

慢性疼痛の行動・分子薬理的解析および薬物の作用機構に
関する研究：セロトニン作用薬の BDNF 誘導作用

学位申請者

山口大学大学院医学系研究科保健学専攻 博士後期課程
生体情報検査学領域

安田 聖子

目 次

要 旨 -----	3
第1章：難治性疼痛および併発する気分障害に関する概念	
1. 研究の背景 -----	5
1) 慢性疼痛における“痛覚 - 情動系の変調”について -----	5
2) 細胞内シグナル変調および脳由来神経栄養因子の果たす役割につ いて -----	6
3) 抗うつ薬・鎮痛薬の脳由来神経栄養因子誘導作用について-----	7
4) 抗うつ薬・鎮痛薬の下行性抑制系への作用について -----	8
2. 引用文献 -----	9
第2章：抗うつ薬imipramineの痛覚 - 情動系障害改善作用：行動・分子薬理学的 解析およびBDNF誘導作用	
1. 目的 -----	13
2. 実験材料および方法 -----	13
3. 結果 -----	17
4. 考察 -----	22
5. 小括 -----	25
6. 引用文献 -----	25
第3章：鎮痛薬Neurotropinの痛覚 - 情動系障害改善作用：行動・分子薬理学的 解析およびBDNF誘導作用	
1. 目的 -----	29
2. 実験材料および方法 -----	29
3. 結果 -----	30
4. 考察 -----	35
5. 小括 -----	38
6. 引用文献 -----	38
総 括 -----	43
結 論 -----	45
謝 辞 -----	45

関連論文：

Seiko Yasuda, Mitsuhiro Yoshida, Hirotaka Yamagata, Yasutake Iwanaga, Hiromi Suenaga, Kozo Ishikawa, Masako Nakano, Satoshi Okuyama, Yoshiko Furukawa, Shoei Furukawa, Toshizo Ishikawa.

Imipramine ameliorates pain-related negative emotion via induction of brain-derived neurotrophic factor.

Cell Mol Neurobiol 34(8):1199-208, 2014. (DOI: 10.1007/s10571-014-0097-y)

要 旨

背景・目的：慢性疼痛では長引く心理的ストレスのために気分障害や不安症を併発する。最近の研究から“痛覚 - 情動系の変調”として複合神経機能の異常として捉えられているが，その詳細な分子メカニズムや合理的治療法については未だ不明な点が多い。うつ病などの気分障害，不安症，認知症，ハンチング舞踏症などの高次神経障害では，旧来よりモノアミン神経系（セロトニン：5-HT，ノルアドレナリン：NA）の活性低下や血清中脳由来神経栄養因子(BDNF)の低下（機能低下）が示唆されている。なかでも BDNF は，シナプス伝達における重要な修飾分子であり，その誘導剤が脳血管障害や慢性疼痛を軽減することから，BDNF の高次機能障害に果たす役割が注目されている。三環系抗うつ薬 imipramine(IMI)あるいは 5-HT 作用が知られる鎮痛薬 Neurotrophin (NTP)[®] は，慢性疼痛に主剤，補助剤として広く使用されている。しかし，“痛覚 - 情動系の変調”に対する作用メカニズムは未だ不明な点が多い。そこで，IMI あるいは NTP の慢性疼痛の改善作用について，5-HT と合わせ BDNF の関与を，関連シグナルとその遺伝子発現の面より調べた。さらに，シナプス前 Ca チャネルを阻害する鎮痛薬 pregabalin(PG)と BDNF 誘導作用の差異についても比較検討した。

方法：雄 Sprague-Dawley (SD) ラットを用い，坐骨神経の慢性絞扼(CCI)による疼痛モデルを作製した。CCI 後 7 日目で，痛覚過敏が持続的となることを確認した後，IMI (5mg/kg, i.p.) あるいは NTP (100NU/kg, po.) を投与した。痛覚過敏の評価は，プランターテストにより左後肢底部への熱刺激に対する反応潜時(PWL: sec)で，またうつ様行動の評価には強制水泳試験による不動時間(sec)を，それぞれ測定した。IMI あるいは NTP の抗うつ作用メカニズムを調べるため，BDNF 受容体(TrkB)阻害剤 K252a あるいは 5-HT 神経毒 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT)投与による修飾作用を調べた。また細胞シグナルや遺伝子の解析では，前帯状回 (ACC) および吻側延髄腹側部 (RVM) について pERK1/2, pCREB 活性(免疫染色)および BDNF mRNA 発現(RT-PCR)を，それぞれ測定した。

結果：CCI 後 14 日以降，PWL の持続的低下および不動時間の延長が認められた。抗うつ治療の用量の IMI (低用量) では鎮痛効果は認められず，不動時間の延長を軽減した（ただし，高用量 10mg/kg では鎮痛効果があった）。この抗うつ効果は，抗 BDNF 中和抗体，K252a および 5,7-DHT 投与により消

失した。IMI は pERK1/2 の異常な活性化に関連する pCREB および BDNF mRNA の低下を是正し、これらの効果は 5,7-DHT により消失した。一方、NTP は CCI 後の PWL 低下および不動時間の延長を軽減したが（鎮痛・抗うつ効果）、PG（10mg/kg, po.）では不動時間に影響しなかった。また NTP の鎮痛および抗うつ効果は、K252a および 5,7-DHT で消失したが、PG の抗うつ効果は明らかでなかった。NTP は、慢性疼痛による ACC および RVM における pERK1/2 の活性化、pCREB および BDNF mRNA 低下を正常化し、これらの変化は 5,7-DHT により消失した。

考察・結論：以上の結果から、1）慢性疼痛における“痛覚 - 情動系の変調”の病態において、細胞シグナルの変調や BDNF 産生低下が関与することを明らかにした。2）IMI（低用量）および NTP は疼痛関連負の情動を改善し、その作用には脳幹部および前帯状回における 5-HT 作動性神経系を活性化するとともに、同宿する BDNF 産生の促進を介し、細胞シグナルの変調を正常化することが示唆された。しかし、PG は鎮痛効果のみで疼痛関連負の情動および BDNF 経路のどちらにも影響しなかった。

本研究では、慢性疼痛における“痛覚 - 情動系の変調”の病態において、広く使用されている治療薬 IMI や NTP などモノアミン神経系を賦活する薬物が、気分障害を緩和すると共に、BDNF を誘導することを初めて明らかにしたものである。この BDNF 誘導作用は、神経系の再生やネットワーク再構築が期待されており、合理的薬物治療法として極めて有用な成果と考えられる。

Key words: chronic pain, mood disorder, imipramine, Neurotropin, 5-HT, BDNF, ERK1/2

第 1 章：難治性疼痛および併発する気分障害に関する概念

1. 研究の背景

1) 慢性疼痛における“痛覚-情動系の変調”について

神経障害性疼痛は，末梢神経損傷および中枢神経系（CNS）の細胞障害に起因し，痛覚異常のみならず気分障害や不安障害を併発する（いわゆる“痛覚 - 情動系の変調”）（Fig. 1A）. この“痛覚 - 情動系の変調”は，脊髄から視床を中継した侵害情報が体性感覚領野(S1, S2 領域)のみならず，視床内束系の前帯状回（anterior cingulate cortex; ACC），さらには扁桃体（amygdala; AM），海馬（hippocampus; HC），視床下部（hypothalamus; HT）などの情動系に広く伝達され関連ネットワークの機能異常をもたらす(Fig. 1B). つまり，痛みが“不快な情動”として認知され，これらが相互に影響し合っ“痛みの悪循環”状態に陥ることを意味する(Bremner et al. 2000; Gao et al. 2004; Cao et al. 2009; Gustin et al. 2010).

最近の脳イメージ診断法の著しい進歩によって，この“痛覚 - 情動系の変調”に関する分子レベルから個体レベルまでの機能的解析が，画期的に進んだ. すなわち，慢性疼痛患者の脳イメージにおいて情動系ネットワークである ACC, AM, HC, HT 細胞群における細胞機能の活性化を示す報告が多くみられる (Bremner et al. 2000; Gao et al. 2004; Duric and McCaaron 2005; Zeng et al. 2008 ; Zhang et al. 2005; Seifert and Maihöfner 2009). しかし，“痛覚 - 情動系変調”の病態分子メカニズムを下行性抑制系の起始核である脳幹網様体細胞群あるいは感情調節を担当する ACC 細胞群における，モノアミン系薬物の作用様式については未だ不明なままで，詳細な細胞機能の解明が臨床応用に極めて重要である.

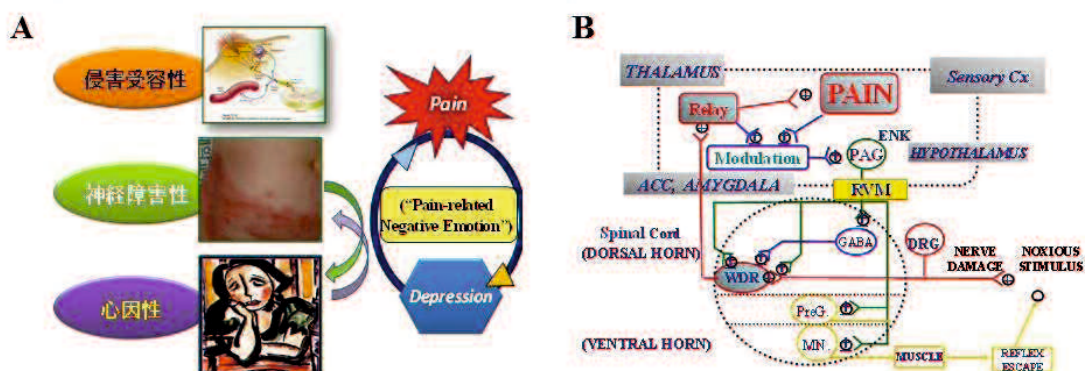


Fig. 1 Category of pain and “Pain-related negative emotion” (A) and ascending and descending pain information (B).

2) 細胞内シグナル変調および脳由来神経栄養因子の果たす役割について

WoolfとMannion(1999)は、末梢神経損傷後の自発痛、痛覚過敏およびアロディニアなど、いわゆる難治性疼痛においては、脊髄 glutamate 含有ニューロンのいわゆる長期増強（“神経可塑性”）が主たるメカニズムであることを提唱した。その後、分子生化学的研究の進歩により、細胞内シグナルである mitogen-associated protein kinase (MAPK)ファミリーが、痛覚 - 情動系に豊富に局在し、その機能発現や調節に重要な鍵を握るとされている。とくに、この“神経可塑性”には、 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38-MAPK, c-Jun N-terminal kinase, cAMP response element binding protein (CREB) 活性が関与することが示唆されている (Cao et al. 2012)。

脳由来神経栄養因子 (brain-derived neurotrophic factor: BDNF) は、中枢神経系に広く分布し、神経系の機能維持に必須な蛋白の総称である (Phillips et al. 1990)。神経伝達に強い修飾作用を示すタンパクで、神経系の生存や分化誘導を調節する (Henderson et al. 1993; Zafra et al. 1992)。また、“神経可塑性”を含む様々な細胞の活性化状態に BDNF mRNA 発現が起こるとともに、脳の障害過程においても発現する (Tsukahara et al. 1995; Beck et al. 1994)、2面性の生理活性を持つユニークなタンパクである。したがって、BDNF は神経系における活性化状態や、一方で細胞傷害に密接に関与する強力な神経伝達修飾分子といえる。

最近、うつ病など気分障害において、モノアミン作動性神経の変調に伴い、BDNF が低下することが示唆され (Paolhagen et al. 2010)、痛覚 - 情動系機能にも密接に関与する可能性がある (Fig. 2)。事実、三環系抗うつ薬が pCREB の活性化を介し (Blendy 2006)、BDNF mRNA 発現を増加させることが報告されている (D'Sa and Duman 2002; Shimizu et al. 2003; Murphy et al. 2013)。しかし、慢性疼痛におけるモノアミン作動性神経と BDNF との相互作用は、十分に明らかではない。

脊髄 BDNF 投与で広閾値作動性ニューロンの長期増強（神経可塑性）が誘導され、p38-MAPK 阻害剤により抑止されることが報告されている (Zhou et al. 2008)。糖尿病性神経障害性疼痛では、BDNF が不足していること、さらに抗 Nerve Growth Factor(NGF)中和抗体により鎮痛効果が消失すること (Pittenger et al. 2003)、また BDNF を含有する培養液の脊髄移植でアロディニアと痛覚過敏が軽減されること (Cejas et al. 2000)、などが報告されている。したがって、BDNF は痛覚や情動系機能の発現・調節および細胞の生存や傷害後の修復において主たる活性分子と考えられ (Merighi et al. 2008)、慢性疼痛において BDNF がその発症や維持に関与する可能性がある。

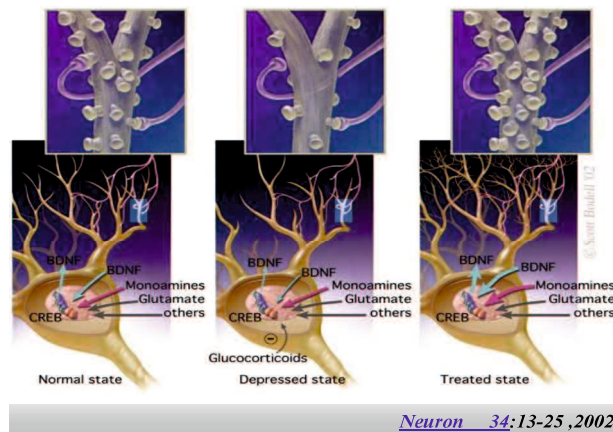


Fig. 2 A brief concept of decrease in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed state and its return after drug treatment.

