

予備審査の学位論文の要旨  
(又は、学位論文の要旨)

No... 1 ...

論文題名 脳卒中後疼痛における上行性痛覚伝導路および下行性疼痛制御系の機能変容	
氏 名 松浦 渉	学籍番号若しくは 9416102 所 属 機 関 名
主 論 文	
<p>1) Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S. The Involvement of DDAH1 in the Activation of Spinal NOS Signaling in Early Stage of Mechanical Allodynia Induced by Exposure to Ischemic Stress in Mice. <i>Biol. Pharm. Bull.</i>, <b>42</b>, 1569-1574 (2019)</p> <p>2) Matsuura W., Harada S., Liu K., Nishibori M., Tokuyama S. Evidence of a role for spinal HMGB1 in ischemic stress-induced mechanical allodynia in mice. <i>Brain Res.</i>, <b>1687</b>, 1-10 (2018)</p> <p>3) Matsuura W., Nakamoto K., Tokuyama S. The anti-allodynic effect of orexin-A/OX1R/descending pain control system signalling activation in the mouse model of central post-stroke pain. <i>Eur. J. Pharmacol.</i>, submitted</p>	
要 旨	
<p>【背 景】</p> <p>脳卒中の難治性の後遺症の一つとして知られている脳卒中後疼痛 (central post-stroke pain: CPSP) は、中枢性神経障害性疼痛として分類されており、アロディニアや痛覚過敏などが認められる<sup>1)</sup>。現在、CPSP に対して神経障害疼痛治療法ガイドラインに準じた薬物投与などが施されているものの、その成果は乏しい状況にある<sup>2-3)</sup>。したがって、その根本治療の開発が急がれている。しかしながら、CPSP の詳細な疼痛発症機序が解明されていないことから、その開発は困難を極めている。近年、痛みの制御機構として、脊髄部位における上行性痛覚伝導路や下行性疼痛抑制性系の関与が注目されている<sup>4)</sup>。そこで、本研究では、CPSP の発症機序における上行性痛覚伝導路および下行性疼痛制御系の関与について検討を加えた。</p> <p>最初に、興奮性の痛みを脊髄上位 (脳部位) へと伝達する上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄部位と CPSP 発症との関連に注目した。脳虚血後の脊髄部位において、神経系の二次的損傷や機能的障害が生じるが<sup>5)</sup>、nitric oxide synthetase (NOS) は、神経系の損傷による神経障害性疼痛モデルの疼痛増悪および脊髄での神経系の可塑的变化において重要な役割を担っていることが報告されている<sup>6)</sup>。さらに、NOS を制御する因子として N<sup>(G)</sup>,N<sup>(G)</sup>-dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 (DDAH1) および high mobility group box-1 (HMGB1) が知られ<sup>7-8)</sup>、上行性痛覚伝導路の起始部である脊髄において、疼痛制御に関与する可能性が示唆されていることから<sup>9-10)</sup>、CPSP における上行性痛覚伝導路における DDAH1/NOS および HMGB1/NOS 機構の変容による脳内への痛み刺激の過剰伝達に関与する可能性について検討を加えた。</p>	

次に、下行性疼痛制御系と CPSP 発症との関連を検討するために、不眠症の治療薬として上市されている orexin に着目した。視床下部外側野の orexin 神経が、下行性疼痛制御系において、それぞれノルアドレナリン作動性神経やセロトニン作動性神経の起始核である青斑核や大縫線核に投射し、その受容体である orexin 1 receptor (OX1R) および orexin 2 receptor (OX2R) に作用することで疼痛制御に寄与する可能性が示唆されている<sup>11-13)</sup>。さらに、脳卒中患者の脳脊髄液中で orexin の含量が変動するとの報告もある<sup>14)</sup>。一方、orexin は orexin-A と orexin-B に分類されるが、orexin-B は疼痛制御に関与しないとされる。そこで、CPSP の発症における orexin-A を介した下行性疼痛制御系の関与について検討を加えた。

