(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2019年5月9日(09.05.2019)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2019/088095 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)
A61P 25/04 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2018/040319

(22) 国際出願日： 2018年10月30日(30.10.2018)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2017-213196 2017年11月2日(02.11.2017) JP
特願 2018-018653 2018年2月5日(05.02.2018) JP

(71) 出願人: 国立大学法人九州大学 (**KYUSHU UNIVERSITY, NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION**) [JP/JP]; 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 津田 誠(**TSUDA Makoto**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP). 高露 雄太(**KOHRO Yuta**); 〒8190395 福岡県福岡市西区元岡７４４ 国立大学法人九州大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (**TANAI Sumio** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,

(54) **Title:** ANALGESIC AND USE THEREOF

(54) 発明の名称： 鎮痛剤及びその使用

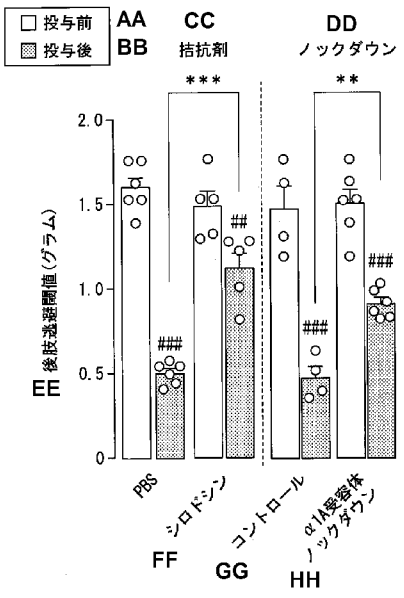


FIG. 6:
AA Before administration
BB After administration
CC Antagonist
DD Knockdown
EE Hind limb escape threshold (gram)
FF Silodosin
GG Control
HH α1A receptor knockdown

(57) **Abstract:** The present invention provides: an analgesic that contains, as an active ingredient, a substance that inhibits a signal from an adrenaline α1 receptor of astrocyte; and an analgesic screening method characterized by selecting a substance that inhibits a signal from the adrenaline α1 receptor of astrocyte.

(57) 要約：アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を有効成分として含有する鎮痛剤、及びアストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択することを特徴とする、鎮痛剤のスクリーニング方法。

WO 2019/088095 A1

[続葉有]

HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明　細　書

発明の名称 ： 鎮痛剤及びその使用

技術分野

[0001] 本発明は、鎮痛剤及びその使用に関する。

本願は、２０１７年１１月２日に、日本に出願された特願２０１７－２１３１９６号、及び、２０１８年２月５日に、日本に出願された特願２０１８－１８６５３号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 末梢組織からの侵害刺激を含む体性感覚情報は、一次求心性感覚神経を介して脊髄後角へと入力し、同部位の神経回路で適切に情報処理され脳へ伝達される。従来、この伝達は神経細胞のみで説明されてきたが、近年、グリア細胞が神経活動に大きく影響し、感覚情報伝達の変調に関与することが示されてきた（非特許文献１）。一方、グリア細胞の中で数的に最も多いアストロサイトは神経伝達物質受容体を発現し、空間的にはシナプスと接触していることからシナプス活動への関与が想定されている（非特許文献２）。しかしながら、感覚情報伝達における脊髄でのアストロサイトの役割は未だ分かっていない。

[0003] アドレナリンα受容体には、α１受容体とα２受容体がある。このうち、アドレナリンα１受容体にはα１Ａ、α１Ｂ及びα１Ｄ受容体の３つのサブタイプがあり、血管収縮、瞳孔散大、立毛、前立腺収縮等に関与していることが知られている。しかしながら、アストロサイトにおけるアドレナリンα１受容体の役割については知られていない。

先行技術文献

非特許文献

[0004] 非特許文献1：J Neurosci Res. 2017 Jun;95(6):1319-1329.

非特許文献2：Nature 2010, 468(7321), p223-231.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] このような背景のもと、新たなタイプの鎮痛剤の確立が求められている。本発明は、脊髄のアストロサイトを標的とした新たな鎮痛剤を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明は以下の態様を含む。

［１］アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を有効成分として含有する鎮痛剤。

［２］前記アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質が、アドレナリンα１受容体拮抗剤又はアドレナリンα１受容体発現抑制剤である［１］に記載の鎮痛剤。

［３］前記アストロサイトが脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである、［１］又は［２］に記載の鎮痛剤。