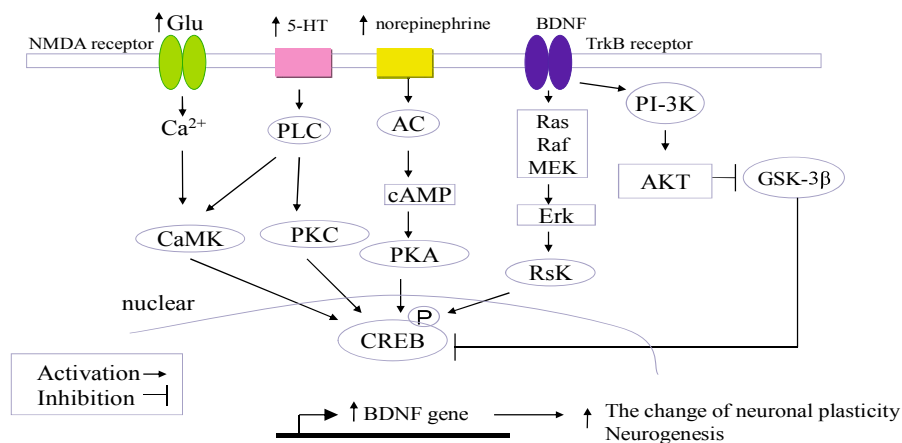


Fig. 3 Respective drawing for intracellular signaling in depressed state. See text for detailed explanation.

3) 抗うつ薬・鎮痛薬の脳由来神経栄養因子誘導作用について

三環系抗うつ薬 Imipramine(IMI)は、臨床で広く用いられている。主な薬理作用は、モノアミン transporter の阻害により、シナプス間隙に放出されたモノアミンのシナプス前細胞への再取り込みを阻害し、シナプス間隙の濃度上昇を引き起こすとされている。その結果、モノアミン受容体が刺激されモノアミン含有神経が活性化される。一般に、慢性疼痛で気分障害を伴った患者では末梢血中 BDNF 濃度が低下する(Shimizu et al. 2003)。また、D'Sa and Duman (2002)

は、脳障害モデルにおいて IMI を慢性的に投与すると、海馬、大脳皮質において CREB のリン酸化(pCREB) の亢進に伴う BDNF 産生や受容体 TrkB mRNA が増加することを報告した (Fig. 3 参照)。しかし、IMI の抗うつや鎮痛効果における BDNF との相互作用については未だ不明な点が多い。

一方、鎮痛薬である Neurotropin[®] (Neurotropin: NTP) は、腰痛症、頸肩腕症候群、症候性神経痛、帯状疱疹後神経痛など、幅広い慢性疼痛の症状に対し効能・効果を有し広く使用されている (ワクシニアウイルス接種家兔炎症皮膚抽出液含有製剤)。最近の報告から、腰髄 (L5) の脊髄神経結紮ラットモデルにおいて、NTP は脊髄後角で 5-HT および NA の放出を促進すること、また上位脊髄を含む多くの局所脳で 5-HT, NA 含有神経系を活性化することが示唆されている (Okazaki et al. 2008)。したがって、IMI と同様に、モノアミンと BDNF の相互作用の可能性がある。

そこで、本研究では痛みと関連するうつ様行動における辺縁系の pERK1/2, pCREB 活性 (細胞内シグナル) や BDNF mRNA 発現 (遺伝子発現) の面から、その変調を詳細に調べる。さらに、モノアミン神経への作用が知られる IMI および NTP の薬理作用について、上記の細胞内シグナルや遺伝子発現におけるモノアミンと BDNF の相互作用を明らかにする。この解明作業により、気分障害の改善に神経系の調節に密接な BDNF の関与が見い出されれば、BDNF の持つ神経ネットワークの再構築、すなわち原因治療に向けて臨床的に極めて有用な知見となる。

4) 抗うつ薬・鎮痛薬の下行性抑制系への作用について

外からの侵害受容は脊髄後角に伝達されるが、上位脳由来神経機構によっても制御されている。下行性抑制系の起始核である中脳水道周囲灰白質 (PAG) は、大脳皮質・辺縁系・視床下部などから入力を受け、その後 5-HT 含有神経の起始核である RVM および NA 含有神経の起始核である橋・青斑核を介して脊髄後角に投射し侵害受容を調節する。しかし、慢性疼痛ではこの下行性抑制系は痛覚の促進に働くことが最近明らかにされており、複雑なメカニズムの存在が示唆されている (石川 2010)。

一方、上位脳情動系由来神経ネットワークの変調も知られるようになった。最近のヒト脳機能イメージ診断法 (fMRI) を用いた研究から、痛み情報は上位脳情動系である ACC, 島皮質 (insula: IC) の活性化をもたらすことが明らかとなった。すなわち、痛み情報は高次神経系には不快情動体験として処理される。さらに、Rainville ら (1997) は、動物実験で ACC の電気刺激により痛覚過敏が起き、その変調は RVM の局所麻酔薬注入で遮断されることを報告した。これら

のことから、ACCニューロンの活性化は、RVMを介して痛覚を増強させることがわかる（石川 2010）。したがって、その詳細なメカニズムの解明は、下行性抑制系をターゲットとした疼痛治療の応用につながる可能性がある（石川 2010; Shiiba et al. 2012）(Fig. 4 参照)。

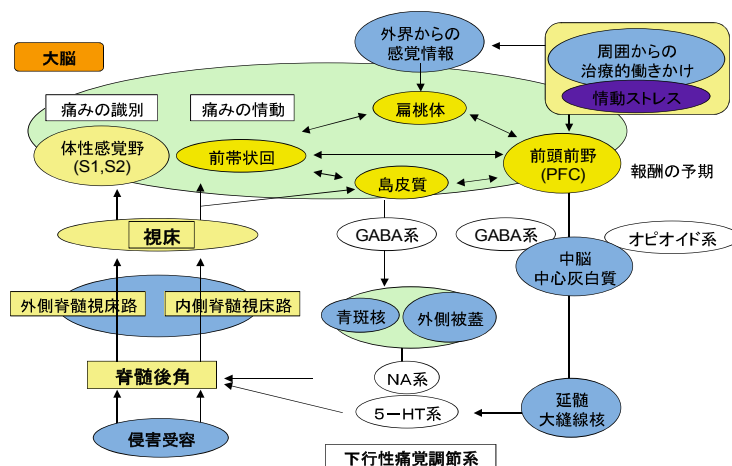


Fig.4 Recent concept for "Pain-related negative emotion" as a pivotal mechanism of chronic pain. (石川 2010)

以上のことから、本研究ではラット慢性疼痛モデルを用い、第2章では、「抗うつ薬 imipramine の痛覚 - 情動系障害改善作用：行動・分子薬理的解析および BDNF 誘導作用」について、BDNF やそのシグナルとの相互作用について検討する。また、第3章では「鎮痛薬 Neurotrophin の痛覚 - 情動系障害改善作用：行動・分子薬理的解析および BDNF 誘導作用」について、それぞれ研究成果を述べる。

また本研究より難治性疼痛、特に不快情動の併発メカニズム、いわゆる“痛覚 - 情動系”神経機構がさらに理解され、また治療戦略に求められるものとして、特に BDNF の有用性について新しい概念を提唱するものである。

2. 引用文献

Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(4):689-692

- Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59(12):1144-50
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *J Psychiatry* 157:115-118
- Cao H, Cui YH, Zhao ZQ, Cao XH, Zhang YQ (2009) Activation of ERK in the ACC contributes to the induction of long-term potentiation in rats. *Neurosci Bull* 25(5):301-308
- Cao H, Ren WH, Zhu MY, Zhao ZQ, Zhang YQ (2012) Activation of glycine site and GluN2B subunit of NMDA receptors is necessary for ERK/CREB signaling cascade in rostral anterior cingulate cortex in rats: implications for affective pain. *Neurosci Bull* 28(1):77-87
- Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, McKillop M, McKillop J, Plunkett JA, Oudega M, Eaton MJ (2000) Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 86(1-2):195-210
- D'Sa C, Duman RS (2002) Antidepressants and neuroplasticity. *Bipolar Disord* 4:183-194
- Duric V, McCarson KE (2005) Hippocampal neurokinin-1 receptor and BDNF gene expression is decreased in rat models of pain and stress. *Neuroscience* 133(4):999-1006
- Gao YJ, Ren WH, Zhang YQ, Zhao ZQ (2004) Contributions of the ACC and amygdala to pain- and fear-conditioned place avoidance in rats. *Pain* 110(1-2):343-353
- Gustin SM, Wrigley PJ, Henderson LA, Siddall PJ (2010) Brain circuitry underlying pain in response to imagined movement in people with spinal cord injury. *Pain* 148(3):438-445
- Henderson CE, Bloch-Gallego E, Camu W, Gouin A, Mettling C (1993) Neurotrophic factors in development and plasticity of spinal neurons. *Restor Neurol Neurosci* 5(1):15-28
- 石川敏三:「オピオイドを取り巻く新しい話題 A. オピオイドとは何か 2. 下行性抑制系とオピオイド」, *ペインクリニック* (特集:別冊秋号), 33, s239-249, 2012.10
- Merighi A, Salio C, Ghirri A, Lossi L, Ferrini F, Betelli C, Bardoni R (2008) BDNF as a pain modulator. *Prog Neurobiol* 85:297-317

- Murphy GM Jr, Sarginson JE, Ryan HS, O'Hara R, Schatzberg AF, Lazzeroni LC (2013) BDNF and CREB1 genetic variants interact to affect antidepressant treatment outcomes in geriatric depression. *Pharmacogenet Genomics* 23(6):301–313
- Okazaki R, Namba H, Yoshida H, Okai H, Miura T, Kawamura M (2008) The antiallodynic effect of Neurotrophin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 107(3):1064–1069
- Pa°lhagen S, Qi H, Ma°rtensson B, Wa°linder J, Grane´rus AK, Svenningsson P (2010) Monoamines, BDNF, IL-6 and corticosterone in CSF in patients with Parkinson's disease and major depression. *J Neurol* 257(4):524–532
- Phillips HS, Hains JM, Laramee GR, Rosenthal A, Winslow JW (1990) Wide-spread expression of BDNF but not NT-3 by target areas of basal forebrain cholinergic neuron. *Science (Wash DC)* 250:290–294
- Pittenger G and Vinik A (2003) Nerve growth factor and diabetic neuropathy, *Exp Diabetes Res* 4, 271-285
- Rainville P, Duncan GH, Price DD, Carrier B, Bushnell MC (1997) Pain affect encoded in human anterior cingulate but not somatosensory cortex, *Science* 277, 968-971
- Shiiba S, Yamamoto S, Sasaki H, Nishi M, Ishikawa K, Yasuda S, Tokuda N, Nakanishi O, Ishikawa T (2012) Cutaneous magnetic stimulation reduces rat chronic pain via activation of the supra-spinal descending pathway, *Cell Mol Neurobiol* 32, 245-253
- Seifert F, Maihöfner C (2009) Central mechanisms of experimental and chronic neuropathic pain: findings from functional imaging studies. *Cell Mol Life Sci* 66(3):375–390
- Shimizu E, Hashimoto K, Okamura N, Koike K, Komatsu N, Kumakiri C, Nakazato M, Watanabe H, Shinoda N, Okada S, Iyo M (2003) Alterations of serum levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in depressed patients with or without antidepressants. *Biol Psychiatry* 54:70–75
- Tsukahara T, Takeda M, Shimohama S, Ohara O, Hashimoto N (1995) Effects of brain-derived neurotrophic factor on 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine- induced parkinsonism in monkeys. *Neurosurgery* 37:733–739
- Woolf CJ, Mannion RJ (1999) Neuropathic pain: aetiology, symptoms,

- mechanisms, and management. *Lancet* 353:1959–1964
- Zafra F, Lindholm D, Castren E, Hartikka J, Thoenen H (1992) Regulation of brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor mRNA in primary cultures of hippocampal neurons and astrocytes. *J Neurosci* 12:4793–4799
- Zeng Q, Wang S, Lim G, Yang L, Mao J, Sung B, Chang Y, Lim JA, Guo G, Mao J (2008) Exacerbated mechanical allodynia in rats with depression-like behavior. *Brain Res* 1200:27–38
- Zhang FE, Cao JL, Zhang LC, Zeng YM (2005) Activation of p38 mitogen-activated protein kinase in spinal cord contributes to CCI-induced neuropathic pain. *Pain* 57(5):545–551
- Zhou LJ, Zhong Y, Ren WJ, Li YY, Zhang T, Liu XG (2008) BDNF induces late-phase LTP of C-fiber evoked field potentials in rat spinal dorsal horn, *Exp Neurol* 212,507-514

第 2 章：抗うつ薬 imipramine の痛覚 - 情動系障害改善作用：行動・分子薬理的解析および BDNF 誘導作用

1. 目的

本研究では，ラット慢性疼痛モデルを用い，Imipramine(IMI)の痛みに併ううつ様行動の軽減効果において，前帯状回(ACC)と脳幹部 RVM の細胞シグナル (pERK1/2, pCREB)，5-HT/BDNF 含量および BDNF mRNA 発現がどのように関与するか，詳細に調べる。

