

<平成23年度助成>

## 新規鎮痛作用機序を有する香辛料成分の探索

前田 武彦

(新潟薬科大学薬学部薬効薬理学)

### 緒 言

神経障害性疼痛は、神経の形態および機能的異常がもたらす慢性疼痛の一つであり、麻薬性鎮痛薬が奏功しない場合もあるなど、疼痛緩和に難渋するケースがある。現在、神経障害性疼痛への適応拡大など、既存医薬品を中心とする鎮痛薬およびその補助薬としての可能性が模索されている。病態生理学的研究から、神経炎症とそれに付随する免疫系の活性化が、神経障害性疼痛の誘導と維持に関係すると考えられている<sup>1)</sup>。

Transient receptor potential (TRP1) ファミリーに属する TRPV1 (TRP vanilloid 1) は、小型の後根神経節細胞に発現し、熱や酸ならびに炎症性メディエーターにより生じる様々な侵害刺激を統合する非選択的陽イオンチャネルである<sup>2)</sup>。TRPV1 の活性化は、炎症組織における痛覚過敏の発現に必須とされ、炎症性疼痛の治療薬創製を目指した TRPV1 拮抗薬の開発が行われてきたが、副作用などの問題があり、臨床応用には至っていない<sup>3)</sup>。一方、天然バニロイドであるカプサイシン (cap) は TRPV1 のアゴニストであり、それによる TRPV1 の活性化は初期の興奮効果に続き、長期に及ぶ脱感作を誘発する<sup>4)</sup>。この脱感作機構による感覚神経興奮応答の遮断を作用機序とする<sup>5)</sup>、TRPV1 アゴニストの鎮痛薬としての可能性が模索され、cap 軟膏が糖尿病性有痛神経障害などの神経障害性疼痛に利用されている<sup>3)</sup>。

申請者は最近、末梢神経損傷に基づく神経障害性疼痛のモデル動物を用いて、疼痛成立の新たな

機序を検索した。その結果、損傷部位の脂肪組織に炎症性マクロファージが集積し、それに伴い脂肪細胞が肥大する形態変化を見いだした。さらに、脂肪細胞由来のレプチン<sup>6)</sup>、ならびにマクロファージ由来の炎症性サイトカインおよびケモカイン<sup>7)</sup>が、疼痛の発現に関わることを明らかにした。これらの知見は脂肪細胞と免疫細胞が、疼痛の誘導・維持過程に必須である可能性を示唆する。本研究の目的は、香辛料成分の標的分子 TRP ファミリーによる脂肪細胞および免疫細胞の機能調節が慢性疼痛を緩和する可能性とその分子機構を明らかにし、香辛料成分による疼痛治療の可能性を探求することである。

### 方 法

#### 1. 実験動物

5週齢雄性の TRPV1 ノックアウトマウス (KOマウス; B6.129S4-Trpv1<sup>tm1Jul</sup>/J; Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA) および、そのコンジェニック化のために使用した C57BL/6J マウス (WTマウス; 紀和実験動物、和歌山) を実験に供した。また、免疫組織化学的検討のためにグリーンマウス (EGFPマウス, C57BL/6-Tg (CAG-EGFP) 10sb/J; Jackson Laboratory) を使用した。温度23-24℃、湿度60-70%、照明時間を8-20時とする環境にて飼育し (5匹/1ケージ)、固形試料 (MF、オリエンタルイースト、東京) および飲料水を自由に摂取させた。

#### 2. 神経障害性疼痛モデルマウス

Seltzerら<sup>8)</sup>の方法に従い、坐骨神経部分結紮

(PSL; partial sciatic nerve ligation) による神経障害性疼痛モデルマウスを作製した。すなわち、ペントバルビタール (80 mg/kg, i.p.) 麻酔下で、マウス右大腿上部の坐骨神経 (SCN) を露出し、その1/2から1/3を絹糸で結紮した。また sham (対照) 群として、坐骨神経の露出のみを行った。

