

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 上村 藍太郎
学位 博士 (歯学)
学位記番号 新大院博 (歯) 第 379 号
学位授与の日付 平成 29 年 3 月 23 日
学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名 Inhibition of the degradation of 2-arachidonoylglycerol (2-AG) attenuated orofacial neuropathic pain following an injury to the trigeminal nerve in mice
(口腔顔面領域の神経傷害性疼痛に対する内因性カンナビノイドの鎮痛作用)
論文審査委員 主査 山村 健介
副査 齋藤 功
副査 瀬尾 憲司

博士論文の要旨

【背景と目的】神経障害性疼痛は、外傷や炎症などによって末梢神経系または中枢神経系が障害されることで引き起こされる。この疼痛は、原因が多様であることから治療が困難で患者の生活に重大な影響を与えるとされている。現在行われている薬物治療は副作用を伴うことがあり、新たな疼痛治療薬の開発が急務である。過去の報告によれば、大麻に含まれる成分の総称であるカンナビノイドには、神経障害性疼痛の改善効果があるとされているが、沈静や依存性などの副作用が生じることがある。そこで、神経障害性疼痛の治療の新たなターゲットとして 2-arachidonoylglycerol (2-AG) や N-arachidonoyl ethanolamine (AEA) といった内因性カンナビノイドが挙げられる。内因性カンナビノイドは、カンナビノイド受容体に結合する内因性のリガンドで、刺激に応じてシナプス後部ニューロンから放出され、シナプス前部ニューロンに作用することで神経伝達物質の放出が抑圧される。このメカニズムは、逆行性シナプス伝達抑圧として知られている。2-AG および AEA の主な分解酵素は、それぞれ monoacylglycerol lipase (MAGL) および fatty acid amide hydrolase (FAAH) である。内因性カンナビノイドは、放出後、直ちに分解されるが、MAGL の阻害剤である JZL184 などにより分解が阻害されることで神経障害性疼痛の改善に効果があることが分かっている。MAGL 阻害剤は、脊髄損傷による神経障害性疼痛モデルにおいて鎮痛効果があると報告されているが、口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルでは報告されていない。口腔顔面領域の神経障害性疼痛モデルとして、三叉神経損傷モデルがあり、このモデルでは中枢性感作および末梢性感作により神経障害性疼痛の症状が引き起こされる。また、眼窩下神経絞扼性神経損傷モデルにおける合成カンナビノイドの鎮痛効果が報告されている。そこで本研究では、口腔顔面領域における神経障害性疼痛に対する JZL184 による鎮痛作用の解明を目的として、行動実験および免疫組織学的解析を行った。

【材料および方法】7 週齢 C57BL/6j 雄性マウスを使用し、眼窩下神経部分切断により神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。モデルマウスの作製は、第一臼歯近心の歯肉類移行部を切開して眼窩下神経を剖出し、部分切断することで行った。行動実験では、神経部分切断前および部分切断後 3, 5, 7 日目に口ひげ部への機械刺激に対する逃避閾値を測定した。測定は、頭部が露出するようにマウスを把持し、von Frey

毛を用いて眼窩下神経支配領域である口ひげ部を刺激した。さらに、神経部分切断から7日目には、JZL184を1, 4, 16mg/kg腹腔内投与し、2時間後に逃避閾値を測定した。その後、灌流固定した上で脳を摘出し、三叉神経脊髄路核および上部頸髄（C1-C2）について厚さ20 μ mの凍結切片を作製し、抗MAGL抗体を用いて免疫組織染色を行った。統計学的解析は、行動実験では逃避閾値について一元配置分散分析およびt検定を、免疫組織学的解析ではMAGL陽性細胞数について一元配置分散分析を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

【結果】行動実験については、眼窩下神経部分切断群の切断側において切断後3日から逃避閾値の有意な低下が観察され、神経障害性疼痛が生じていることが示された。また、JZL184 4mg/kg投与群および16mg/kg投与群においては、投与前と比較して逃避閾値が有意に上昇したが、1mg/kg投与群では有意な変化は生じなかった。免疫組織学的解析から、三叉神経脊髄路核および上部頸髄（C1-C2）におけるMAGL陽性細胞数は神経部分切断群では有意に増加し、さらに、JZL184の投与によりMAGL陽性細胞数は有意に減少した。

【考察】口ひげ部からの刺激が入力する一次求心性線維は、三叉神経脊髄路核および上部頸髄（C1-C2）に投射し、三叉神経の損傷により同部位の神経活動が増加することが知られている。また、2-AGは刺激の入力に対して産生され、刺激の伝達が抑圧されるが、産生された2-AGは、2-AG高分解能をもつMAGLによって短時間で分解されると考えられている。眼窩下神経部分切断群の切断側において、切断後3日から逃避閾値が低下しMAGL陽性細胞数が増加したことから、神経損傷による侵害刺激の入力に対して産生された2-AGを分解するMAGLが増加したと考えられる。一方で、JZL184の投与により、MAGL陽性細胞数が減少し逃避閾値が上昇したことから、MAGLの減少によりその分解基質である2-AGが増加し、侵害刺激の伝達が抑圧された結果、鎮痛作用が引き起こされたと考えられる。