2. 実験材料および方法

本実験は，山口大学動物実験委員会の実験方針，倫理基準ならびに動物の愛護および管理に関する法律昭和 48 年第 105 号，第 6 条を遵守して行った。

動物および慢性疼痛モデル

実験には雄性 Sprague-Dawley ラット（体重 214-320g，九動株，鳥栖）を用いた。ラットは明暗 12 時間（明 7:00～19:00），室温（23±2℃）の条件下で飼育し，餌と水を自由に与えた。神経障害性疼痛モデルは，広く応用されている慢性絞扼損傷（chronic constriction injury: CCI）を用いた（Bennett and Xie 1988）。ラットを pentobarbital 麻酔(30mg/kg, ip.)下で，左背側大腿部皮膚を約 1cm 切開し，坐骨神経を露出させた。4-0 腸線縫合糸を用い，1mm 間隔で 4ヶ所不完全に結紮した。術後に，中枢神経障害や運動麻痺を呈したラットは実験から除外した。

脳室内カテーテル留置術

投薬前 3 日に，再度 pentobarbital 麻酔下(30 mg/kg, i.p)で，Paxinos and Watson (1998)のラットアトラスに従い，ステンレスカニューレの先端が矢状と冠状縫合の交点より後方 1.0mm，外側 1.5mm，深さ 3.5mm に挿入留置した。術後，3 日以上回復期間を置いた。薬物は，ラットを片手で支えながら，カテーテル PE10 をステンレスカニューレに接続し，Hamilton microsyringe を用い脳室内に投与した（1 μ l/1 min, 5 μ l）。

熱性痛覚反応潜時(PWL)

痛覚過敏は、プランターテスト装置(UGOBASILE,エルエムエス 7370S,7371)を用いた反応潜時(PWL)で評価した。ラットをまず、プラスチックケージ内に入れ、安静状態とした(15分間)。赤外線熱刺激を左右後肢底部に与え、逃避するまでの時間を反応潜時(PWL, sec)として測定した。PWLの測定は、5分程度間隔をあけて5回ずつ行い、その最大値および最小値を除去し残りの数値で算術平均を求めた。PWLは、CCI術前および術後3, 7, 10, 14, 21日目の日中(10:00-16:00)に測定した。熱性痛覚過敏は、正常右後肢と病側左後肢のPWL値の差分を算出して評価した。

強制水泳試験(Forced Swimming Test ; FST)

Porsoltら(1978)の方法に従い試験を行った。ラットを、実験前日に水(24±5℃)を満たした縦円筒型プラスチック製水槽(45×35×60cm)に入れ、5分間における意欲低下等による“不動”時間(sec)を測定した(“Pre”)。前肢は軽度に漕ぐが、後肢が“不動”の状態をカウントした。測定終了後は、ラットのストレス緩和を考え、水槽から出しタオルで包むとともに、温風で速やかに乾燥させた。その後、温熱ランプ下に15分間静置した後、元のゲージに戻した。FST試験は、日中(10:00-16:00)に行った。

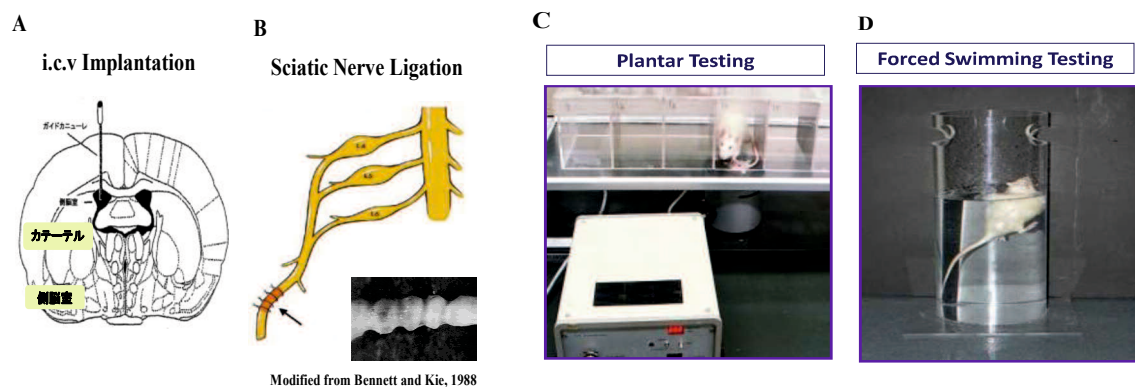


Fig. 1 The surgical operation and behavioral assessments. A; Location of intracerebroventricular catheterization, B; Sciatic nerve ligation (chronic constriction injury model: CCI), C; plantar testing, D; Forced swimming testing. See text for details.

実験群

ラットを以下の 6 群に任意に分け実施した。なお偽手術群(Sham)では生理食塩水(0.5ml, i.p.大塚製薬(株), 徳島)を注入した。IMI(5mg/kg)は i.p 投与し, PWL 試験および FST 試験は, IMI 投与後 4 時間で行った。

- 1) 偽手術群(Sham) : Pentobarbital 麻酔および坐骨神経部位開創術のみ実施した後, 22 日間観察。
- 2) 非治療群(Untreated) : 生理食塩水 0.5ml を CCI 後 10 日目から 22 日目まで連日 ip.投与。
- 3) IMI 群 + aCSF 群 : IMI 5mg/kg を CCI 後 10 日目から 22 日目まで連日 ip.投与。
- 4) IMI + K252a 群 : 3)群と同様で, CCI 後 21, 22 日目に BDNF 受容体 TrkB 阻害薬 K252a(25 μ g/5 μ l)を i.c.v.投与。
- 5) IMI + Anti-BDNF 群 : 3)群と同様で, CCI 後 21, 22 日目に抗 BDNF 中和抗体(2 μ g/5 μ l)を i.c.v.投与。
- 6) IMI + DHT 群 : 3)群と同様で, CCI 後 14 日目に 5-HT 神経毒である 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT, 200 μ g/5 μ l)を i.c.v.単回投与。

薬物およびその調整

Imipramine (IMI; Sigma-Aldrich, No.17379, Tokyo, Japan) は生理食塩水で調整した。K252a (25 μ g/5 μ l, Code No. K0021, LKT Labs, Inc., USA) は 10% DMSO で溶解しその後生理食塩水で調整した。Anti-BDNF 抗体 (2 μ g/5 μ l, IgY, Code No. AF248, Anti-human BDNF antibody, R&D Systems, Minnesota, U.S.A.)は 5%DMSO で溶解し, その後 0.1MPBS で調整した。5,7-DHT (200 μ g/5 μ l, Code No. 8434F, 5,7-Dihydroxytryptamine, MP Biomedicals Inc., Germany)は 0.2mg/ml アスコルビン酸含有の生理食塩水で調整した。

これらの薬物は,人工髄液(aCSF)を infusion pump を用いて 10 μ l/10min で i.c.v.投与した。aCSF の組成は, NaCl (124mM), KCl (3mM), MgSO₄ (1.3mM), CaCl₂ (2.4mM), NaHCO₃ (26mM), NaH₂PO₄ (1.2mM), および glucose (10mM)とし, 投与時まで 4 $^{\circ}$ C もしくは -20 $^{\circ}$ C 下で保存した。

免疫組織化学染色

CCI 後 23 日目に, ラットを再度 halothane 麻酔 (2-3%) 下とし開胸術を行った。

VN (57mer); Invitrogen, JAPAN) , および PrimScript Reverse Transcriptase (Code No.2680A, 10,000U; TAKARA BIO INC, JAPAN)を用いた. RT-PCR 反応産物は 2% agarose gel で電気泳動し, それぞれ 350bp, 390bp 位置の増幅バンドを EtBr (Code No.315-90051, NIPPON GENE CO., JAPAN)により蛍光発色させた. 画像解析ソフト Image J (National Institutes of Health (NIH), U.S.A)による BDNF/ β -actin 面積比を BDNF mRNA 発現量として測定した.

データの統計学的解析

行動評価, 免疫組織染色による陽性細胞数, 5-HT 含量, BDNF 含量および BDNFmRNA の結果は, それぞれ平均 \pm 標準誤差(SEM)で表した. 統計学的解析は, 二元配置分散分析法(Two-Way ANOVA)を用い, 有意な場合は Tukey 法で各平均値間を多重比較した. $P < 0.05$ を有意とした.

3. 結果

1. CCI 後の痛覚過敏に対する IMI の効果

プランターテスト装置を用い, CCI 後 IMI の鎮痛効果を評価した. Sham 群では測定した 21 日間において PWL 値に左右差はなかった(Fig. 2A). UT 群では, CCI 後 3 日目から 21 日目まで PWL が著しく低下した. 低用量の IMI+aCSF 群では, CCI 後 21 日目における非治療群との差は認められなかった (Fig. 2B).

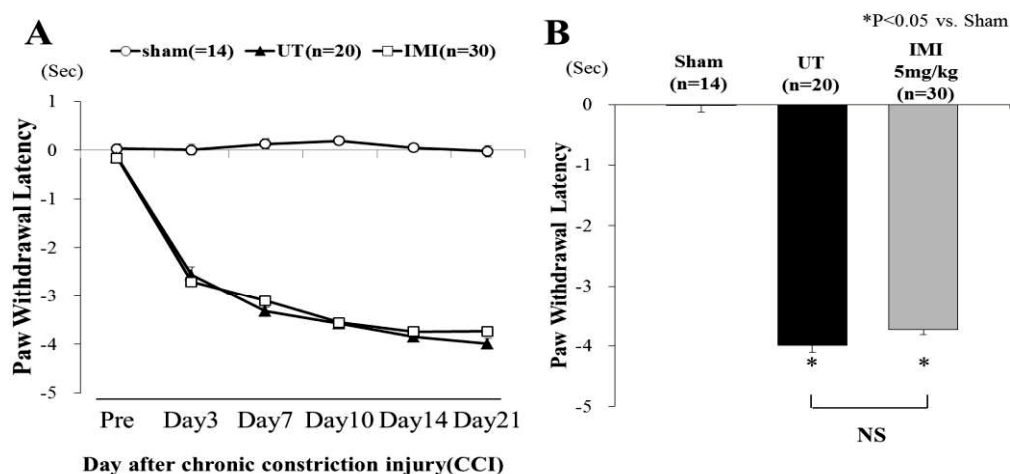


Fig. 2 The change in paw withdrawal latency (PWL) with imipramine (IMI) after chronic constriction injury (CCI). Values are shown as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham-operated.

2. IMI の CCI 後のうつ様行動に対する効果

FST 試験での不動時間延長をうつ様行動として評価した結果を Fig. 3 に示す。Sham 群に比べ，UT 群では CCI 後 21 日目に不動時間が有意に延長した。IMI+aCSF 群では，不動時間の延長が有意に軽減された。

3. IMI の抗うつ効果の修飾作用

慢性疼痛時における IMI の抗うつ効果における BDNF および 5-HT の関与について検討した (Fig. 3)。IMI 群の抗うつ効果は，+DHT 群 (選択的セロトニン作動性神経毒:Fig. 3A)，Anti-BDNF 群(BDNF 中和抗体)もしくは +K252a 群 (TrkB 受容体阻害剤)により有意に拮抗された (Fig. 3B)。この結果から，慢性疼痛における IMI の抗うつ効果は，BDNF が関与する (相互作用の可能性) ことが示唆された。

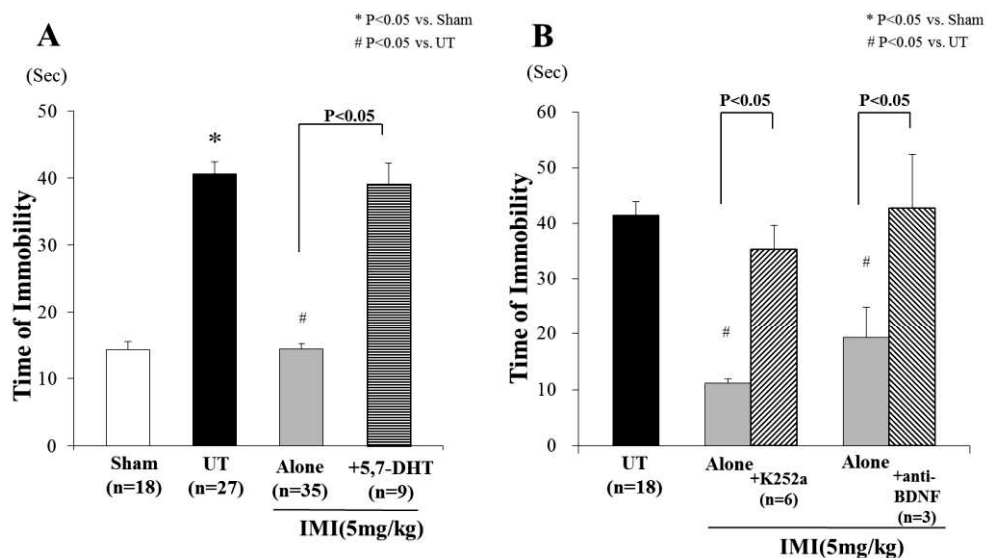


Fig. 3 Antidepressive effect of imipramine (IMI) on immobility time (sec)(A) and its modulation by 5,7-DHT, anti-BDNF, or TrkB receptor inhibitor(B). Values are shown as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham-operated. # $P < 0.05$ vs. Untreated (UT).

