

# 主論文

## Quercetin Attenuates Neuropathic Pain in Rats with Spared Nerve Injury

(ケルセチンはSpared Nerve Injury モデルラットの神経障害性疼痛を減弱する)

### 【緒言】

神経障害性疼痛は長期間続く痛みであり、治療に難渋する。さまざまな薬が治療に使用されるが、その効果はいまだ十分ではなく、副作用の問題もある。新規薬剤の開発が期待されており、前臨床試験では有効なものもあるが、ヒトでの効果は限られている。安全性や開発費用の高騰などの問題から、近年、既存薬剤の適応変更、“drug re-positioning” が注目されている。

ケルセチンは果物や野菜に広く含まれるフラボノイドであり、抗酸化作用、抗炎症作用、抗侵害受容作用がある。サプリメントとして市販されており、近年の研究では、降圧作用や炎症性疼痛や糖尿病性神経障害性疼痛の抑制効果も報告されているが、その機序は十分に解明されていない。

神経障害性疼痛に関しては、ニューロン機構について長年研究されてきたが、近年の研究ではグリア細胞もまた痛みの強力なモジュレーターであることがわかってきた。グリア細胞を抑制することで鎮痛効果を発揮する薬剤も研究されている。ケルセチンもアストロサイトへの作用が報告されているが機序は明らかではない。本研究の目的は、神経障害性疼痛に対するケルセチンの効果を調べ、その機序を解明することである。

### 【対象と方法】

#### 対象と薬剤投与

61匹の雄性 Sprague-Dawley ラット (体重 150-240g) を用いた。ラットは外科的処置の5日前から、餌、水を自由に摂取でき、12時間毎の明暗管理をされたケージの中で飼育された。ケルセチン投与群では通常の餌にケルセチンを混ぜて与えた。

#### 外科的処置

ペントバルビタール (40mg/kg 腹腔内投与) とイソフルラン吸入麻酔下に、左脛骨神経を 6-0 絹糸で結紮・切離し、総腓骨神経と腓腹神経は残す Spared nerve injury (SNI) 手術を行った。

#### 行動評価

疼痛行動は、処置前、処置後 1、3、7、10、14、21 日目に von Frey test を用いて評価した。von Frey フィラメントで後足底を刺激し、paw withdrawal threshold (PWT) を計測して、機械的アロディニアを評価した。ラットを底が金網になっているプラスチックケージに入れて、下から後ろ足の足底を刺激した。von Frey フィラメントは 0.4、0.6、1.0、1.4、2.0、4.0、6.0、8.0、15.0 g の 9 本あり、

この内の1本で1・2秒間、2gの力で刺激した。その反応と刺激フィラメントの強さに基いて、Dixonのup-down methodとChaplanらの数式を用いて50%PWTを決定した。

### 細胞培養

C6ラットグリオーマ細胞株を用いた。dimethyl sulfoxide (DMSO)に溶解したケルセチンを1、10、30、50  $\mu$ Mの濃度で投与し、1時間後にリコンビナントラット interleukin—6 (IL-6)を投与した。3時間培養後に phospho signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)を、10時間後培養後に glial fibrillary acidic protein (GFAP)を測定した。

### Western blotting

ラットはSNI処置後7、14日目に、深麻酔下に生食灌流し、両側L5 dorsal root ganglions (DRGs)と脊髄を採取した。培養細胞はIL-6で3、10時間刺激した後に採取した。BCA protein assay kitを用いてタンパク濃度を測定し、gradient polyacrylamide gelsに流し、ニトロセルロース膜に転写した。一次抗体には、抗GFAP抗体(1:5000)、抗 phospho STAT3抗体(1:2000)、抗 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)抗体(1:100000)を使用した。二次抗体には horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit 抗体(1:5000)、donkey anti-mouse IgM 抗体(1:3000)を使用した。Image Labを用いて定量し、タンパクレベルはcontrolに対する相対値で表記した。