【結論】口腔顔面領域における神経障害性疼痛に対する内因性カンナビノイドの鎮痛作用を検討したところ、内因性カンナビノイド分解酵素阻害剤による鎮痛作用は、内因性カンナビノイドを介した伝達抑圧が関与していると考えられ、内因性カンナビノイド分解酵素の調節メカニズムの解明が新たな鎮痛薬の開発につながる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

神経障害性疼痛は、疾患や外傷などに起因する末梢神経系や中枢神経系の損傷や障害により生じる慢性疼痛の一種である。損傷された神経の支配領域の灼熱痛や刺すような痛み、触れられただけで電氣的ショックを受けたような電撃様痛を感じるアロディニアなどがおもな症状で、これらの痛みは、本来の疼痛意義である組織障害の警告という意味は既に失われており、苦痛としての痛み自体が障害となり患者のQOLの著しい低下が引き起こされるため、治療法の確立が急務である。このため、様々な治療薬の開発が行われており、三環系抗うつ薬やSNRI、プレガバリンといった神経伝達物質阻害剤、トラムセトなどのオピオイド含有鎮痛薬に加え、研究レベルではミノサイクリンなども有効な治療薬の候補であるが、現状では副作用の問題や、病因の多様性などの問題から、単一の治療薬で痛みを完全にコントロールすることは困難とされている。すなわち、多種類の薬剤の中から患者の病因、病態に適したものを選択し、時には複数の薬剤を併用することが現状では神経障害性疼痛の最も現実的な薬物治療である。このため、様々な機序に基づいた鎮痛薬の開発が必要とされている。このような背景の中、申請者らは生体に本来備わっている内因性疼痛抑制系に着目し、薬物によって疼痛抑制系を賦活することで神経障害性疼痛に対する鎮痛効果をもたらせないかと考えた。すでに同様の試みが行われているが、直接的に内因性疼痛抑制系を賦活する薬物には沈静や依存性などの副作用が生じることが知られており、我が国での実用化には障害が多い。

そこで、申請者は生体で生成され内因性疼痛抑制をもたらす内因性カンナビノイドの分解酵素である monoacylglycerol lipase (MAGL) を阻害することで、賦活された内因性疼痛抑制系の効果を増強し、結果として神経障害因性疼痛に対する鎮痛効果をもたらせないかと考え本研究を企画した。

実験には7週齢 C57BL/6j 雄性マウスにおいて申請者の研究グループが開発、確立した眼窩下神経部分切断により作成した神経障害性疼痛モデルマウスを使用した。神経障害因性疼痛の評価には眼窩下神経支配領域である口ひげ部を刺激することで生じるアロディニアによって誘発される逃避反射の閾値を用い、眼窩下神経部分切断後の3, 5, 7日に測定した。また、内因性カンナビノイドの分解酵素 MAGL の阻害薬には JZL184 を用い、眼窩下神経部分切断後の7日目に投与し、鎮痛効果を投与2時間後に逃避反射閾値を測定し、投与前と比較することで評価した。併せて免疫組織学的手法を用い、三叉神経脊髄路核尾側亜核および上部頸髄 C1-C2 領域における MAGL 陽性細胞数に対する JZL184 投与の効果を検証した。

その結果、眼窩下神経部分切断後3日から生じた神経障害性疼痛が、JZL184 の投与で抑制され、この効果は用量依存的であること、三叉神経脊髄路核および上部頸髄 (C1-C2) における MAGL 陽性細胞数は神経部分切断によって神経障害性疼痛が生じた動物では有意に増加し、JZL184 の投与により有意に減少することが明らかとなった。

これらの結果を基に、申請者は神経障害因性疼痛モデルマウスでは本質的には内因性疼痛抑制系が賦活され、疼痛抑制物質である内因性カンナビノイド 2-AG も産生されるが、2-AG 高分解能をもつ MAGL も同時に産生され、産生された 2-AG は、MAGL によって短時間で分解され、結果としてアロディニアのような神経障害因性疼痛特有の病態が観察されること。MAGL 阻害薬である JZL184 の投与により、MAGL の分解基質である 2-AG が増加し、侵害刺激の伝達が抑圧された結果、鎮痛作用が引き起こされたと考察している。

この研究は内因性カンナビノイドの阻害薬が神経障害因性疼痛の治療薬として有用である可能性を示しており、神経障害因性疼痛に苦しむ患者の治療薬開発の一助となることに加え、内因性疼痛抑制系の賦活と抑制メカニズムの解明が有望な研究領域となることを示しており、学位論文として十分な価値があると考えられる。