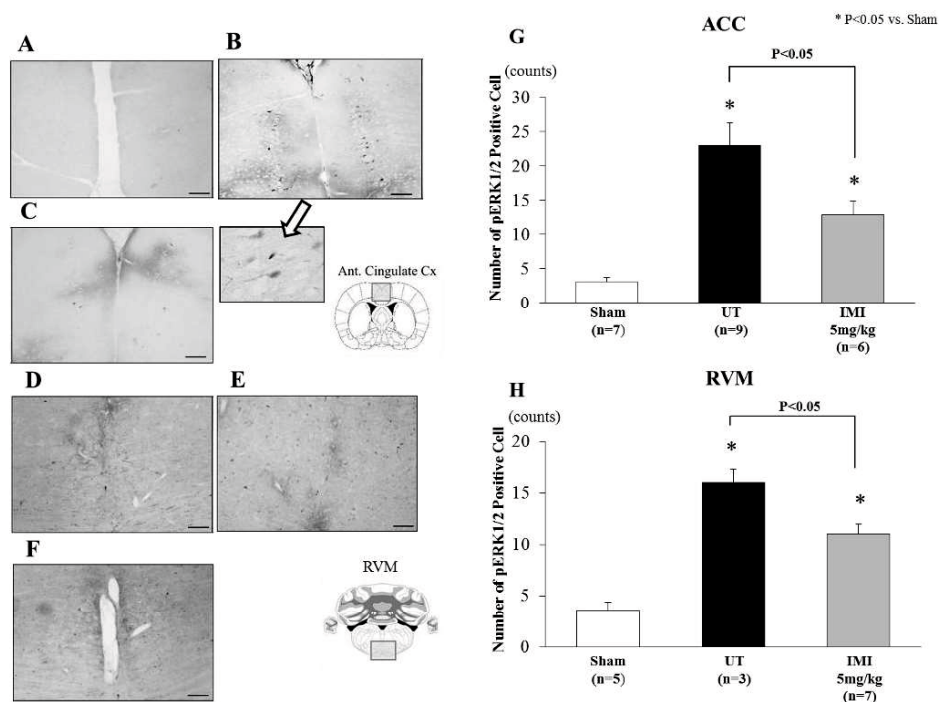


Fig. 4 Representative microphotographs for pERK1/2 immunoreactivity in the ACC and RVM after CCI and comparison of pERK 1/2 positive cells among groups. **a-f** for pERK 1/2 in the ACC [A: sham, B: Untreated, C: IMI (5mg/kg)] and RVM [D: sham, E: Untreated, F: IMI (5mg/kg)]. Quantitative analysis of ACC (G) and in RVM (H). Values are shown as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. *Scale bars* 100 μ m

4. IMI の ACC および RVM における pERK1/2 および pCREB 免疫活性に及ぼす影響

Fig. 4 に pERK1/2 の代表的陽性細胞像を示す。CCI 後慢性疼痛時（Untreated 群）では、ACC および RVM での pERK 陽性細胞数は有意に増加し、IMI+aCSF 群では、これらの増加が有意に軽減された (Fig. 4G, H)。また、Fig. 5 に pCREB の代表的陽性細胞像を示す。慢性疼痛時（Untreated 群）では、ACC および RVM の pCREB 陽性細胞数が有意に低下したが、IMI+aCSF 群では、RVM でこの低下が有意に軽減された (Fig. 5G, H)。

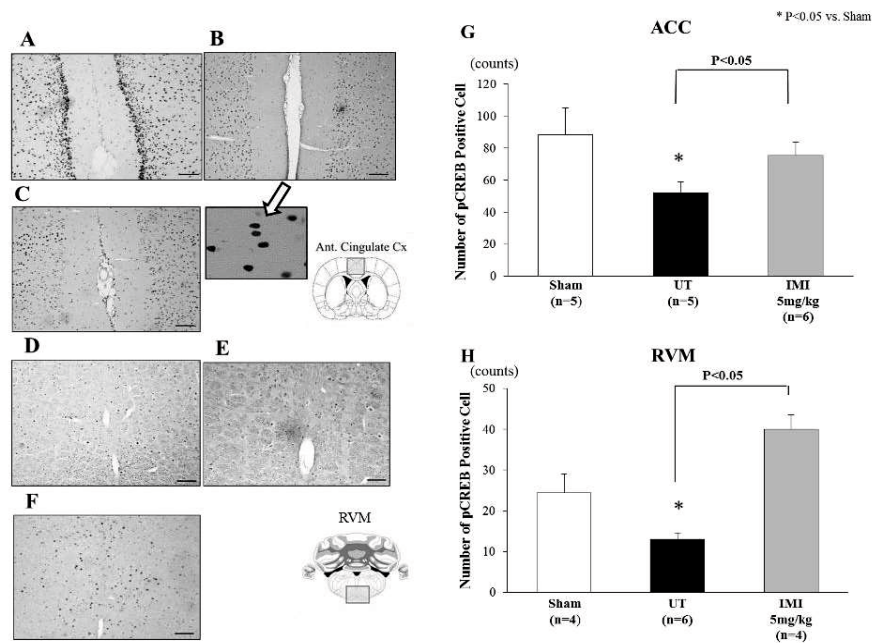


Fig. 5 Representative microphotographs for pCREB immunoreactivity in the ACC and RVM after CCI and comparison of pCREB positive cells among groups. **a-f** pCREB in ACC [A: sham, B: Untreated, C: IMI (5mg/kg)] and RVM [D: sham, E: Untreated, F: IMI (5mg/kg)]. Quantitative analysis of pCREB in the ACC (G) and RVM (H). Values are shown as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. Scale bars 100 μ m

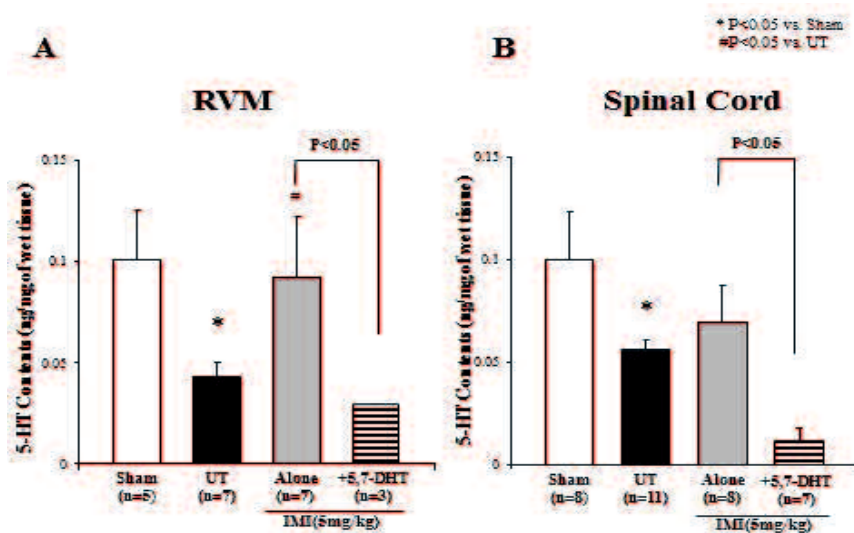


Fig. 6 Serotonin (5-HT) level in the RVM (A) and spinal cord (B) after CCI. Values are shown as the mean \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. Sham. # $P < 0.05$ vs. Untreated (UT).

5. RVM および脊髄におけるセロトニン (5-HT) 含量に及ぼす IMI の影響

慢性疼痛時では、測定した細胞群ともに 5-HT 含量は低下した (Fig. 6; sham 群と Untreated 群を比較)。しかし、治療群である IMI+aCSF 群では、RVM におけるその低下が軽減され、IMI+DHT 群ではこの作用は拮抗された。一方、脊髄では、IMI+aCSF 群による変化は認められず、IMI+DHT 群では、さらに 5-HT 含量が低下した。

6. ACC および RVM における BDNF 含量に及ぼす IMI の影響

慢性疼痛時 (Untreated 群) では、ACC (Fig. 7A) および RVM (Fig. 7B) における BDNF 含量が著しく低下した。IMI+aCSF 群では、RVM における BDNF 含量の低下が軽減され、IMI+DHT 群で拮抗された (Fig. 7B)。

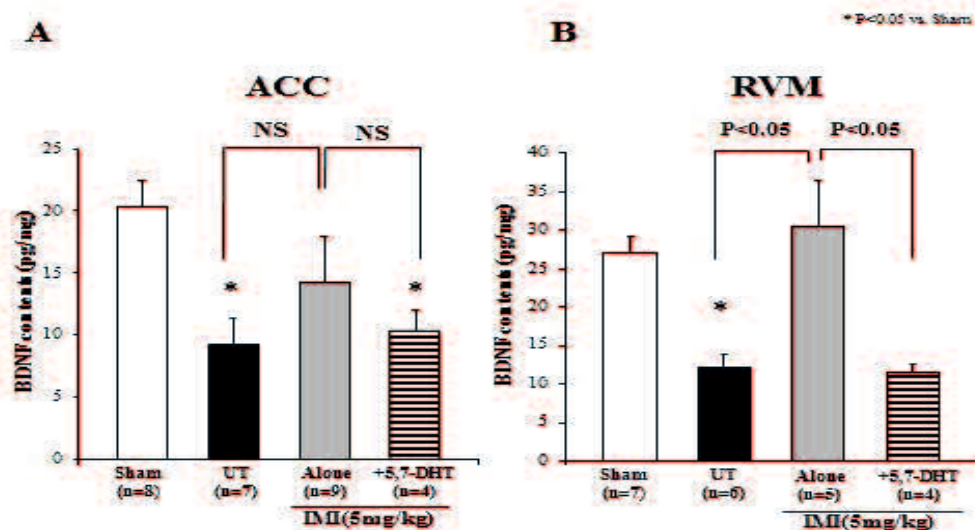


Fig. 7 Effect of IMI on BDNF levels of the ACC (A) and RVM (B) after CCI.

Values are shown as the mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. Sham.

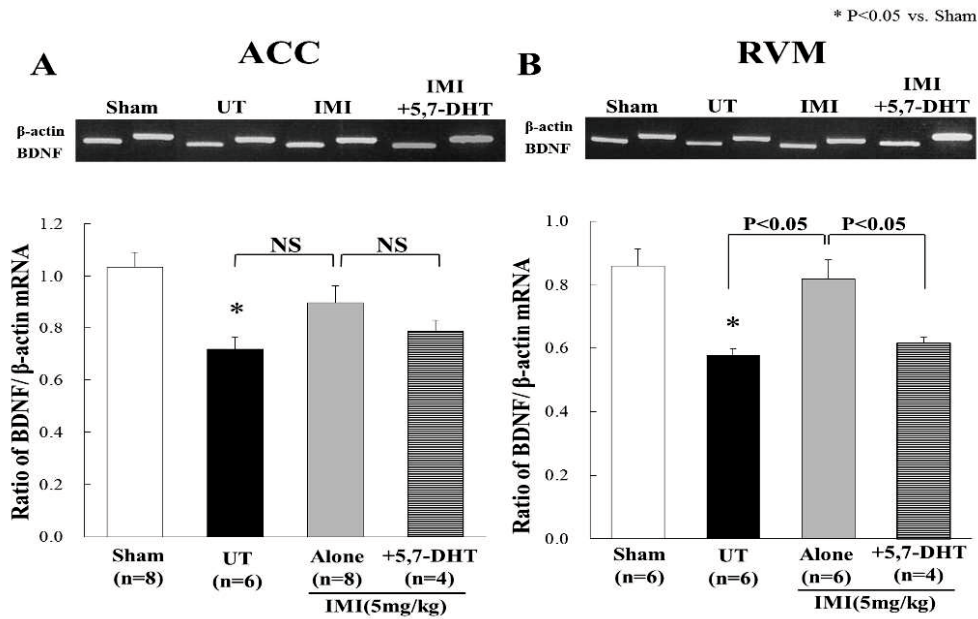


Fig. 8 Changes in BDNF mRNA expression in the ACC (A) and RVM (B) after CCI. Values are shown as the mean \pm SEM. * P < 0.05 vs. Sham.