### 3. 骨髄移植

KO マウスに致死量の放射線 (10Gy) を照射し、ドナーマウスの骨髄細胞  $1.0 \times 10^6$  個を尾静注した。ドナーの骨髄細胞は、頸椎脱臼させたマウスの大腿骨から調製した。ドナーとして用いたマウスは、WTマウス、KOマウスおよびEGFPマウスを使用した。それぞれのドナーマウスをWT-KOマウス、KO-KOマウスおよびEGFP-KOマウスと以下に表記した。

### 4. 免疫組織化学的染色

骨髄移植6週間後のEGFP-KOマウスにPSLを行い、PSL21日目にペントバルビタール麻酔下でリン酸緩衝食塩水 (PBS, 20 ml) を経心的に灌流することにより脱血し、その後4%パラホルムアルデヒド (PFA, 20 ml) を用いて灌流固定を行った。SCNを採取し、凍結組織切片 (厚さ  $15 \mu\text{m}$ ) を作製した。また、naiveのWTマウスより腹腔マクロファージを採取し、4% PFA液にて固定した。4%ウシ血清アルブミンを含む0.1% TritonX-100/PBS液によりブロッキング処理を行った後、一次抗体として抗TRPV1抗体 (Neuromics, Edina, MN, USA) あるいは抗F4/80抗体 (Cederlane, Ontario, Canada) を  $4^\circ\text{C}$  で一晩反応させた。洗浄後、蛍光標識2次抗体 (Alexa Flour 594-conjugated antibody, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を室温で2時間、反応させた。Perma Fluor (Thermo, Pittsburgh, PA, USA) で封入し、共焦点顕微鏡で観察した。

### 5. 行動実験

疼痛行動はPSL21日目に観察した。触アロディニア反応を評価するために、0.16 g 強度の von

Frey フィラメントを用いて6秒間、マウスの後肢足底を刺激した時の逃避反応を観察した。データは試行回数に対する逃避反応率として表した。熱痛覚過敏反応は、Hargreaves法によりPSL後21日目のみ評価した。マウスを透明な強化ガラス板上に置き、透明な容器で伏せた後、約2時間馴化させた。ガラス板下側から熱刺激装置により、マウス後肢足底に輻射熱を照射し、逃避反応を示すまでの時間 (latency) を測定した。組織損傷を防ぐため、Cut-off時間を15秒とした。これを5回繰り返し、その平均値を算出した。

### 6. 薬物投与

手術の7日後に、ペントバルビタール麻酔下で、坐骨神経周囲にカプサイシン (cap, 0.1%,  $10 \mu\text{L}$ ) を投与した。対照群として溶媒 (10%エタノールおよび10% Tween80を含む生理食塩水) を同様に投与した。

