

氏名	秦泉寺 紋子
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4937号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Betaine/GABA トランスポーター阻害薬 NNC 05-2090 の神経障害性疼痛に対する効果について
学位論文審査委員	杉本 朋貞 教授 前川 賢治 教授 宮脇 卓也 教授

学位論文内容の要旨

<緒言>

神経障害性疼痛とは、体性感覚伝導路の損傷や病変によって直接に引き起こされる痛みと定義され、持続性および発作性の自発痛、アロディニアなどの症状を伴う。神経障害性疼痛発症のメカニズムは現在も明らかになっていないが、抑制性の GABA 神経系に着目すると、神経障害後、GABA 合成酵素や、GABA ニューロンの減少が報告されている。また、GABA の調節を行う機構として、GABA トランスポーター (GAT) による GABA 再取り込みがあり、GABA の減少の原因として GAT の過剰発現についても報告されている。GAT には、GAT-1, GAT-2, GAT-3 と、Betaine/GABA トランスポーター (BGT-1) の4種類のサブタイプが存在し、最近、GAT-1 阻害薬に鎮痛効果があることが報告されたが、その他の GAT サブタイプに対する阻害薬を検討した報告はない。そこで本研究は、BGT-1 阻害薬である NNC 05-2090 の神経障害性疼痛に対する効果を、GAT-1 選択的阻害薬である SKF 89976A と比較検討し、さらに神経障害性疼痛と関連の強いモノアミントランスポーターへの影響についても調べた。

<材料と方法>

神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮 (partial sciatic nerve ligation: PSNL) モデルを用いた。神経障害性疼痛の評価では、坐骨神経を結紮した側を PSNL 側とし、反対側は対照側とした。遺伝子発現の評価においては、対照側は皮膚切開のみ行った (Sham 側)。試験薬として、BGT-1 阻害薬である NNC05-2090 と GAT-1 阻害薬である SKF 89976A を用いた。PSNL モデルマウス作成後 16 日目に、NNC05-2090 または SKF 89976A を $5\mu\text{l}$ (総量 15pmoles または 150pmoles) くも膜下に投与した。神経障害性疼痛の評価は von Frey フィラメントを用い、刺激に対する逃避行動を 5 回連続して起こす最小のフィラメントの値を疼痛閾値とした。次に、摘出した大脳皮質、脳幹、小脳、脊髄の組織から total RNA を抽出精製し、GABA トランスポーター遺伝子発現を評価した。さらに、GAT-1, GAT-3, BGT-1, グリシントランスポーター 1, グリシントランスポーター 2, セロトニントランスポーター, ノルアドレナリントランスポーターおよびドーパミントランスポーターの、それぞれの遺伝子を定常的に発現する細胞を作製し、NNC 05-2090 または SKF89976A と $[^3\text{H}]$ ラベルした各基質を同時に添加反応させ、基質の取り込み阻害曲線から IC_{50} を算出した。

神経障害性疼痛の評価における経時的な変化については、試験薬投与前の値に対する変化を one-way ANOVA および *post hoc* Dunnett test を用いて分析した。NNC 05-2090 と SKF 89976A の効果の比較には、対応のない T 検定を用いた。なお、P 値が 0.05 未満を有意差ありとした。

<結果>

NNC 05-2090 を 15pmoles 投与した PSNL 側では、薬物投与前の値と比較して投与後 1 時間および 2 時間で疼痛閾値が有意に上昇し、150pmoles 投与した PSNL 側では、投与後 0.5 時間で疼痛閾値は薬物投与前に比較して有意に上昇し、投与後 5 時間まで持続した。一方、SKF 89976A を 15pmoles 投与した PSNL 側で疼痛閾値に有意な変化はみられなかったが、150pmoles 投与した PSNL 側では、薬物投与前の値と比較して投与後 1 時間、2 時間および 5 時間で、疼痛閾値が有意に上昇していた。さらに、投与後 1 時間、2 および 5 時間における疼痛閾値について、150pmoles 投与した群の NNC 05-2090 と SKF 89976A を比較した結果、いずれの時間においても NNC 05-2090 が有意に疼痛閾値を上昇させていた。

神経障害性疼痛発症後の大脳皮質、小脳、脳幹、脊髄における GAT-1、GAT-3、BGT-1 の mRNA 発現を RT-PCR を用いて検討した結果、いずれの組織においても、PSNL 側と Sham 側で mRNA 発現に差は認められなかった。