［４］前記脊髄後角の表層に存在するアストロサイトが、Ｈｅｓ５を発現しているアストロサイトである、［３］に記載の鎮痛剤。

［５］前記アドレナリンα１受容体が、アドレナリンα１Ａ受容体である、［１］～［４］のいずれか一項に記載の鎮痛剤。

［６］前記鎮痛剤が、慢性疼痛治療剤である、［１］～［５］のいずれか一項に記載の鎮痛剤。

［７］アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択することを特徴とする、鎮痛剤のスクリーニング方法。

［８］前記アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質が、アドレナリンα１受容体拮抗剤又はアドレナリンα１受容体発現抑制剤である［７］に記載の方法。

［９］前記アストロサイトが脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである、［７］又は［８］に記載の方法。

［１０］前記脊髄後角の表層に存在するアストロサイトが、Ｈｅｓ５を発現しているアストロサイトである、［９］に記載の方法。

［１１］前記アドレナリンα１受容体が、アドレナリンα１Ａ受容体である、［７］～［１０］のいずれか一項に記載の方法。

［１２］前記鎮痛剤が、慢性疼痛治療剤である、［７］～［１１］のいずれか一項に記載の方法。

発明の効果

[0007] 本発明によれば、アストロサイトのアドレナリンα１受容体を標的とした新たな鎮痛剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]実験例１において、脊髄後角において、Ｈｅｓ５を発現しているアストロサイトを示した図である。

[図2]実験例２及び３において、カプサイシンによる脊髄後角のアストロサイトの活動とノルアドレナリン神経選択的毒素およびアドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤の効果を示した図である。

[図3]左図は、実験例４において、ｈＭ３Ｄｑ受容体が脊髄後角表層のＨｅｓ５陽性アストロサイトに発現していることを示した図である。右図は、実験例４において、Ｈｅｓ５陽性脊髄アストロサイト刺激時の軽度機械刺激に対するマウスの行動解析を示した図である。

[図4]左図は、実験例５における、コーン油投与群及びタモキシフェン投与群のｈＭ３Ｄｑ受容体の発現を示した図である。右図は、実験例５において、Ｈｅｓ５陰性脊髄アストロサイト刺激時の軽度機械刺激に対するマウスの行動解析を示した図である。

[図5]実験例６において、アドレナリンα１受容体アゴニストを脊髄くも膜下腔内投与した時の軽度機械刺激痛覚過敏を示した図である。

[図6]実験例７及び８において、アドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤を投与した時、及びアドレナリンα１Ａ受容体発現を抑制した時のフェニレフリン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対する効果を示した図である。

[図7]実験例９において、カプサイシン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対する下行性ノルアドレナリン神経の関与を示した図である。

[図8]実験例１０において、カプサイシン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対する脊髄後角アストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体発現抑制の効果を示した図である。

発明を実施するための形態

[0009] ［鎮痛剤］

１実施形態において、本発明は、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を有効成分として含有する鎮痛剤を提供する。

[0010] 痛みは末梢組織である皮膚等に痛み刺激が加わると皮膚の神経が興奮し、脊髄に伝わる。脊髄に伝えられた情報は、脳に伝わって、初めて痛みを感じる。この痛みを感じるルートの他に、脳からは脊髄後角へ下行性にノルアドレナリン神経が伸びており、痛み刺激により、この下行性ノルアドレナリン神経が興奮すると、神経末端からノルアドレナリンが放出される。

[0011] 非神経細胞であるアストロサイトは神経と神経のつなぎ目に存在し、神経と神経の間の情報伝達に関与する。本発明者らは、脊髄後角の中でも表層に局在するアストロサイト亜集団と脊髄後角深層部に局在するアストロサイト亜集団があることを見出した。さらに、下行性ノルアドレナリン神経の興奮によって神経末端から放出されたノルアドレナリンが、脊髄後角の表層に存在するアストロサイトのアドレナリンα１受容体に結合すると、アドレナリンα１受容体からのシグナルが末梢組織から入力した痛み刺激を増強させることを見出した。

[0012] 従って、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質は、末梢組織から入力した痛み刺激を抑制することができるため、鎮痛剤として用いることができる。当該鎮痛剤は、痛みの治療、緩和及び／又は予防のために用いることができる。

[0013] 本実施形態の鎮痛剤において、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質は、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する活性を有していれば、特に制限はないが、例えば、アドレナリンα１受容体拮抗剤