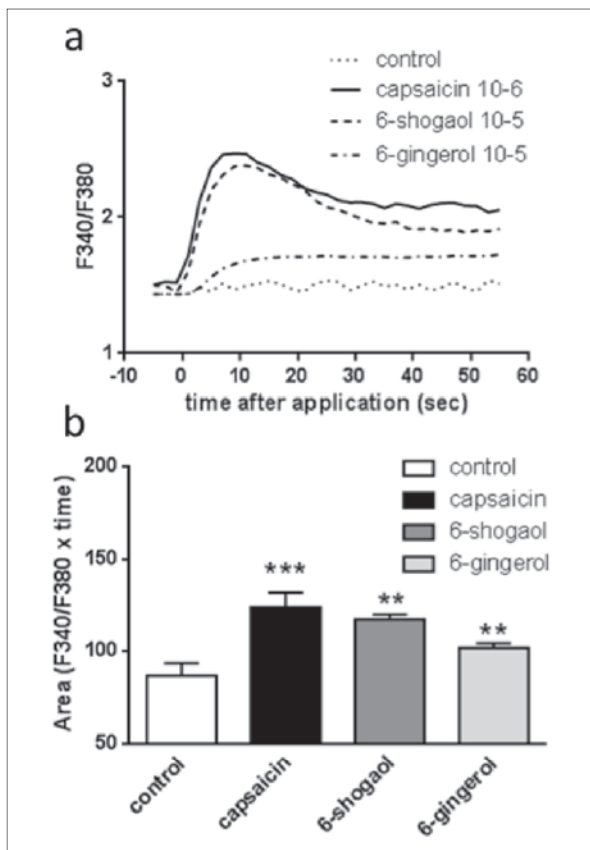
### 7. カルシウム蛍光実験

マウスより採取した腹腔マクロファージをRPMI/10% FBS/1% ペニシリン・ストレプトマイシンの培養液を満たした96 well-plateに、 $4 \times 10^5$  cells/ $100 \mu\text{L}$ の細胞密度で播種した。播種24時間後、培地を除去し、PBSにて洗浄した後、Recording medium (20 mmol/l HEPES, 115 mmol/l NaCl, 5.4 mmol/l KCl, 0.8 mmol/l  $\text{MgCl}_2$ , 1.8 mmol/l  $\text{CaCl}_2$ , 13.8 mmol/l glucose, pH7.4) に  $5 \mu\text{M}$  Fura 2 AM DMSO solution loading buffer (Dojindo) を含む loading buffer を  $100 \mu\text{L}/\text{well}$  を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で1時間インキュベートする。loading buffer 除去後、PBSにて洗浄し、 $100 \mu\text{L}$  recording medium/well を加え、マイクロプレートリーダー (Infinite F200 Pro-FL-ABS, TECAN) にて励起波長  $340 \text{nm}/380 \text{nm}$  および蛍光波長  $510 \text{nm}$  にて蛍光強度比を算出した。薬物はインジェクター (IJ1, TECAN) を用いて  $20 \mu\text{L}$  を添加した。

## 結 果

### 1. マクロファージ細胞内カルシウムに及ぼす TRPV1 アゴニストの影響

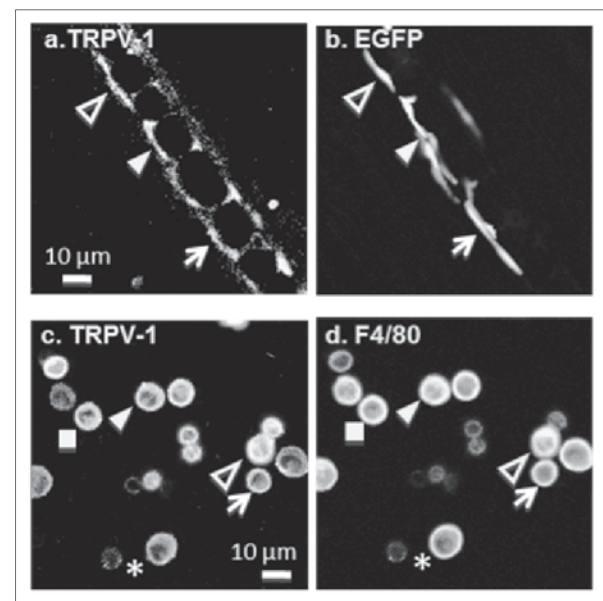
二波長励起による Fura 2 蛍光測光により、腹腔内マクロファージの細胞内カルシウム濃度を測定した。Recording medium 添加は、340 nm 励起と 380 nm 励起による蛍光強度比 (F340/F380) に影響を及ぼさなかった (Fig. 1)。1  $\mu$ M カプサイシンの適用は F340/F380 を著しく上昇した。すなわち、細胞内カルシウム濃度の有意な上昇がみとめられた。一方、同濃度の 6-gingerol および 6-shogaol は F340/F380 を上昇したが、カプサイシンよりは低値であった。



**Figure 1.** Effect of TRPV1 agonists on cytosolic free-Ca<sup>2+</sup> in peritoneal macrophages. a) Time-course of intracellular Ca<sup>2+</sup> fluorometry. Representative time course showing F340/F380 in responses to TRPV1 agonists. b) The magnitude of effect of TRPV1 agonists on [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Area under the curve in time-course of Ca<sup>2+</sup> fluorometry is calculated for evaluation of increase in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. n=5. \*\*P<0.01 and \*\*\*P<0.001 vs. control, determined by Dunnett multiple comparison test.

