

学位論文内容の要旨

論文提出者氏名	論文審査担当者
荘園雅子	主査 教授 南 敏 明
	副査 教授 宮 崎 瑞 夫
	副査 教授 黒 岩 敏 彦
	副査 教授 林 秀 行
	副査 教授 米 田 博
主論文題名 A synthetic kainoid, (2 <i>S</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>R</i>)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1) serves as a novel anti-allodynic agent for neuropathic pain (合成カイノイド PSPA-1 は神経因性疼痛におけるアロディニアを抑制する)	
学位論文内容の要旨	
<p>《研究の目的》</p> <p>痛みは生理的な痛み（侵害性疼痛）、炎症性疼痛および神経因性疼痛に大別される。侵害性疼痛や炎症性疼痛は生体防御反応であるが、神経が損傷されることに起因する神経因性疼痛は、自発痛、侵害性刺激に対する閾値が低下する痛覚過敏反応、触覚刺激で惹起される激痛（アロディニア）などの症状からなり、一度病態が完成すると非常に難治性である。</p> <p>グルタミン酸は、興奮性神経伝達物質であり、その受容体はイオンチャンネル型受容体とメタボトロピック型受容体に大別される。イオンチャンネル型は <i>N</i>-methyl-D-aspartate (NMDA) 受容体、non-NMDA 受容体〔α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA 型) およびカイニン酸型〕に分類される。</p> <p>ドクササコ (<i>Clitocybe acromelalga</i>) は毒茸であり、摂取すると数日後に四肢末端に灼熱痛とアロディニアが出現し、1ヶ月以上持続する。その成分はアクロメリン酸(ACRO) A、ACRO-B などからなり、ACRO-A、ACRO-B をマウスの髄腔内に投与し触覚刺激を加えると、アロディニアが出現する。ACRO はカイニン酸骨格を有しているカイノイドの一つであるが、カイニン酸を髄腔内に投与してもアロディニアは出現しない。また、ACRO は non-NMDA 受容体に作用すると考えられているが、ACRO によるアロディニアは non-NMDA 受容体拮抗薬で抑制されないことなどから、その作用機序は不明な点が多い。</p> <p>本研究では、新規に合成された ACRO-A 誘導体の (2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3-carboxymethyl-4-phenoxy-pyrrolidine-2-carboxylic acid (POPA-2) と (2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1) を用いて、侵害性疼痛、炎症性疼痛、神経因性疼痛に対する効果を検討し、以下の知見を得た。</p> <p>《方法》</p> <p>アロディニアテスト: POPA-2、PSPA-1 をマウスの髄腔内に投与し、薬剤が広がったと考えられる部位に触覚刺激を加え、アロディニアの出現の有無を調べた。また、ACRO-A および NMDA をマウスの髄腔内に投与し惹起されたアロディニアに対する PSPA-1 の効果を検討した。</p>	

プランターテスト, von Frey フィラメントテスト:プランターテストでは、PSPA-1 を髄腔内投与したマウスの足底に赤外線 (intensity: 40%) で熱刺激を与え、足をはねのけるなど逃避行動をおこすまでの時間を測定した。また、PSPA-1 を髄腔内投与したマウスの足底に、太さにより決まった圧力を加えることができる von Frey フィラメントを当てて機械刺激を与え、逃避行動をおこす疼痛閾値を測定した。

ホルマリンテスト:ホルマリンをマウスの後肢の皮下に投与すると、マウスは後肢をなめたり、ばたつかせたりなどの疼痛様行動を示す。この疼痛様行動は、ホルマリンの侵害受容器への直接の化学刺激 (I相) とそれに続く炎症反応と脊髄での中枢性感作 (II相) の2相性の反応がみられる。PSPA-1 を髄腔内投与したマウスの後肢足背にホルマリンを皮下注射し、炎症性疼痛に対する効果を検討した。

神経因性疼痛モデル:マウスの L5 脊髄神経を結紮・離断することによって神経因性疼痛モデル (Chung モデル) を作製した。Chung モデルマウスに PSPA-1 を髄腔内投与し、von Frey フィラメントで刺激を行い、疼痛閾値を測定した。

NADPH ジアホラーゼ組織化学:NADPH ジアホラーゼ組織化学を用いて神経型一酸化窒素合成酵素 (nNOS: neuronal NO synthase) 活性の分布を調べた。Chung モデルマウスの髄腔内に PSPA-1 を投与した後、脊髄標本を取り出し、nNOS 活性に対する PSPA-1 の効果を調べた。

《結果》

アロディニアテスト:ACRO-A と同様、POPA-2 は、アロディニアを惹起させたが、PSPA-1 ではアロディニアは出現しなかった。一方、PSPA-1 の髄腔内投与は ACRO-A および NMDA の髄腔内投与によるアロディニアを用量依存性に抑制した。

プランターテスト, von Frey フィラメントテスト:PSPA-1 の髄腔内投与は、侵害性熱刺激と侵害性機械刺激に対し影響を与えなかった。

ホルマリンテスト: PSPA-1 の髄腔内投与は、ホルマリンにより引き起こされる疼痛様反応 (I相、II相) とともに抑制しなかった。

神経因性疼痛モデル:Chung モデルマウスで生じた疼痛閾値の低下は、PSPA-1 の髄腔内投与によって用量依存性に改善した。

NADPH ジアホラーゼ組織化学:NADPH ジアホラーゼによって視覚化された nNOS 活性は、Chung モデルにおいて脊髄後角の浅層で増加し、PSPA-1 によって抑制された。

