathic pain hypersensitivity in mice through inhibition of SGK-1 in the spinal cord. *Biochem Pharmacol* 185:114411, 2021.