## 【方 法】

5 週齢の ddY 系雄性マウスを用いた。全脳虚血モデルマウスは 30 分間の両側総頸動脈結紮法 (bilateral carotid arteries occlusion: BCAO) によって作製した。各 mRNA およびタンパク質の発現は、real-time PCR 法 および western blotting 法によって解析した。マウス後肢の機械的刺激に対する逃避行動回数は von Frey test を用いて評価した。脊髄における NOS 測定は比色定量法を用いた。脳内の青斑核および大縫線核におけるノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経の活性化、また、脊髄におけるグリア細胞の形態学的変化は蛍光免疫組織染色法で検討した。

## 【結 果】

### 第一章: CPSP 発症に対する脊髄 DDAH1/NOS シグナルの関与

BCAO 1 および 3 日後の後肢において逃避行動回数の増加が観察された。その逃避行動回数の増加は、 $\text{N}^G$ -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME: 非選択的 NOS 阻害剤) の脊髄腔内投与によって有意に抑制された。BCAO 1 日後の脊髄における DDAH1 の発現は、sham 群と比較して有意に増加したが、3 日後において変化は認められなかった。また、PD404182 (DDAH1 阻害剤) の脊髄腔内投与は、BCAO 1 日後において認められた逃避行動回数の増加を抑制したが、3 日後においては変化しなかった。BCAO 1 および 3 日後の脊髄において NOS 活性の有意な増加が確認された。その NOS 活性の上昇は、PD404182 の脊髄腔内投与によって、1 日後は有意に低下させたが、3 日後は変化しなかった。

### 第二章: CPSP 発症における脊髄 HMGB1 の役割

BCAO 3 日後の後肢において認められた逃避行動回数の増加は、抗 HMGB1 抗体、lipopolysaccharide from the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* (LPS-RS: 選択的 TLR4 アンタゴニスト) および low-molecular weight heparin (LMWH: 選択的 RAGE アンタゴニスト) の脊髄腔内投与によって有意に抑制された。さらに、BCAO 後に脊髄グリア細胞の活性化および NOS 活性の上昇が確認され、それらは抗 HMGB1 抗体および LPS-RS を脊髄腔内投与することによって、有意に抑制された。一方で、LMWH の脊髄腔内投与は、グリア細胞の活性化に影響なしに、NOS 活性を有意に抑制した。

### 第三章: 脳内 orexin-A を介した CPSP 抑制機構の解明

BCAO 3 日後の視床下部において、prepro-orexin (orexin 前駆体) 発現の有意な低下が示された。BCAO 3 日後における有意な逃避行動回数の増加は、orexin-A の脳室内投与によって濃度依存的に抑制された。また、orexin-A の投与によって認められた逃避行動回数の抑制は、選択的 OX1R アンタゴニストの脳室内投与、選択的ノルアドレナリン  $\alpha_2$  および選択的セロトニン 5-HT<sub>1A</sub> 受容体アンタゴニストの脊髄腔投与によって拮抗された。BCAO 3 日後の青斑核および大縫線核において、OX1R の局在が示された。Orexin-A 投与後、青斑核および大縫線核領域で c-Fos (神経活性化マーカー) 発現誘導が増加し、これらの陽性細胞は tyrosine hydroxylase (ノルアドレナリン作動性神経マーカー) および tryptophan hydroxylase (セロトニン作動性神経マーカー) と共局在した。

#### 【結論と考察】

本研究において、脳虚血後の脊髄における NOS 活性の上昇が認められたことから、NOS の制御異常による上行性痛覚伝導路の変容が CPSP を発症させる可能性が示された。また、NOS 活性の制御において、BCAO 1 日後においては DDAH1、3 日後においては HMGB1 が関与することを明らかにした。さらに、脳内 orexin-A/OX1R の低下を介した下行性疼痛制御系であるノルアドレナリンおよびセロトニン作動性神経系の活性低下を介して、CPSP を増強する可能性を示唆した。本研究の結果に基づいた、脊髄における DDAH1 および HMGB1 を介した NO 活性の制御や、脳内 orexin 神経機構をターゲットとする戦略は、CPSP に対する今後の治療薬の開発において、大いに寄与できると考えられる。