### 免疫組織化学

ラットはSNI処置後14日目に、深麻酔下に4%formalin 500mlで固定し、両側L5 DRGsを採取、2時間の後固定後、30% sucroseに一晩浸水した。OCT compoundに包埋し16  $\mu$ mの凍結切片を作成した。rabbit anti-GFAP抗体(1:1000)のあと、horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG(1:200)とAlexaFluor 488-labeled tyramide(1:200)で処理をし、蛍光顕微鏡で撮影した。

### 統計分析

データは平均±標準誤差(SEM)で表す。行動評価のデータ解析には Bonferroni's post-hoc test two-way measurement analysis of variance (ANOVA)、Western blottingのデータ解析には Bonferroni's post-hoc test one-way ANOVA、食餌摂取量のデータ解析には Student's t testを用い、それぞれp値<0.05を有意とみなした。

## **【結果】**

### 行動評価

まず、神経障害性疼痛に対するケルセチンの予防効果を調べるために、pre-dose群ではSNI処置4日前から1%あるいは0.1%のケルセチンを含有した餌を与えた。開始時の行動評価は群間で有意差は

なかった。1%ケルセチン pre-dose 群では、SNI 後 7、14、21 日目の PWT は有意に上昇しており、機械的アロディニアは減弱されていた。0.1%ケルセチンではこの効果はみられなかった。

次に SNI 処置後 7 日目から 1%ケルセチンを投与したが、PWT の有意な変化はみられなかった。

### GFAP に対するケルセチンの効果

ラットグリオーマ細胞株 C6 において、IL-6 による刺激で増加した GFAP と STAT3 は、ケルセチン投与で濃度依存的に減少し、50  $\mu$ M で完全に抑制された。

### DRG における GFAP の局在

GFAP は SNI モデルラットの患側 L5DRG において、主に Satellite glial cells (SGCs) に発現していた。

### ケルセチン投与による DRG と脊髄での GFAP 抑制

1%ケルセチン投与により、DRG では術後 7 日目の患側の GFAP 増加が抑制された。脊髄では術後 7 日目の GFAP 発現が両側で抑制された。

### **【考察】**

本研究では、ケルセチンの経口投与により神経損傷による機械的アロディニアが予防された。一方、確立した神経障害性疼痛は回復しなかった。予防効果は DRG における GFAP 抑制と関連した。

ケルセチンの鎮痛効果はさまざまな動物モデルで報告されており、その機序も研究されているが、十分に解明はされていない。ケルセチンの効果の一つに astrocyte での GFAP 抑制がある。SGC を含めグリア細胞は神経障害性疼痛の成立に関与することがわかっている。我々の研究結果からケルセチンによる SGC の抑制が疼痛行動を減弱したと考えられる。

ケルセチンは広く市販されており、その安全性は高い。1%ケルセチンを経口投与したラットのケルセチン血中濃度は、サプリメントを摂取したヒトでの血中濃度よりかなり高かったが、より低い濃度で、降圧作用や酸化ストレスや炎症反応のマーカーを下げるといった治療効果の報告がある。ケルセチンの吸収や血中濃度は食事などの影響があり、吸収率や生体利用効率を上げる研究もなされている。

術後投与群では鎮痛効果がみられなかったことやウエスタンブロッティングの結果から、SGC 活性化は疼痛の維持よりも開始の機序に関与すると思われる。過去の研究では、microglia が痛みの開始、astrocyte が痛みの維持に関わると報告されているが、これらは主に脊髄における研究であり、SGC に関しては、神経障害後の早期の活性化が報告されている。術後 1 週間以上つづく痛みは、通常神経障害性疼痛と考えられる。1%ケルセチン投与により術後 21 日間疼痛行動が減弱していたことから、ケルセチンは神経障害性疼痛に効果があると考えられる。今回の結果から慢性痛の成立における早期の SGC 活性化の重要性が示された。

**【結論】**

ケルセチンの予防投与は神経障害疼痛行動を抑制し、その機序には SGC の抑制が関与する。安全性が確立しているケルセチンは、疼痛治療において臨床利用できる可能性が高い。