《考察》

今回、侵害性疼痛、炎症性疼痛、神経因性疼痛に対する2つの ACRO-A の誘導体の効果を検討した結果、マウス髄腔内投与の POPA-2 は ACRO-A と同様にアロディニアを惹起させたが、PSPA-1 ではアロディニアは惹起されなかった。一方で、PSPA-1 は ACRO-A によるアロディニアを用量依存性に抑制しただけでなく、炎症性疼痛や侵害性疼痛に対しては影響を与えないものの、神経因性疼痛モデルである Chung モデルにおいて抗アロディニア効果をもつことが示された。

末梢組織に刺激が加わると、脊髄後角においてシナプスからグルタミン酸が放出され、シナプス後膜にある AMPA 受容体に作用して脱分極を引き起こす。末梢からの刺激が持続すると、AMPA 受容体に引き続いて NMDA 受容体が活性化される。NMDA 受容体の活性化によりカルシウムイオンが流入しカルシウム/カルモジュリン複合体を形成し nNOS が活性化され、L-アルギニンから一酸化窒素 (NO) が産生される。神経因性疼痛の維持には、NO が必要であることは以前に報告されているが、今回、PSPA-1 が Chung モデルで増加した nNOS 活性を抑制したことや NMDA によるアロディニアを抑制したことから、PSPA-1 は NMDA-NO 系経路を抑制することにより抗アロディニア効果を表していると考えられる。また、以前より、脊髄には ACRO-A に特異的な non-NMDA 受容体のサブタイプが存在すると示唆されてきたが、まだ特定されていない。今回の結果より、PSPA-1 は ACRO-A に特異的な受容体の同定のための手がかりだけではなく、神経因性疼痛のメカニズムの解明に有用な可能性がある。

審査結果の要旨および担当者

報告番号	甲 第 号	氏 名	荘園雅子
論文審査担当者		主 査 教授 南 敏 明	
		副 査 教授 宮 崎 瑞 夫	
		副 査 教授 黒 岩 敏 彦	
		副 査 教授 林 秀 行	
		副 査 教授 米 田 博	
主論文題名			
<p>A synthetic kainoid, (2<i>S</i>,3<i>R</i>,4<i>R</i>)-3-carboxymethyl-4-(phenylthio)pyrrolidine-2-carboxylic acid (PSPA-1) serves as a novel anti-allodynic agent for neuropathic pain</p> <p>(合成カイノイド PSPA-1 は神経因性疼痛におけるアロディニアを抑制する)</p>			
論文審査結果の要旨			
<p>ドクササコは毒茸であり、摂取すると数日後に四肢末端に灼熱痛とアロディニアが出現し、1ヶ月以上持続する。その成分はカイノイドであるアクロメリン酸 (ACRO) A、ACRO-B などからなる。ACRO-A、ACRO-B をマウスの髄腔内に投与し触覚刺激を加えると、アロディニアが出現する。ACRO-A、ACRO-B は、グルタミン酸受容体の non-NMDA 受容体に作用すると考えられているが、その作用機序は不明な点が多い。</p> <p>申請者は、ACRO-A 誘導体の POPA-2 と PSPA-1 を用いて、侵害性疼痛、炎症性疼痛、神経因性疼痛に対する効果を検討し、以下の知見を得ている。</p> <p>(1) POPA-2、PSPA-1 をマウスに髄腔内投与すると、POPA-2 では ACRO-A と同様、アロディニアが惹起されたが、PSPA-1 ではアロディニアは出現しなかった。</p> <p>(2) PSPA-1 の髄腔内投与は ACRO-A および NMDA によるアロディニアを用量依存性に抑制した。</p> <p>(3) PSPA-1 は侵害性疼痛モデルや炎症性疼痛モデルに対しては影響を与えなかったが、L5 脊髄神経を結紮・離断することによって生じる神経因性疼痛モデル (Chung モデル) において、疼痛閾値を改善した。</p> <p>(4) 神経型一酸化窒素 (nNOS) 活性は Chung モデルの脊髄後角浅層で増加したが、PSPA-1 はこれを抑制した。</p> <p>本研究により、ACRO-A の誘導体である PSPA-1 が ACRO-A によるアロディニアを抑制しただけでなく、神経因性疼痛モデルにおいても抗アロディニア効果をもつことを示している。</p> <p>末梢への刺激が持続すると、脊髄後角でグルタミン酸により AMPA 受容体の活性化に引き続き NMDA 受容体が活性化される。NMDA 受容体の活性化は、nNOS の活性化を引き起こし、一酸化窒素 (NO) を産生させる。NO が神経因性疼痛の維持に必要なことは以前に報告されているが、今回、PSPA-1 が Chung モデルで増加した nNOS 活性を抑制したことや NMDA によるアロディニアを抑制したことから、PSPA-1 は NMDA-NO 系経路を抑制することにより抗アロディニア効果を現わしていると考えている。</p> <p>以前より、脊髄には ACRO-A に特異的な non-NMDA 受容体のサブタイプが存在すると示唆されて</p>			

きたが、まだ特定されていない。PSPA-1を用いた研究はACRO-Aに特異的な受容体の同定のための手がかりだけでなく、神経因性疼痛のメカニズムの解明に有用な可能性がある。

以上により、本論文は本学大学院学則第9条に定めるところの博士(医学)の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

European Journal of Pharmacology 575(1-3): 75-81, 2007