## 参考文献

- 1) Kumar B., Kalita J., Kumar G., Misra U.K. Central poststroke pain: a review of pathophysiology and treatment. *Anesth. Analg.*, **108**, 1645-57 (2009)
- 2) Lampl C., Yazdi K., Röper C. Amitriptyline in the prophylaxis of central poststroke pain. Preliminary results of 39 patients in a placebo-controlled, long-term study. *Stroke*, **33**, 3030-3032 (2002)
- 3) Khedr E.M., Kotb H., Kamel N.F., Ahmed M.A., Sadek R., Rothwell J.C. Longlasting antalgic effects of daily sessions of repetitive transcranial magnetic stimulation in central and peripheral neuropathic pain. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **76**, 833-838 (2005)
- 4) Kim J.S., Post-stroke pain. *Expert. Rev. Neurother.*, **9**, 711-721 (2009)
- 5) Garbuzova-Davis S., Haller E., Tajiri N., Thomson A., Barretta J., Williams S.N., Haim E.D., Qin H., Frisina-Deyo A., Abraham J.V., Sanberg P.R., Van Loveren H., Borlongan C.V., Blood-Spinal Cord Barrier Alterations in Subacute and Chronic Stages of a Rat Model of Focal Cerebral Ischemia. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **75**, 673-688 (2016)
- 6) Kuboyama K., Tsuda M., Tsutsui M., Toyohara Y., Tozaki-Saitoh H., Shimokawa H., Yanagihara N., Inoue K. Reduced spinal microglial activation and neuropathic pain after nerve injury in mice lacking all three nitric oxide synthases. *Mol. Pain*, **7**, 50 (2011)
- 7) Cooke J.P., Ghebremariam Y.T. DDAH says NO to ADMA. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **7**, 1462-1464 (2011)
- 8) Das N., Dewan V., Grace P.M., Gunn R.J., Tamura R., Tzarum N., Watkins L.R., Wilson I.A., Yin H. HMGB1 Activates Proinflammatory Signaling via TLR5 Leading to Allodynia. *Cell Rep.*, **17**, 1128-1140 (2016)
- 9) D'Mello R., Sand C.A., Pezet S., Leiper J.M., Gaurilcikaite E., McMahon S.B., Dickenson A.H., Nandi M. Dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 is involved in spinal nociceptive plasticity. *Pain*, **156**, 2052-2060 (2015)
- 10) Nakamura Y., Morioka N., Abe H., Zhang F.F., Hisaoka-Nakashima K., Liu K., Nishibori M., Nakata Y. Neuropathic pain in rats with a partial sciatic nerve ligation is alleviated by intravenous injection of monoclonal antibody to high mobility group box-1. *PLoS One*, **8**, e73640 (2013)
- 11) Zhu Y., Miwa Y., Yamanaka A., Yada T., Shibahara M., Abe Y., Sakurai T., Goto K. Orexin receptor type-1 couples exclusively to pertussis toxin-insensitive G-proteins, while orexin receptor type-2 couples to both pertussis toxin-sensitive and -insensitive G-proteins. *J. Pharmacol. Sci.*, **92**, 259-266 (2003)
- 12) Mohammad-Pour Kargar H., Azizi H., Mirnajafi-Zadeh J., Ali Reza M., Semnanian S. Microinjection of orexin-A into the rat locus coeruleus nucleus induces analgesia via cannabinoid type-1 receptors. *Brain Res.*, **1624**, 424-432 (2015)
- 13) Azhdari-Zarmehri H., Semnanian S., Fathollahi Y. Orexin-A microinjection into the rostral ventromedial medulla causes antinociception on formalin test. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **122**, 286-290 (2014)
- 14) Dohi K., Nishino S., Nakamachi T., Ohtaki H., Morikawa K., Takeda T., Shioda S., Aruga T. CSF orexin A concentrations and expressions of the orexin-1 receptor in rat hippocampus after cardiac arrest. *Neuropeptides*, **40**, 245-250 (2006)