### 2. 骨髄由来細胞における TRPV1 の発現

EGFP マウスをドナーとする骨髄移植を受けた KO マウス (EGFP-KO マウス) SCN の免疫染色を行った結果、EGFP 蛍光を示す細胞の一部は抗 TRPV1 抗体免疫反応陽性を示した (Fig. 2a and 2b)。腹腔内マクロファージについて、抗 F4/80 (マクロファージ膜抗原) 抗体で免疫染色を行い、TRPV-1 に対する抗体との二重染色を行った結果、F4/80 免疫反応陽性細胞の一部が抗 TRPV1 抗体免疫反応陽性を示した (Fig. 2c and 2d)。



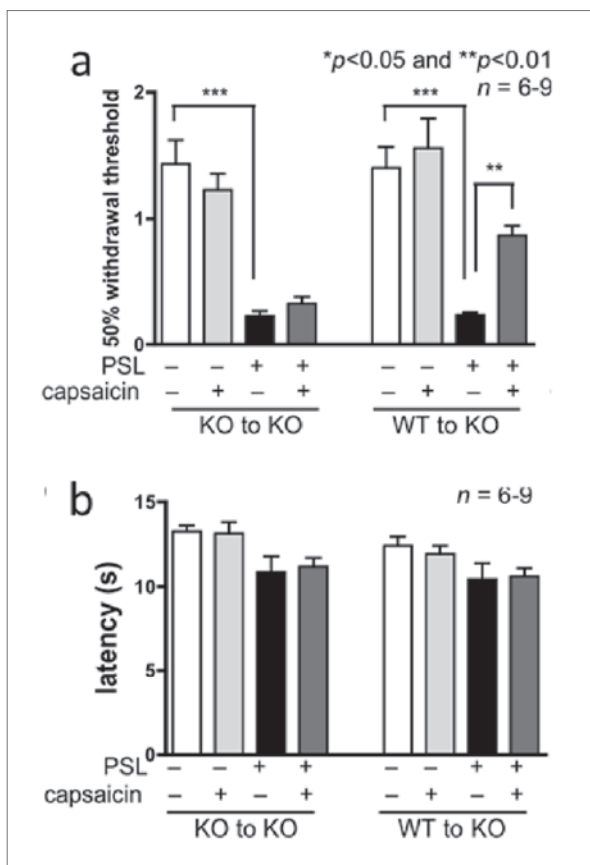
**Figure 2.** Immunohistochemistry for TRPV1 in SCN (a and b) and peritoneal macrophages (c and d). Six weeks after bone marrow transplantation, an EGFP-KO mouse was subjected to PSL, after which 3 weeks it underwent transcardial perfusion fixation with paraformaldehyde. A section of dissected SCN was immunostained using antibody against TRPV1, and an image for TRPV1-immunoreactive cells (a) and EGFP-positive cells (b) was taken from its section. The peritoneal macrophages were collected from a naive WT mouse and double-immunostained with both antibody for TRPV1 (c) and antibody for F4/80 (d). The same cells are indicated by the same type of symbols in a and b and in c and d.

### 3. カプサイシン鎮痛効果に及ぼす骨髄移植の影響

KO-KO 溶媒投与群において、PSLにより触刺激誘発逃避行動発生率の有意な増加が見られた (Fig. 3a)。つまり、触アロディニアが発現したことを示す。cap 投与は、KO-KO 溶媒投与群で形成された触アロディニアに対して有意な影響を



及ぼさなかった。WT-KO 溶媒投与群において、PSLにより触アロディニアが形成された。cap投与は、統計的に有意な差はみられなかったが、WT-KO 溶媒投与群における触アロディニア形成を減弱する傾向を示した。また、sham 処置における反応率に対して、cap投与は有意な影響を及ぼさなかった。熱刺激誘発逃避反応について、PSLはKO-KO 溶媒投与群およびWT-KO 溶媒投与群の反応潜時に対して有意な影響を示さなかった (Fig. 3b)。



**Figure 3.** Effect of capsaicin on PSL-induced tactile allodynia and thermal hyperalgesia in KO-KO mice and WT-KO mice. Six weeks after bone marrow transplantation, mice were subjected to PSL, and subsequently received a single perineural administration of capsaicin (cap; 0.1%, 10 $\mu$ l) or vehicle (veh) to SCN on day 7 of PSL. Tactile allodynia (a) and thermal hyperalgesia (b) were evaluated on day 21 of PSL. \* $p < 0.05$ .