7. ACC および RVM における BDNF mRNA 発現に及ぼす IMI の影響

慢性疼痛（Untreated 群）においては，ACC（Fig. 8A）および RVM（Fig. 8B）における BDNF mRNA 発現が著しく低下した．IMI+aCSF 群では，RVM における BDNF mRNA 発現の低下が軽減され，IMI+DHT 群でこの軽減作用は拮抗された．

4. 考 察

本研究より，神経傷害性疼痛に併発するうつ様行動には，痛覚 - 情動ネットワークにおける pERK1/2 の異常な活性化に伴った BDNF 不足が関与することが明らかとなった．また，Imipramine（IMI）は 5-HT 作動性神経を活性化することにより，pERK1/2 活性の正常化ならびに BDNF 産生をもたらし，痛覚 - 情動の変調を軽減した．これらの IMI の効果は，5,7-DHT，anti-BDNF 抗体あるいは K252a で消失したことから，IMI は 5-HT 作動性神経の活性化と相互作用によると思われる BDNF の誘導作用が示唆される．

本研究で用いたラット神経障害性疼痛（CCI）モデルは、緩徐な痛み症状の進展およびうつ、不安を併発することからヒト神経傷害性疼痛（Moisset and Bouhassira 2007）とよく類似するとされ、薬物のスクリーニングに広く用いられている。近年、fMRI および PET など脳イメージング診断法が著しく進歩したことで、痛覚 - 情動系におけるネットワークの詳細な機能解析が可能となった。神経傷害性疼痛においても同様に、脊髄 - 視床 - 感覚野を含む痛覚伝導系と情動系、特に前帯状回の変調がその主たる病因とされるようになった（Sheline et al. 1996; Bremner et al. 2000; Duric and McCarron 2006）。したがって、慢性疼痛患者における痛覚 - 情動系機構変調の診断とその治療評価に極めて有用とされている（Moisset and Bouhassira 2007; Moisset et al. 2010）。

本研究において、ラット CCI モデルで、IMI が痛覚過敏に併発するうつ様行動を緩和するとともに、感情を調節する ACC および下行性抑制系 RVM において BDNF mRNA 発現の低下および pERK1/2 の異常な活性化の軽減作用が判明した。このことは、Fukuhara ら(2012)が BDNF 誘導剤 4-methylcatechol により、慢性疼痛に伴ううつ様行動が抑止され、またその効果は抗 BDNF 中和抗体により拮抗されるとした結果によく一致する。また成熟ラットにおいて、BDNF 欠失により、うつおよび慢性痛を誘発することも報告されている（Heldt et al. 2007）。これらのことから、BDNF 低下とうつ様行動には強い関連があると考えられる。

また、鎮痛効果を有しない用量の IMI はうつに効果があることが明らかとなった。この結果は、うつに BDNF が関与することを裏付けるものと考えられる（Hosang et al. 2014）。従って、脳幹網様体および視床下部から入力をうける中脳水道周囲灰白質（PAG）に由来する下行性抑制系が、BDNF を誘導し抗うつ効果をもたらすことが示唆される。一般に、三環系抗うつ薬（TCAs）は、モノアミン再取り込みを阻害することで関連神経系を活性化し、求心性前シナプス受容体からの伝達物質放出を抑制するとともに後シナプスを過分極にする作用により効果を発揮する（Pilar-Cuéllar et al. 2014）。IMI がこのような神経機構により抗うつ効果を発揮することは、先行研究の結果に支持される（Larsen et al. 2010; Kuhn et al. 2014; Takano et al. 2012）。

本研究から慢性疼痛ではモノアミン神経の活性が低下することがわかったが、一般に、このようなモノアミン作動性神経の機能低下は、心理学的機能におけ

る分野で幅広く研究されている。RVM 由来 5-HT 作動性神経は、PAG からの入力を受け、不安およびうつを調節することが示唆され (Millan 2002), RVM および RVM 由来 5-HT 神経が、行動の調節に重要な役割を果たしている (Vanegas and Schaible 2004). 本研究からも、IMI 投与により慢性疼痛時における RVM での 5-HT 含量の低下が是正され、この効果は 5,7-DHT により拮抗された。一方、脊髄では IMI による効果は得られず、RVM 由来の 5-HT 放出には影響しなかった。このことは、低用量 IMI では鎮痛効果が明らかではなく下行性疼痛抑制系に影響を及ぼさないことが示唆される。

TCAs は慢性疼痛の患者管理において、補助剤として広く用いられている (Sindrup et al. 2005; Nagata et al. 2009). つまり慢性疼痛の治療では、鎮痛薬を主としながらも、TCAs を併用しうつ症状を調節することが多い。Fumagalli ら (2005) は、fluoxetine の長期投与により pERK1/2 が持続的に低下することを報告した。一方、IMI は海馬 ERK サブタイプのリン酸化を抑えず、選択的に前頭葉の細胞質における ERK1 リン酸化を増加するという報告もある。これらのことは、薬物特異的な細胞内標的が存在することを示唆している。ラットモデルにおいて、CREB は抗うつ薬の慢性投与により制御を受け、CREB 増加に伴う抗うつ様行動を示す。これらは本研究結果に符合し、CREB がうつ行動において評価しうるマーカーであることが示唆されている (Blendy 2006)。

BDNF は脳内で広く分布し、特に痛覚 - 情動系機構に豊富で、痛み、記憶、気分障害に関与する。BDNF は、軸索伸展、神経伝達の変調、シナプス可塑性に重要な役割を果たし (Kafitz et al. 1999), また虚血性神経損傷を予防する (Beck et al. 1994) . 成熟マウスの脳内 BDNF の欠失は、痛覚過敏およびうつ病をもたらす (Heldt et al. 2007). 従って、慢性疼痛における BDNF の不足は、うつ様行動を誘発することが考えられる。本研究において、CCI 後の慢性疼痛に併発したうつは IMI により是正され、この効果は 5,7-DHT および抗 BDNF 中和抗体により拮抗された。このことは、BDNF 投与により侵害刺激後の痛覚過敏症を抑えたとした Cejas ら (2000) の報告に符合する。

細胞内の主たるシグナル pERK1/2 および pCREB-BDNFmRNA 経路は、連鎖して機能を発揮することが知られている。しかし、pERK1/2 の過剰な活性化は、慢性疼痛に併発するうつにおいて、下流カスケードの障害をもたらす。さらに、細胞内 Ca 増加は、Ca-依存性 PKC を活性化し、さらに PKC は pERK1/2 を刺激する (Alkon et al. 2005). 本研究から、IMI が ACC および RVM における pERK1/2

活性を正常化し、RVMにおけるBDNF mRNA発現を誘導した。これらの結果は先行研究(Ishikawa 2011; Fukuhara et al. 2012)および他の報告(Moisset and Bouhassira 2007; Cao et al. 2009; Cao et al. 2012; Tripp et al. 2012; Ishikawa et al. 2014)と符合し、IMIが神経傷害性疼痛にBDNFを誘導し有益な効果をもたらすことが明らかとなった。

以上から、IMIの抗うつ効果は、特定脳領域において損傷したシナプス伝達およびシグナルカスケードを是正することで発揮されることが示唆される。BDNFはPKCとのフィードバック相互作用を有し、情動系機能に必須である(Alkon et al. 2005)。従って、IMIによるBDNF mRNA発現の促進は、5-HT受容体の活性化により惹起され(Gardier 2013)、セロトニンを介してPKA-CREB経路に関与したものと示唆される。これらの結果から、BDNFが痛覚-情動系機構、特に脳幹RVMにおいて重要な役割を果たすこと、また抗うつ作用において必須であることが明らかとなった(Schmidt and Duman 2007)。IMIの治療効果を理解するため、この分子メカニズムのさらなる解明が必要である。

5. 小 括

Imipramineは、慢性疼痛に伴ううつ様行動を改善した。この抗うつ効果は、5,7-DHT、抗BDNF中和抗体及びK252aにより拮抗された。さらにImipramineは、5-HT神経含有脳幹細胞群において、pERK1/2の過剰活性化、pCREBの低下、5-HTおよびBDNF低下を抑止した。以上から、imipramineは、5-HT神経機構を活性化するとともにBDNF産生を亢進していることが明らかとなった。

6. 引用文献

- Alkon DL, Epstein H, Kuzirian A, Bennett MC, Nelson TJ (2005) Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16432–16437
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab* 14(4):689–692

- Bennett GJ, Xie YK (1988) A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33(1):87–107
- Blendy JA (2006) The role of CREB in depression and antidepressant treatment. *Biol Psychiatry* 59(12):1144-1150
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *J Psychiatry* 157(1):115–118
- Cao H, Gao YJ, Ren WH, Li TT, Duan KZ, Cui YH, Cao XH, Zhao ZQ, Ji RR, Zhang YQ (2009) Activation of extracellular signal-regulated kinase in the anterior cingulate cortex contributes to the induction and expression of affective pain. *J Neurosci* 29(10):3307–3321
- Cao H, Ren WH, Zhu MY, Zhao ZQ, Zhang YQ (2012) Activation of glycine site and GluN2B subunit of NMDA receptors is necessary for ERK/CREB signaling cascade in rostral anterior cingulate cortex in rats: implications for affective pain. *Neurosci Bull* 28(1):77–87
- Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, McKillop M, McKillop J, Plunkett JA, Oudega M, Eaton MJ (2000) Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete brain-derived neurotrophic factor attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 86(1-2):195–210
- Duric V, McCarson KE (2006) Persistent pain produces stress-like alterations in hippocampal neurogenesis and gene expression. *J Pain* 7(8):544–555
- Fukuhara K, Ishikawa K, Yasuda S, Kishishita Y, Kim HK, Kakeda T, Yamamoto M, Ishikawa T (2012) Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF). *Cell Mol Neurobiol* 32(6):971–977
- Fumagalli F, Molteni R, Calabrese F, Frasca A, Racagni G, Riva MA (2005) Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem* 93(6):1551–1560
- Gardier AM (2013) Antidepressant activity: contribution of brain microdialysis in knock-out mice to the understanding of BDNF/5-HT transporter/5-HT autoreceptor interactions. *Front Pharmacol* 4:98
- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) Hippocampus-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of

- aversive memories. *Mol Psychiatry* 12(7): 656–670
- Hosang GM, Shiles C, Tansey KE, McGuffin P, Uher R (2014) Interaction between stress and the BDNF Val66Met polymorphism in depression: a systematic review and meta-analysis. *BMC Med* 12:7
- Ishikawa K (2011) Possible involvement of brain-derived neurotrophic factor in analgesic effects of 4-methylcatechol on neuropathic pain. *Bull Yamaguchi Med Sch* 57(3–4):49–56
- Ishikawa K, Yasuda S, Fukuhara K, Iwanaga Y, Ida Y, Ishikawa J, Yamagata H, Ono M, Kakeda T, Ishikawa T (2014) 4-Methylcatechol prevents derangements of brain-derived neurotrophic factor and TrkB-related signaling in anterior cingulate cortex in chronic pain with depression-like behavior. *NeuroReport* 25(4):226–232
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999) Neurotrophinevoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401(6756):918–921
- Kuhn M, Popovic A, Pezawas L (2014) Neuroplasticity and memory formation in major depressive disorder: an imaging genetics perspective on serotonin and BDNF. *Restor Neurol Neurosci* 32(1):25–49
- Larsen MH, Mikkelsen JD, Hay-Schmidt A, Sandi C (2010) Regulation of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in the chronic unpredictable stress rat model and the effects of chronic antidepressant treatment. *J Psychiatr Res* 44(13):808–816
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66(6):355–474
- Moisset X, Bouhassira D (2007) Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage* 37 Suppl 1:S80–S88
- Moisset X, Bouhassira D, Denis D, Dominique G, Benoit C, Sabate JM (2010) Anatomical connections between brain areas activated during rectal distension in healthy volunteers: a visceral pain network. *Eur J Pain* 14(2):142–148
- Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009) Antidepressants inhibit P2X4 receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 5:20
- Paxinos G, Watson C (1998) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, 4th edn. Academic Press, New York
- Pilar-Cue'llar F, Vidal R, Dı'az A, Castro E, Dos Anjos S, Vargas V, Romero B,

- Valdiza'n EM (2014) Signaling pathways involved in antidepressant-induced cell proliferation and synaptic plasticity. *Curr Pharm Des* 20(23):3776-94
- Porsolt RD, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Euro J Pharmacol* 47(4):379-391
- Schmidt HD, Duman RS (2007) The role of neurotrophic factors in adult hippocampal neurogenesis, anti-depressant treatments and animal models of depressive-like behavior. *Behav Pharmacol* 18(5-6):391-418
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci SA* 93(9):3908-3913
- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(6):399-409
- Takano K, Yamasaki H, Kawabe K, Moriyama M, Nakamura Y (2012) Imipramine induces brain-derived neurotrophic factor mRNA expression in cultured astrocytes. *J Pharmacol Sci* 120(3):176-186
- Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 169(11):1194-1202
- Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev* 46(3):295-309

関連論文：

Seiko Yasuda, Mitsuhiro Yoshida, Hirotaka Yamagata, Yasutake Iwanaga, Hiromi Suenaga, Kozo Ishikawa, Masako Nakano, Satoshi Okuyama, Yoshiko Furukawa, Shohei Furukawa, Toshizo Ishikawa. **Imipramine Ameliorates Pain-related Negative Emotion via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor.** *Cell Mol Neurobiol* 34(8):1199-208, 2014 (DOI: 10.1007/s10571-014-0097-y)

第 3 章：鎮痛薬 Neurotropin の痛覚 - 情動系障害に対する効果：行動・ 分子薬理的解析および BDNF 誘導作用

1. 目 的

本研究では，ラット慢性疼痛モデルを用い，臨床でセロトニン作用が期待され使用されている鎮痛薬 Neurotropin[®] (NTP)について，まず濃度依存性の鎮痛および抗うつ効果を調べ，また細胞内シグナル阻害薬の修飾作用によりその作用機序を調べる．さらに，脳内情動系における細胞内シグナル（pERK1/2, pCREB）や 5-HT/BDNF 含量および BDNF mRNA 発現に及ぼす影響を，鎮痛薬 pregabalin (PG) とどのような差異があるか，合わせて検討する．

2. 実験材料および方法

本実験は，山口大学動物実験委員会の実験方針，倫理基準ならびに動物の愛護および管理に関する法律昭和 48 年第 105 号，第 6 条を遵守して行った．

動物および慢性疼痛モデル

第 2 章で述べた内容に基づき行った．

脳室内カテーテル留置術

第 2 章で述べた内容に基づき行った．

測定項目

疼痛反応潜時 (PWL)，強制水泳試験 (FST)，免疫組織化学染色，Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs)，および Reverse Transcription-PCR (RT-PCR)法は，第 2 章で述べた内容に基づき行った．

実験群

ラットを以下の 7 群に任意に分け実験を行った．なお偽手術群 (Sham)では生理食塩水(0.5ml, 大塚製薬(株), 徳島)を経口投与した．NTP (100 NU/kg) は経口投