GABA、セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン、およびグリシンのトランスポーターを定常発現させた細胞における、各基質の取り込み阻害効果について検討した結果、NNC 05-2090 は BGT-1 の GABA 取り込みを最も阻害していた。一方、SKF 89976A は GAT-1 に対して高い選択的阻害効果がみられた。NNC 05-2090 は SKF 89976A と比較して、セロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミン、およびグリシンの取り込みを強く阻害していた。

<考察>

神経障害性疼痛治療薬として三環系抗うつ薬、選択的セロトニン再取り込み阻害薬、およびセロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬が知られているが、GABA 再取り込み阻害薬については、GAT-1 の選択的阻害薬である NO-711 についてのみである。本研究では GAT-1 に対して NO-711 よりも強い阻害作用を持っているとされている SKF89976A と、BGT-1 阻害薬である NNC 05-2090 に注目した。その結果、NNC 05-2090 と SKF 89976A に神経障害性疼痛に対する抑制効果が認められた。また、NNC 05-2090 の神経障害性疼痛に対する抑制効果は SKF 89976A よりも強力であることから、NNC 05-2090 は GAT-1 阻害薬よりも有効な神経障害性疼痛治療薬となる可能性があると考えられた。

本研究では、神経障害性疼痛を発症したマウスの脳および脊髄における BGT-1 の mRNA の発現量を調べたが、BGT-1 そのものの神経障害性疼痛への関わりについて明確にすることはできなかった。しかし、NNC 05-2090 はセロトニン、ノルアドレナリンのトランスポーターも強く阻害していることが示されたことから、NNC 05-2090 の神経障害性疼痛に対する抑制効果には GABA トランスポーターだけでなく、モノアミントランスポーターへの効果も関与している可能性が示唆された。今後、さらに作用機序を解明する必要があるが、NNC 05-2090 が神経障害性疼痛に対して有効な治療薬になる可能性が示唆された。

学位論文審査結果の要旨

論文審査要旨

神経障害性疼痛に対する治療薬は、効果が不十分であったり、副作用が多く、新しいタイプの新薬の開発が求められている。神経障害性疼痛のメカニズムに関与している GABA 神経系は、神経障害後に GABA が減少することが報告されており、その原因の 1 つとして GABA トランスポーターの過剰発現が報告されている。GABA トランスポーターには、GAT-1, GAT-2, GAT-3 および Betaine/GABA トランスポーター (BGT-1) の 4 種類のサブタイプが存在し、最近、GAT-1 阻害薬に鎮痛効果があることが報告されたが、その他の GAT サブタイプに対する阻害薬を検討した報告はない。そこで本研究は、BGT-1 阻害薬である NNC 05-2090 の神経障害性疼痛に対する効果を、GAT-1 選択的阻害薬である SKF 89976A と比較検討し、さらに神経障害性疼痛と関連の強いモノアミントランスポーターへの影響についても調べている。

研究では、神経障害性疼痛モデルとして坐骨神経部分結紮 (PSNL) モデルが用いられ、BGT-1 阻害薬である NNC 05-2090 または GAT-1 阻害薬である SKF 89976A をくも膜下投与した後の痛覚閾値の変化を、von Frey フィラメントを用いて測定している。また PSNL 手術後のマウスの大脳皮質、小脳、脳幹および脊髄における GAT 遺伝子発現を評価している。さらに、GAT-1, GAT-3, BGT-1, グリシントランスポーター 1, グリシントランスポーター 2, セロトニントランスポーター, ノルアドレナリントランスポーターおよびドーパミントランスポーターの、それぞれの遺伝子を定常的に発現する細胞を作製し、基質の取り込み阻害に対する NNC 05-2090 または SKF 89976A の効果を調べている。

その結果、NNC 05-2090 を投与した PSNL 側では、疼痛閾値は薬物投与前に比較して有意に上昇し、同用量の SKF 89976A よりも有意に疼痛閾値を上昇させていた。また、神経障害性疼痛発症後の大脳皮質、小脳、脳幹および脊髄における GAT-1, GAT-3 および BGT-1 の mRNA 発現は、いずれの組織においても、PSNL 群と Sham 群で mRNA 発現に差は認められなかった。さらに、基質の取り込み阻害効果については、NNC 05-2090 は BGT-1 の GABA 取り込みを最も強く阻害し、さらにセロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミンおよびグリシンの取り込みも強く阻害していた。

以上の結果は、NNC 05-2090 が神経障害性疼痛に対して抑制効果を有しており、その効果には GABA トランスポーターだけでなく、モノアミントランスポーターへの影響も関与していることを示唆している。これらの知見は、神経障害性疼痛に対する治療薬を開発するにあたり、意義あるものであると評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。