## 考 察

TRPV1を標的とする香辛料成分として、唐辛子、生姜由来のカプサイシン、ショウガオール、ジンジャオールに注目し、これらの細胞内カルシ

ウム濃度上昇応答を指標に、腹腔マクロファージのTRPV1刺激効果の強さを評価した。その結果、カプサイシンが最も強くカルシウム濃度を上昇したことから、本物質の神経障害性疼痛への影響を検討することを決定した。次に、TRPV1発現細胞の同定を試みた。EGFP-KOマウスのPSLにより、PSL側SCNにTRPV1を発現する骨髄由来細胞が集積することが示された (Fig. 2a and 2b)。さらに、マクロファージ膜抗原であるF4/80に対する免疫組織化学的二重染色により、腹腔マクロファージの一部はTRPV1を発現することが明らかになった (Fig. 2c)。これらの結果は、骨髄からPSL部位に集積するマクロファージはTRPV1を発現する可能性を示唆する。神経障害性疼痛の形成および維持機構には様々な炎症性メディエーターが重要な役割を果たす。これら炎症性メディエーターの供給源として神経損傷部位に集積したマクロファージなどの免疫細胞が報告され、これらの免疫細胞や神経細胞によるサイトカインネットワークの重要性が明らかになっている<sup>1,5)</sup>。著者はこれまでに、PSLによりSCNに集積するマクロファージとSCN上膜に分布する脂肪細胞のクロストークにより両細胞が炎症性フェノタイプに転化し、神経障害性疼痛様行動の成立に寄与することを示した<sup>9)</sup>。さらに、本研究ではPSL誘発神経障害性疼痛様行動はカプサイシンのSCN周囲投与により抑制されること、また、その鎮痛効果はTRPV1-KOマウスにおいては、生じないことが明らかとなった。そこで、PSLにより集積するマクロファージにおけるTRPV1の機能的重要性を調べる目的で、TRPV1-KOマウスにWTマウス骨髄を移植することにより、マクロファージにおけるTRPV1機能を回復させたマウス (WT-KOマウス)における神経障害性疼痛に及ぼすカプサイシンの影響を調べた。KO-KO 溶媒投与群において、PSLにより触アロディニアが発現した。一方、WT-KO 溶媒投与群においても同様の結果

が得られた (Fig. 3)。これらの成果は、骨髄移植の処置そのものは、TRPV1-KO マウスにおける PSL 誘発触アロディニア形成に影響を及ぼさないことを示唆する。カプサイシンの SCN 周囲投与による触アロディニア減弱効果は、KO-KO マウスでは見られなかったが、WT-KO マウスでは減弱傾向が見られた (Fig. 3)。一方、熱痛覚過敏については KO-KO ならびに WT-KO の両マウスでは生じなかったという結果は、一次知覚神経線維の TRPV1 欠損マウスでは熱感受性が減弱していることと一致する<sup>2)</sup>。以上の行動学的検討結果は、TRPV1-KO マウス SCN に浸潤する骨髄由来細胞における TRPV1 機能の骨髄移植による獲得は、カプサイシン鎮痛効果を回復させることを示す。さらに、免疫組織化学的検討の結果も考慮すると、PSL により SCN に浸潤する TRPV1 発現マクロファージは、少なくともカプサイシン標的細胞の一つである可能性が示唆される。この可能性に対し、マクロファージ細胞株 RAW246.7 には TRPV1 が発現せず、マクロファージに対するカプサイシンの抗炎症効果は TRPV1 を介さないという報告がある<sup>10)</sup>。著者も、RAW246.7 には TRPV1 が発現されなかったことを確認しているが、一方で、他のマクロファージ細胞株である J774A.1 およびマウス腹腔マクロファージのいずれにおいても mRNA を検出した (data not shown)。個体から採取した標本であることならびに細胞株の種類の違いもあるが、本研究結果 (Fig. 1) と合わせて考慮すると、本研究条件下で観察したマクロファージに TRPV1 が発現している可能性は高いと考えられる。