与し，PWL 試験および FST 試験は，NTP 投与後 1 時間で行った．

- 1) 偽手術群(Sham): Pentobarbital 麻酔および坐骨神経部位開創術のみ施行後，14 日間観察．
- 2) 非治療群(Untreated): 生理食塩水 0.5ml を CCI 後 7 日目より 7 日間連日経口(po.)投与．
- 3) NTP 群 + aCSF 群: NTP を CCI 後 7 日目より 7 日間連日 po.投与し，14, 15 日目に K252a を i.c.v 投与．
- 4) NTP + K252a 群: 3) と同様に CCI 後 14, 15 日目に BDNF 受容体 TrkB 阻害剤 K252a (25 µg/5 µL) を i.c.v 投与．
- 5) NTP + DHT 群: 3) と同様に CCI 後 14, 15 日目に 5-HT 神経毒 5,7-Dihydroxytryptamine (5,7-DHT: 200 µg/5µL)を i.c.v 投与．
- 6) Pregabalin 群 + aCSF 群: Pregabalin (10 mg/kg) を CCI 後 7 日目より 7 日間連日 po.投与．
- 7) Pregabalin + K252a 群: 6) と同様に CCI 後 14, 15 日目に K252a を i.c.v 投与．

薬物およびその調整

NTP (日本臓器製薬(株)より提供された)は，生理食塩水で調整した．K252a (Code No. K0021, LKT Labs, Inc., USA) は 10%DMSO で溶解しその後生理食塩水で調整した．その他の薬剤は第 2 章の方法と同様に行った．

データの統計学的解析

行動評価，免疫組織染色による陽性細胞数，BDNF 含量および BDNF mRNA の結果は，それぞれ平均値±標準誤差(SEM)で表した．統計学的解析は，二元配置分散分析法(Two-Way ANOVA)を用い，有意な場合は Tukey 法で各平均値間を多重比較した． $P < 0.05$ を有意とした．

3. 結果

1. NTP の CCI 後の疼痛反応潜時(PWL)に及ぼす影響

プランターテストを用い，神経障害性疼痛における NTP の効果を評価した．Sham 群では，測定した慢性期 2 週間において，PWL 値には左右差はなかった．また，UT 群では，CCI 後 3 日目より病側下肢の PWL が次第に低下し，14 日

目まで持続した。NTP+aCSF 群では、CCI 後慢性期（10-14 日）における PWL の低下が有意に是正された。

2. NTP の鎮痛効果に対する修飾作用

脳内の BDNF および 5-HT の関連性について、慢性疼痛時における NTP の鎮痛効果を検討した（Fig. 1）。NTP+aCSF 群の鎮痛効果は、NTP+DHT 群（選択的セロトニン作動性神経毒）、NTP+K252a 群（TrkB 受容体阻害薬）より拮抗された。Pregabalin+aCSF 群でも、NTP+aCSF 群と同程度の鎮痛効果を示したが、K252a i.c.v 投与では有意な変化がみられなかった（Fig. 1）。

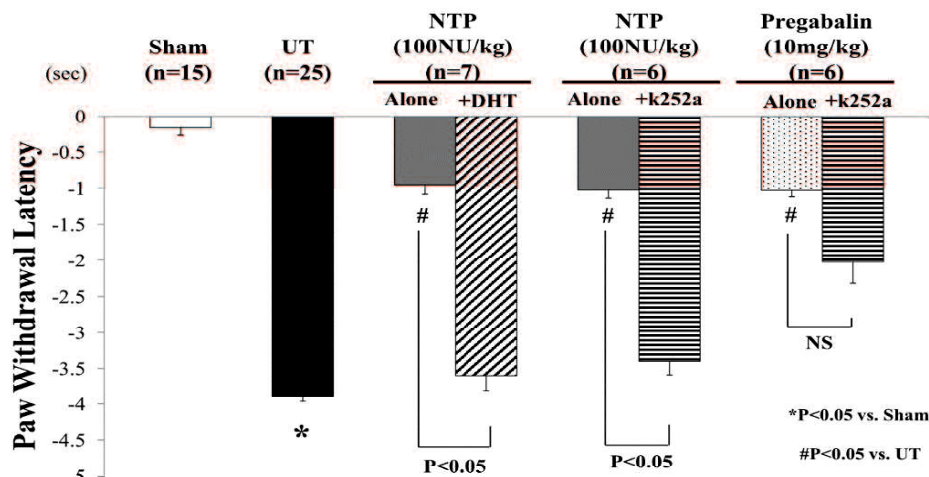


Fig. 1 The analgesic effects of Neurotropin® (NTP) and its modulation by either DHT or a BDNF inhibitor. Each column is shown as the mean \pm SEM. * $P<0.05$ vs. Sham-operated. # $P<0.05$ vs. UT

3. NTP の CCI 後うつ様行動に対する効果

FST 試験での不動時間延長をうつ様行動として評価した結果を Fig. 2 に示す。UT 群では sham 群に比べ、不動時間が有意に延長した。また NTP+aCSF 群では、CCI 後 15 日目における不動時間の延長が著しく軽減された（データ未記載）。

4. NTP の抗うつ様効果に対する修飾作用

脳内 BDNF および 5-HT の関連性について、慢性疼痛時における NTP の抗うつ効果を、FST 試験を用い検討した（Fig. 2）。NTP+aCSF 群の抗うつ効果は、NTP+DHT 群および IMI+K252a 群で拮抗された（Fig. 2）。一方、Pregabalin+aCSF 群もしくは +K252a 群では不動時間の延長に影響しなかった。

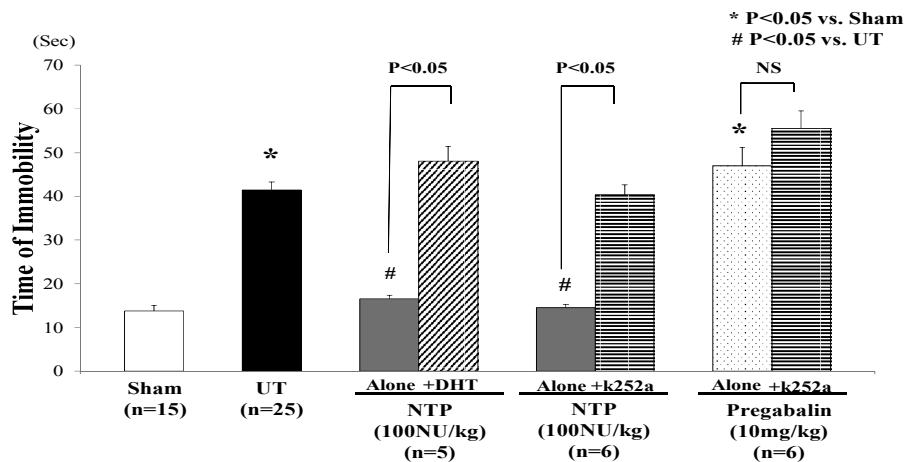


Fig. 2 Anti-depressive effect of Neurotrophin® (NTP) and by either a 5-HTergic or a BDNF inhibitor in chronic constriction injury (CCI) rats. Each column is shown as the mean \pm SEM. * P<0.05 vs. Sham-operated.

5. NTP の脳内 pERK1/2 および pCREB 活性に及ぼす影響

Fig. 3 に pERK1/2 の代表的陽性細胞像を示す. CCI 後の慢性期 (Untreated 群) では, ACC, RVM での pERK1/2 陽性細胞数は有意に増加し, NTP+aCSF 群では, これらの増加が有意に軽減された (Fig. 4). また, Fig. 5 に pCREB の代表的陽性細胞像を示す. 慢性期 (Untreated 群) では, ACC および RVM での pCREB 陽性細胞数は有意に低下し, NTP+aCSF 群では, これらの低下が有意に軽減された (Fig. 6).

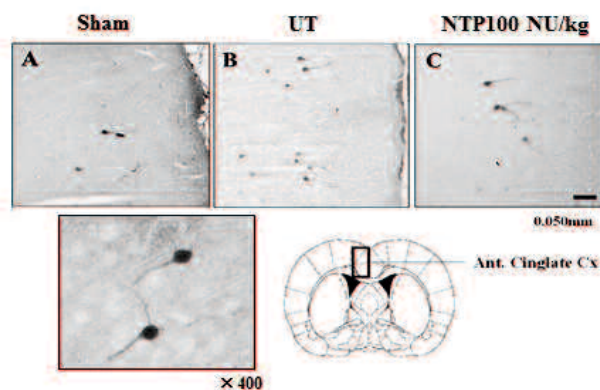


Fig. 3 Representative microphotographs for pERK1/2 immunoreactivity in the anterior cingulate cortex on day 14 after chronic constriction injury (CCI).
A: Sham group, B: Untreated group, C: NTP group

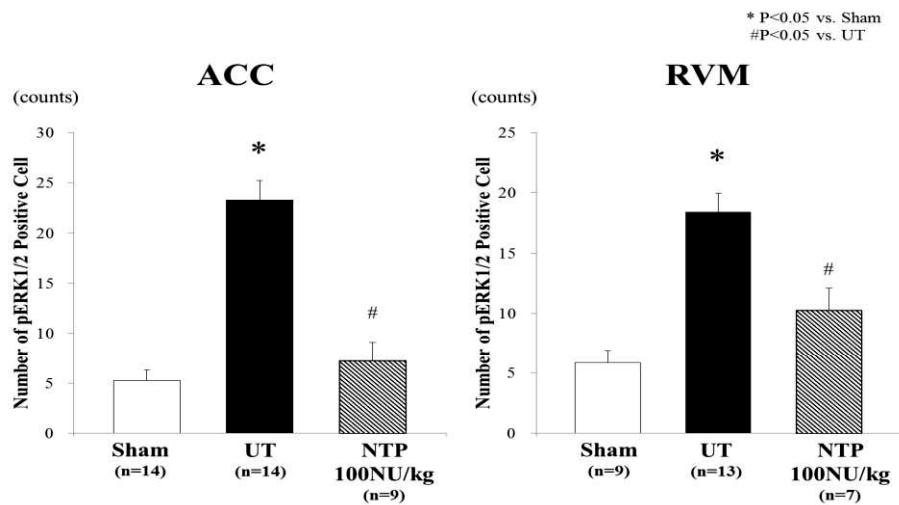


Fig. 4 The effects of Neurotrophin® (NTP) on pERK immunoreactivity in both the ACC and the RVM on the day14 after chronic constriction injury (CCI). Each column is shown as the mean \pm SEM. *P<0.05 vs. Sham-operated. # P<0.05 vs. UT

6. NTP の ACC および RVM における BDNF 含量に及ぼす影響

慢性疼痛時 (Untreated 群) では, ACC および RVM における BDNF 含量が, 著しく低下した (Fig. 7). NTP + aCSF 群では, RVM における BDNF の低下が軽減され, NTP + DHT 群で, この作用は拮抗された. 一方, pregabalin + aCSF 群 および pregabalin + K252a 群では, BDNF 含量の低下への影響は明らかではなかった.

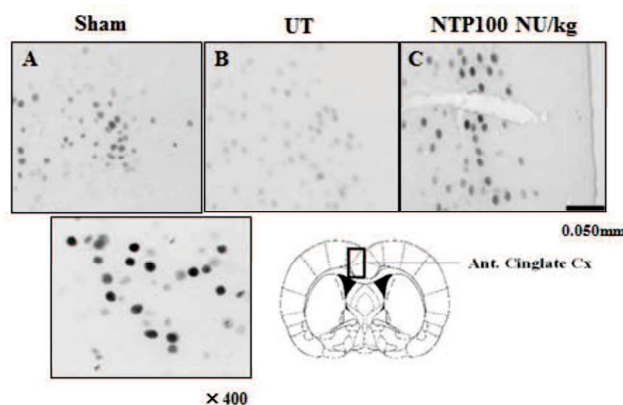


Fig. 5 Representative microphotographs for pCREB immunoreactivity in the anterior cingulate cortex on day 14 after chronic constriction injury (CCI). A: Sham group, B: Untreated group, C: NTP group

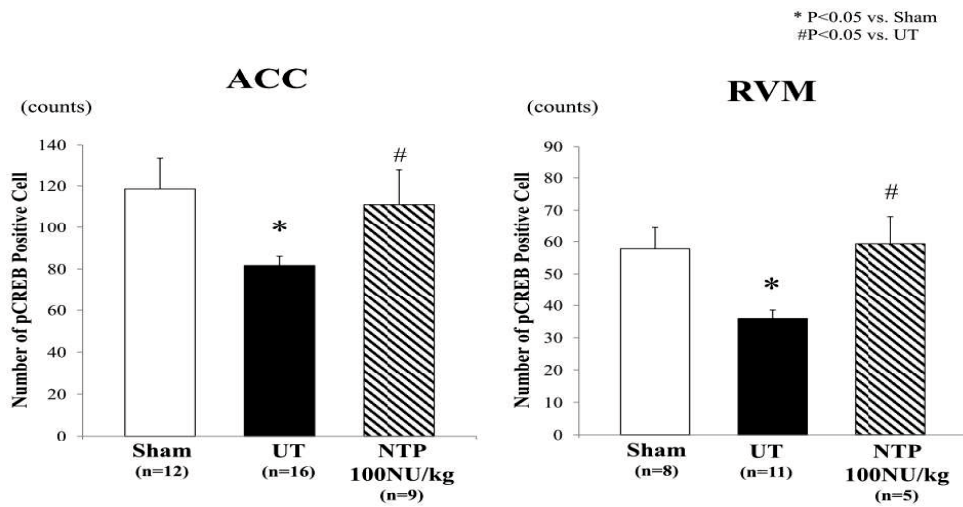


Fig. 6 The effects of Neurotrophin® (NTP) on pCREB immunoreactivity in both the ACC and the RVM on the day14 after chronic constriction injury (CCI). Each column is shown as the mean \pm SEM. *P<0.05 vs. Sham-operated. # P<0.05 vs. UT

7. NTP の ACC および RVM における BDNF mRNA 発現に及ぼす影響

慢性疼痛時 (Untreated 群) では, ACC (Fig. 8A) 及び RVM (Fig. 8B) における BDNF mRNA 発現が著しく低下した. NTP+aCSF 群では, ACC および RVM での BDNF mRNA 量の低下を有意に軽減され, NTP+DHT 群で, この作用は拮抗された (データ未記載).

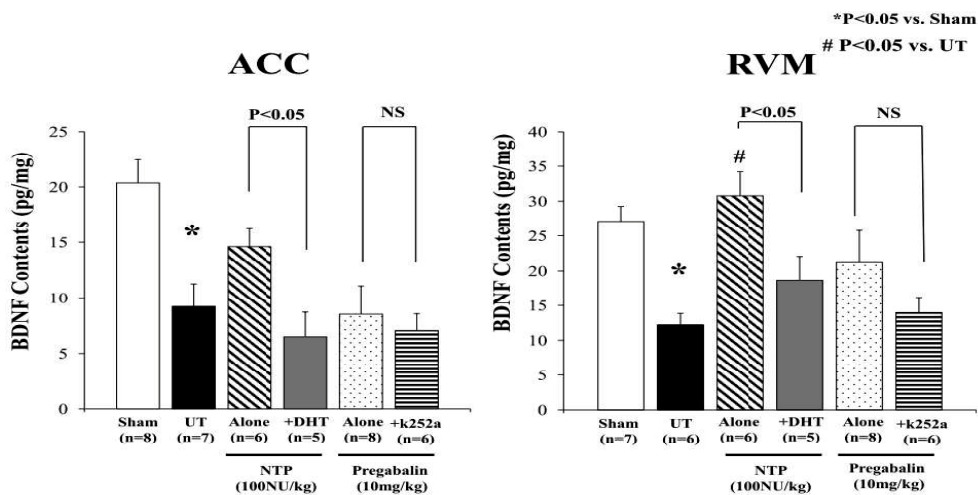


Fig. 7 The effects of Neurotrophin® (NTP) on BDNF protein level in the ACC and the RVM following chronic constriction injury (CCI). Each column is shown as the mean \pm SEM. *P<0.05 vs. Sham-operated. # P<0.05 vs. UT

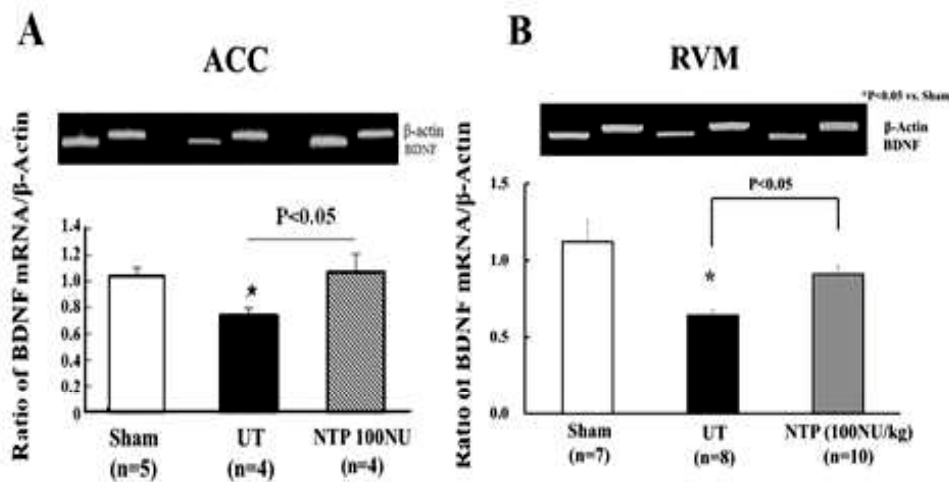


Fig. 8 The effects of Neurotropin® (NTP) on BDNF mRNA level in the ACC and the RVM in chronic constriction injury (CCI) rats. Each column is shown as the mean \pm SEM. *P<0.05 vs. Sham-operated.

4. 考 察

本研究で用いた坐骨神経を不完全結紮する CCI モデルは、慢性疼痛が緩やかに進行するヒトに類似したモデルである。慢性疼痛は、しばしばうつや不安を併発する (Moisset and Bouhassira 2007)。本研究から、鎮痛薬 NTP は pERK1/2 の異常な活性化の是正作用と、低下した BDNF の増加作用により、5-HT 作動性神経を活性化し、“痛覚 - 情動系の変調”を改善することが明らかとなった。NTP のこれらの作用は、5,7-DHT および k252a により拮抗されたことから、BDNF 誘導作用を介して、5-HT 作動性神経を活性化することが示唆される。

最近の fMRI およびポジトロン断層法の著しい進歩により、痛覚 - 情動系ネットワークの構成が解明され、脳内における痛み処理過程の理解が進んだ (Moisset and Bouhassira 2007; Moisset et al. 2010)。その結果、慢性疼痛では痛覚および情動系、特に ACC の変調が著しく関与することが多くの報告から明らかにされている (Sheline et al. 1996; Bremner et al. 2000; Duric and McCarson 2005)。

本研究からも、ラット慢性疼痛ではうつ様行動を併発するが、NTP はそれらの症状を軽減した。さらに、この効果は 5-HT 神経毒および TrkB 受容体阻害薬

により拮抗されたこと，また ACC および RVM における BDNFmRNA 発現の低下を是正したことから，BDNF 誘導作用を有することが明らかとなった．これらの結果は，BDNF 誘導剤が鎮痛および抗うつ効果を発揮すること (Fukuhara et al. 2012) や，BDNF 欠失によりうつおよび慢性痛が誘発されることを示した報告 (Heldt et al. 2007) と一致する．

一般に，モノアミン作動性神経，特に RVM 由来 5-HT 作動性神経は PAG からの入力を受け，不安もしくはうつ誘発を調節しており (Millan 2002) ，その機能低下はこれらの行動異常に密接に関与することが知られている (Vanegas and Schaible 2004) ．したがって，気分障害の調節を目的に，三環系抗うつ薬が慢性疼痛の治療に併用剤として用いられることが多い (Sindrup et al. 2005; Nagata et al. 2009) ．慢性疼痛の治療は鎮痛薬が主に用いられるが，5-HT 作動性薬剤のように，鎮痛効果に加え，抗うつ効果を有するものがある．本研究の NTP のような薬理作用については，fluoxetine 治療により pERK1/2 の持続的低下をもたらすことが報告されている (Fumagalli et al. 2005) ．

BDNF は，軸索伸展，神経伝達の変調やシナプス可塑性における役割 (Kafitz et al. 1999) のほか，神経保護作用 (Beck et al. 1994) がよく知られている．さらに本研究に関しては Heldt ら (2007) が，BDNF の欠失マウスが痛覚過敏およびうつ病を易発症することを報告している．従って，慢性疼痛における BDNF 不足は，うつ様行動を誘発している可能性がある．本研究結果から，NTP は慢性疼痛およびうつ症状を是正し，この効果は 5,7-DHT および K252a により拮抗されたことは，Cejas ら (2000) の報告にも符合し，“痛覚 - 情動系の変調”における BDNF の重要な役割が示唆される．

pERK1/2 および pCREB-BDNFmRNA 経路の共役は，正常な状態では滞りなく連鎖している．本研究結果から，pERK1/2 が過剰に活性化するところが判明し，これらの結果は多くの先行研究と符合する (Moisset and Bouhassira 2007; Cao et al. 2009; Cao et al. 2012; Tripp et al. 2012; Ishikawa et al. 2014) ．つまり，慢性疼痛では，TrkB 受容体の下流シグナルが変調を起こすとともに，細胞内 Ca の増加から Ca 依存性 PKC を活性化し，さらに PKC は pERK1/2 を刺激するためと考えられる (Alkon et al. 2005) ．NTP は ACC および RVM における pERK1/2 活性を正常化し慢性疼痛を改善するものである．

NTP は、ウサギの皮膚にワクシニアウイルスを注射し、炎症を起こした部位より採取した物質を抽出精製したものである。今までの報告から、NTP は下行性疼痛抑制系の活性化作用を介して鎮痛効果を発揮し (Kawamura et al. 1998; Okazaki et al. 2008; Miura et al. 2005)、帯状疱疹後神経痛や線維筋痛症などの難治性神経障害性疼痛の治療に広く用いられる。しかし、NTP のこれらの効果に、BDNF 合成誘導作用が関与しているかは不明であった。本研究から NTP が細胞内シグナルおよび BDNF 合成を促進することが初めて明らかとなった。一方、慢性疼痛の治療薬として使用されている pregabalin は、本研究結果からは、BDNF の合成および抗うつ効果については、明らかではなかった。薬理学的作用として、本薬剤はシナプス前の Ca チャネル阻害作用がよく知られるが、細胞内で BDNF 合成系に作用しないことがその理由と考えられる。

今回の研究において、ACC 領域で pERK1/2 が異常に活性化することが判明した。先行研究により、慢性疼痛に併発するうつ症状は、ACC 領域の異常な活性化により、下流カスケードが阻害されることが分かっている (Fukuhara et al. 2012; Ishikawa et al. 2014)。NTP は、ACC における pERK1/2 の異常な活性化と BDNF 合成低下を是正した。さらに、NTP の鎮痛効果は、5-HT₂、5-HT₃ 阻害薬投与で NTP の鎮痛作用が消失することからも、抑制性の介在ニューロンを刺激することから、下行性疼痛抑制系に強い作用を有することが示唆される (Kawamura et al. 1998)。しかし、本研究以外には、神経障害性疼痛における NTP の抗うつ効果に関しては、今までほとんど報告がなかった。

体性感覚は、痛みの感覚 - 弁別性に関与するのに対し、前頭葉や ACC は、痛覚 - 情動に関与する。下行性痛覚抑制系は、通常脊髄後角の侵害受容伝達を阻害する (Gebhart 2004; Suzuki et al. 2004; Ossipov and Gregory 2010)。しかし、慢性疼痛では、この機能が低下する (Fukuhara et al. 2012; Ishikawa et al. 2014)。

脳幹網様体は多数のニューロン群からなり、中でも髄板内核は脊髄へ投射し、侵害情報の調節に関与する。縫線核や隣接する核群は 5-HT を含有し、脊髄背外側束を介して後角表層に投射し、5-HT 放出を促進し、痛覚情報が集まる WDR ニューロンを過分極状態にする (Lipp 1991)。このことは、モルヒネの 5-HT 含有細胞群である大縫線核への注入、tail-flick 反応時間が延長される (Stamford 1995)、5-HT 神経毒 5,7-DHT や 5-HT 阻害薬の脊髄投与により、tail-flick 反応時間の延長が軽減されることから理解できる。

本研究から、NTPにより気分障害に関連するACCおよび5-HT作動性神経の起始部であるRVMにおけるBDNF mRNA発現が増加した。三環系抗うつ薬は、BDNF放出を促進する5-HT作動性神経を活性化するという報告がある。BDNFが海馬歯状回での細胞新生を促すことも報告されており、これらの報告は本研究結果と符合する。さらに、本研究の基盤となった神経栄養因子誘導剤4-MCが、末梢神経傷害後の痛覚過敏および併発するうつ様症状を改善した。Furukawaら(1989)は、4-MCがラット培養細胞でBDNF mRNA発現およびBDNF放出を増加することを報告した。またその作用は様々な末梢神経障害を改善することが報告された(Hanaoka et al. 1994; Saita et al. 1996)。

以上のことから、NTPは”痛覚 - 情動系の変調”を改善し、その作用はモノアミン作動性神経の活性化だけではなくPKA-CREB経路の促進、BDNF mRNA発現の増加作用を介してBDNF不足を是正し、神経伝達の変調を軽減することが示唆される。

5. 小括

痛覚 - 情動系の変調におけるNTPの神経薬理的な作用メカニズムについて解析を試みた。病態発症には、痛覚 - 情動系回路網および下行性疼痛抑制系の機能の変調が関与することが明らかとなった。NTPはラット慢性疼痛モデルにおいて、鎮痛および抗うつ効果を発揮し、その効果は下行性疼痛抑制系(5-HT神経)の活性化作用に加え、間接的なBDNF合成誘導の関与が判明した。以上から、NTPはうつ様症状を併発した慢性疼痛に対する原因治療が期待される。

6. 引用文献

- Alkon DL, Epstein H, Kuzirian A, Bennett MC, Nelson TJ (2005) Protein synthesis required for long-term memory is induced by PKC activation on days before associative learning. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:16432–16437
- Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A (1994) BDNF protects against ischemic