要約すると、SCN 傷害後、集積するマクロファージが TRPV1 を発現しており、カプサイシン投与はその TRPV1 刺激を介して、炎症性サイトカイン産生を抑制することが示唆される。本研

究結果は、TRPV1 発現マクロファージがカプサイシンの標的細胞になりうることを明らかにし、神経障害性疼痛の病態解明に新たな知見を提示する重要な成果といえる。

#### 謝 辞

本研究課題を遂行するにあたり、多大な研究助成を賜りました (公財) 浦上食品・食文化振興財団に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Scholz J, Woolf CJ (2007) The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci* 10:1361-1368.
- 2) Caterina MJ, et al. (1997) The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- 3) Patapoutian A, Tate T, Woolf CJ (2009) Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov* 8:55-68.
- 4) Numazaki M et al. (2003) Structural determinant of TRPV1 desensitization interacts with calmodulin. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8002-8006.
- 5) Moalem G, Tracey DJ (2006) Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Rev* 51: 240-264.
- 6) Maeda T, Kiguchi N, Kobayashi Y, Ikuta T, Ozaki M, Kishioka S: Leptin derived from adipocytes in injured peripheral nerves facilitates development of neuropathic pain via macrophage stimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 106(31), 13076-13081, 2009.
- 7) Kiguchi N, Maeda T, Kobayashi Y, Fukazawa Y, Kishioka S: Macrophage inflammatory protein-1 $\alpha$  mediates the development of neuropathic pain following peripheral nerve injury through interleukin-1 $\beta$  up-regulation. *Pain*, 149(2), 305-315, 2010.
- 8) Seltzer Z, et al. (1990) A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. *Pain* 43: 205-218.
- 9) 前田武彦・慢性疼痛における脂肪細胞の機能的役割とその制御・第 61 回日本薬学会近畿支部大会・2012 年 10 月・神戸
- 10) Chen CW, et al. (2003) Signal transduction for inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 induction by capsaicin and related analogs in macrophages. *Br J Pharmacol* 140:1077-1087.

## Exploration of spice components with novel analgesic mechanism

Takehiko Maeda

*Dept. of Pharmacol., Niigata Univ. of Pharm. Appl. Life Sci.*

### ABSTRACT :

Neuropathic pain is triggered by lesions to the somatosensory nervous system that alter its structure and function so that pain occurs spontaneously and responses to noxious and innocuous stimuli are pathologically amplified. We have proposed that peripheral nerve injury induces a cross-talk between perineural adipocyte and recruited macrophages to prolong and aggravate pain, indicating neuropathic pain. Some of spice components reportedly have analgesic activity in animal model with conventional mechanism, a manner mediated by desensitization of TRPV1. Thus, this study explored the analgesics from spice components with a novel analgesic mechanism. I used fluorometric determination of cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration to test effects of some TRPV1 agonists on  $Ca^{2+}$  response in peritoneal macrophages of mice. Capsaicin had most highly activity in increments of the cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentration. The effects of Capsaicin on the development of neuropathic pain were tested. Mice were subjected to partial sciatic nerve ligation (PSL) for neuropathic pain model. Capsaicin was given to perineural SCN on day 7 of PSL. PSL elicited neuropathic pain including tactile allodynia and thermal hyperalgesia, which were reversed by Capsaicin. The Capsaicin -induced attenuation of NP did not occur in TRPV1-KO mice. To test whether immune cell with TRPV1 is involved in analgesic effect of Capsaicin, we used bone marrow transplantation to generate TRPV1-KO with macrophages with wild type genotype. In contrast to TRPV1-KO without bone marrow transplantation, Capsaicin analgesic effect occurred in TRPV1-KO subjected to bone marrow transplantation. These results suggest that TRPV1 activation produces analgesic effects on NP, at least in part, through suppression of inflammatory macrophages. Capsaicin is potentially useful analgesics through inhibition of inflammatory immune responses.