- cell damage in rat HC. *J Cereb Blood Flow Metab* 14:689–692
- Bremner JD, Narayan M, Anderson ER, Staib LH, Miller HL, Charney DS (2000) Hippocampal volume reduction in major depression. *Am J Psychiatry* 157(1):115–118
- Cao H, Cui YH, Zhao ZQ, Cao XH, Zhang YQ (2009) Activation of ERK in the ACC contributes to the induction of long-term potentiation in rats. *Neurosci Bull* 25(5):301–308
- Cao H, Ren WH, Zhu MY, Zhao ZQ, Zhang YQ (2012) Activation of glycine site and GluN2B subunit of NMDA receptors is necessary for ERK/CREB signaling cascade in rostral anterior cingulate cortex in rats: implications for affective pain. *Neurosci Bull* 28(1):77–87
- Cejas PJ, Martinez M, Karmally S, McKillop M, McKillop J, Plunkett JA, Oudega M, Eaton MJ (2000) Lumbar transplant of neurons genetically modified to secrete BDNF attenuates allodynia and hyperalgesia after sciatic nerve constriction. *Pain* 86:195–210
- Duric V, McCarson KE (2005) Hippocampal neurokinin-1 receptor and BDNF gene expression is decreased in rat models of pain and stress. *Neuroscience* 133(4):999–1006
- Fukuhara K, Ishikawa K, Yasuda S, Kishishita Y, Kim HK, Kakeda T, Yamamoto M, Norii T, Ishikawa T (2012) Intracerebroventricular 4-methylcatechol (4-MC) ameliorates chronic pain associated with depression-like behavior via induction of BDNF. *Cell Mol Neurobiol* 32:971–977
- Fumagalli F, Molteni R, Calabrese F, Frasca A, Racagni G, Riva MA (2005) Chronic fluoxetine administration inhibits extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation in rat brain. *J Neurochem* 93(6):1551–1560
- Furukawa Y, Tomioka N, Sato W, Satoyoshi E, Hayashi K, Furukawa S (1989) Catecholamine increase nerve growth factor mRNA content in both mouse astroglial cells and fibroblast cells. *FEBS Lett* 247:463–467
- Gebhart GF (2004) Descending modulation of pain. *Neurosci Biobehav Rev* 27:729–737
- Hanaoka Y, Ohi T, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, Matsukura S (1994) The therapeutic effects of 4-methylcatechol, a stimulator of endogenous nerve growth factor synthesis, on experimental diabetic neuropathy in rats. *J Neurol Sci* 122:28–32

- Heldt SA, Stanek L, Chhatwal JP, Ressler KJ (2007) HC-specific deletion of BDNF in adult mice impairs spatial memory and extinction of aversive memories. *Mol Psychiatry* 12(7):656–670
- Ishikawa K, Yasuda S, Fukuhara K, Iwanaga Y, Ida Y, Ishikawa J, Yamagata H, Ono M, Kakeda T, Ishikawa T (2014) 4-Methylcatechol prevents derangements of brain-derived neurotrophic factor and TrkB-related signaling in anterior cingulate cortex in chronic pain with depression-like behavior. *Neuroreport* 25(4): 226–232
- Kafitz KW, Rose CR, Thoenen H, Konnerth A (1999) Neurotrophinevoked rapid excitation through TrkB receptors. *Nature* 401(6756):918–921
- Kawamura M, Ohara H, Go K, Koga Y, Ienaga K (1998) Neurotrophin induces antinociceptive effect by enhancing descending pain inhibitory systems involving 5-HT₃ and noradrenergic alpha₂ receptors in spinal dorsal horn. *Life Sci* 62(24):2181–2190
- Lipp J (1991) Possible mechanisms of morphine analgesia. *Clin Neuropharm* 14:131–147
- Millan MJ (2002) Descending control of pain. *Prog Neurobiol* 66:355–474
- Miura T, Okazaki R, Yoshida H, Namba H, Okai H, Kawamura M (2005) Mechanisms of analgesic action of neurotrophin on chronic pain in adjuvant-induced arthritic rat: roles of descending noradrenergic and serotonergic systems. *J Pharmacol Sci* 97(3):429–436
- Moisset X, Bouhassira D (2007) Brain imaging of neuropathic pain. *Neuroimage* 37:S80–88
- Moisset X, Bouhassira D, Denis D, Dominique G, Benoit C, Sabate' JM (2010) Anatomical connections between brain areas activated during rectal distension in healthy volunteers: a visceral pain network. *Eur J Pain* 14(2):142–148
- Nagata K, Imai T, Yamashita T, Tsuda M, Tozaki-Saitoh H, Inoue K (2009) Antidepressants inhibit P2X₄ receptor function: a possible involvement in neuropathic pain relief. *Mol Pain* 5:20
- Okazaki R, Namba H, Yoshida H, Okai H, Miura T, Kawamura M (2008) The antiallodynic effect of Neurotrophin is mediated via activation of descending pain inhibitory systems in rats with spinal nerve ligation. *Anesth Analg* 107(3):1064–1069

- Ossipov MH, Gregory O (2010) Central modulation of pain. *J Clin Invest* 120:3779–3787
- Paxinos G, Watson C (1998) *The rat brain in stereotaxic coordinates*, 4th ed. Academic Press, New York
- Saita K, Ohi T, Hanaoka Y, Furukawa S, Furukawa Y, Hayashi K, Matsukura S (1996) A catechol derivative (4-methylcatechol) accelerates the recovery from experimental acrylamide-induced neuropathy. *J Pharmacol Exp Ther* 276:231–237
- Sheline YI, Wang PW, Gado MH, Csernansky JG, Vannier MW (1996) Hippocampal atrophy in recurrent major depression. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:3908–3913
- Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS (2005) Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 96(6):399–409
- Stamford JA (1995) Descending control of pain. *Br J Anaesth* 75:217–227
- Sun MK, Alkon DL (2008) Effects of 4-methylcatechol on spatial memory and depression. *NeuroReport* 19(3):355–359
- Suzuki R, Rygh LJ, Dickenson AH (2004) Bad news from the brain: descending 5-HT pathways that control spinal pain processing. *Trends Pharmacol Sci* 25:613–617
- Tripp A, Oh H, Guilloux JP, Martinowich K, Lewis DA, Sibille E (2012) Brain-derived neurotrophic factor signaling and subgenual anterior cingulate cortex dysfunction in major depressive disorder. *Am J Psychiatry* 169(11):1194–1202
- Vanegas H, Schaible HG (2004) Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? *Brain Res Rev* 46:295–309

参考論文

Toshizo Ishikawa, Seiko Yasuda, Seiji Minoda, Takae Ibuki, Kayoko Fukuhara, Yasutake Iwanaga, Toru Ariyoshi, Hironori Sasaki: Neurotrophin® Ameliorates Chronic Pain via Induction of Brain-derived Neurotrophic Factor. **Cell Mol Neurobiol** 34, 2014 (DOI: 10.1007/s10571-014-0118-x)

総 括

長引く疼痛は、しばしば不安、嫌悪、うつ、恐怖など、負の情動（不快情動）を伴い、生活の質を著しく低下させるだけでなく、情動障害となり痛みの悪循環をつくる。このような情動的側面については未だ不明な点が多い。したがって、慢性疼痛では痛み管理に加え、気分障害を如何に取り除くか、その科学的根拠に基づく治療法の確立が急務である。

こうした中、本研究では慢性疼痛の病態メカニズムについて感情調節および下行性抑制系神経を関連させ、細胞シグナルと神経栄養因子の変調の面より解析したものである。さらに、慢性疼痛の治療によく用いられモノアミン作用を有する三環系抗うつ薬 *imipramine* および鎮痛薬 *Neurotropin* について、その作用を調べたところ神経栄養因子を誘導する作用が見出された。

慢性疼痛の情動的側面については最近、機能的脳イメージング法により、著しく解明が始まった。もっとも画期的な進展をもたらしたのは、*functional magnetic resonance imaging (fMRI)* といえる。今までに慢性疼痛では情動系における脳活性が起きることがほぼ一致して報告されている (*Moisset and Bouhassira.2007; Gustin et al.2010*)。つまり、慢性疼痛において不快情動系の前帯状回や関連部位である扁桃核、海馬や視床下部 (*Sheline et al. 1996*)、さらには、これらの神経活性に連鎖した下行性抑制系における細胞機能が他の神経回路以上に活性化するとされる。したがって、慢性痛や随伴するうつ症状などを科学的に解析するためには、関連する痛覚 - 情動系ネットワークにおける神経機能の異常やそれに関与する分子機構の解明が課題となっている (*Fig. 1* 参照)。

本研究は、こうした観点から慢性疼痛の病態を痛覚 - 情動系について、その分子機構を解析するため細胞シグナルや神経栄養因子の遺伝子レベルより解析を試みたところ、これら神経回路が連携して不快情動を表現していることが判明した。さらに、下行性抑制系の *RVM* は気分の変調に関与した上位脳由来の連絡をうけ、調べたシグナル変化でも連鎖すること可能性が明らかとなった。およそ以下の2点が本研究により解明が促進したと考えている。

まず、慢性疼痛に併発するうつは、求心性侵害受容の視床内側系へ大きな刺激が伝わり、不快情動を引き起こしていると思われる。*IMI* および *NTP* は、この中心的細胞群である *ACC* で *BDNF* に関連するシグナル *pERK* の異常な活性化を抑制した。このシグナルは、下流には核内で *BDNF* の産生にも関連するもので、前述の *NTP* が *BDNF mRNA* を増加することとも符号する結果と考

えられる(Fig. 2 参照).

痛みに伴う不安, 抑うつなどの不快情動は, 警告としての生理的役割にとって重要である. しかし, 慢性疼痛ではこれらの不快情動は生活の質を著しく低下させ, また情動障害の引き金ともなり, さらに精神状態から痛みをさらに悪化させる“悪循環”を生じさせる. 今後, 痛みによる不快情動を明らかにし, 身と心の両方を苦痛から解放することが, 疼痛治療に極めて重要とされる.

本研究は, 慢性疼痛の病態を”痛覚 - 情動系の変調”としてとらえ, イメージ法で診断しながら, その治療は最少量の薬物併用なども考え, 合理的疼痛管理を目指す上で, 基礎的知見として有用と考えらる.

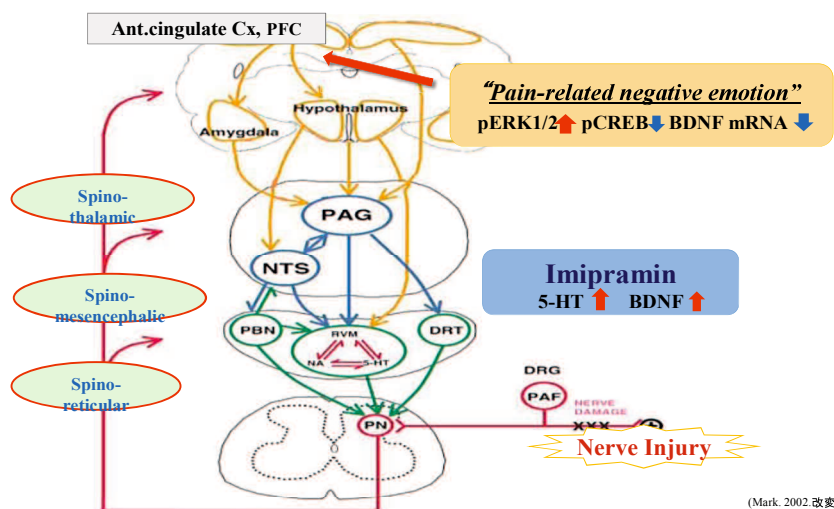


Fig. 1 Schematic drawing for preventing “pain-emotion” state during chronic pain.

See text for detailed explanation.

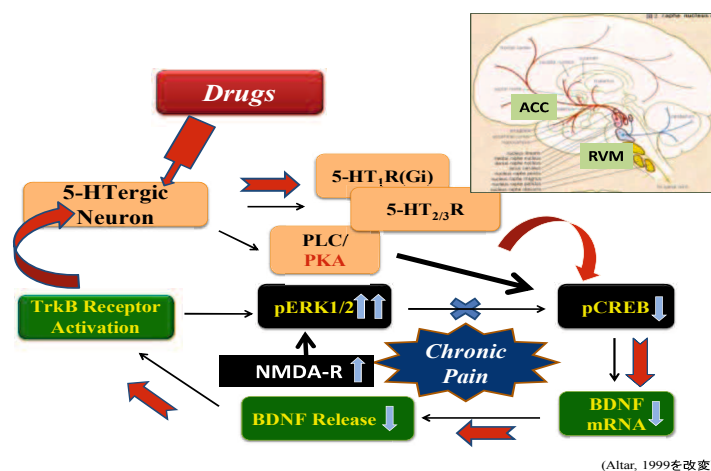


Fig. 2 Possible mechanisms for inducing BDNF by injecting imipramin or neurotrophin during chronic pain.

結 論

本研究ではラット慢性疼痛モデルを用い、併発する気分障害の機構解析および神経栄養因子治療の可能性を検討し、その有用性について検証した。その結果、慢性疼痛にうつ症状が併発すること、そのメカニズムに不快情動に関与する前帯状回のシグナルおよび神経栄養因子（BDNF）合成過程の変調が関与することが分かった。そのことから、BDNF 誘導が期待されるモノアミン神経作用薬を治療にもちいると BDNF が誘導されることが明らかとなった。さらに、下行性痛覚抑制系にも効果があることが判明した。

以上のことから、慢性疼痛に伴ううつ様症状には BDNF 不足が関与すると考えられる。また、モノアミン神経作用薬は痛覚 - 情動系および下行性痛覚抑制系に多様に作用することから、臨床応用に向けて有用な治療ターゲットとなり得ることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究に終始、懇切な御指導と御鞭撻を賜りました山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学領域 石川敏三教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行にあたり、多くのご協力を賜りました山口大学大学院医学系研究科生体情報検査学分野石川研究室の諸兄らに深く感謝致します。