、アドレナリンα１受容体発現抑制剤等が挙げられる。アドレナリンα１受容体拮抗剤としては、アドレナリンα１受容体に作用して、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害できる能力を有する物質であれば、特に制限はなく、アドレナリンα１受容体遮断剤と呼ばれることもある。アドレナリンα１受容体拮抗剤の具体例としては、シロドシン、タムスロシン、ナフトピジル、テラゾシン、ウラピジル、プラゾシン、アルフゾシン、ドキサゾシン、ブナゾシン等が挙げられる。他に、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質は、アドレナリンα1受容体の活性を抑制する物質であってもよい。アドレナリンα1受容体の活性を抑制する物質としては、例えば、アドレナリンα1受容体に対する特異的結合物質等が挙げられる。ここで、特異的結合物質としては、抗体、抗体断片、アプタマー、低分子化合物等が挙げられる。

[0014] アドレナリンα１受容体発現抑制剤としては、アドレナリンα１受容体の発現を抑制できる物質であれば、特に制限はなく、例えば、アドレナリンα１受容体の発現を抑制するｓｈ（ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ）ＲＮＡ、ｓｉＲＮＡ、ｍｉＲＮＡ、リボザイム、アンチセンス核酸、低分子化合物等が挙げられる。アドレナリンα１受容体の発現を抑制するｓｈＲＮＡとしては、例えば、配列番号１で表される塩基配列を含むＤＮＡをターゲット配列とするｓｈＲＮＡ等が挙げられる。

[0015] 前記アストロサイトのアドレナリンα１受容体は、α１Ａ、α１Ｂ及びα１Ｄの何れでもよい。ある実施形態では、アドレナリンα１受容体は、α１Ａ受容体である。

[0016] 本実施形態において、アストロサイトは、脊髄に存在するアストロサイトであってもよい。ある実施形態では、アストロサイトは、脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである。脊髄後角の表層に存在するアストロサイトとしては、転写因子であるＨｅｓ５を発現しているアストロサイト等が挙げられる。

[0017] 本実施形態の鎮痛剤としては、痛みを抑制する効果があれば、特に制限は

なく、一過性の痛みを抑制する効果を有する鎮痛剤であっても、神経障害性疼痛等の慢性疼痛治療剤のような、持続的な痛みに対して抑制する効果を有する鎮痛剤であってもよい。

[0018] 本実施形態の鎮痛剤は、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質に加えて、薬学的に許容される担体を含有してもよい。

[0019] 本実施形態の鎮痛剤は、例えば、錠剤、カプセル剤、エリキシル剤、マイクロカプセル剤等の形態で経口的に、あるいは、注射剤、坐剤、皮膚外用剤等の形態で非経口的に投与することができる。皮膚外用剤としては、より具体的には、軟膏剤、貼付剤等の剤型が挙げられる。

[0020] 本実施形態の鎮痛剤は、中枢に移行する形態で投与することが好ましい。中枢に移行する形態で投与する方法としては、例えば、有効成分である、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を、血液脳関門を通過するようにデザインして投与する方法や、本実施形態の鎮痛剤を脊髄内に投与する方法等が挙げられる。

[0021] 薬学的に許容される担体としては、通常医薬組成物の製剤に用いられるものを特に制限なく用いることができる。より具体的には、例えば、ゼラチン、コーンスターチ、トラガントガム、アラビアゴム等の結合剤；デンプン、結晶性セルロース等の賦形剤；アルギン酸等の膨化剤；水、エタノール、グリセリン等の注射剤用溶剤；ゴム系粘着剤、シリコーン系粘着剤等の粘着剤等が挙げられる。

[0022] 本実施形態の鎮痛剤は添加剤を含んでいてもよい。添加剤としては、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム等の潤滑剤；ショ糖、乳糖、サッカリン、マルチトール等の甘味剤；ペパーミント、アカモノ油等の香味剤；ベンジルアルコール、フェノール等の安定剤；リン酸塩、酢酸ナトリウム等の緩衝剤；安息香酸ベンジル、ベンジルアルコール等の溶解補助剤；酸化防止剤；防腐剤等が挙げられる。

[0023] 本実施形態の鎮痛剤は、上述したアストロサイトのアドレナリンα１受容

体からのシグナルを阻害する物質、薬学的に許容される担体及び添加剤を適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化することができる。

[0024] 本実施形態の鎮痛剤の投与量は、対象の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、経口投与の場合には、有効成分である、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を、投与単位形態あたり、例えば０．１～１００ｍｇ／ｋｇ体重、例えば１～５０ｍｇ／ｋｇ体重、例えば、１～２０ｍｇ／ｋｇ体重、例えば１～１０ｍｇ／ｋｇ体重投与すればよい。また、非経口的に投与する場合には、例えば、注射剤の場合には、投与単位形態あたり、例えば０．０１～５０ｍｇ、例えば０．１～３０ｍｇ、例えば０．１～２０ｍｇ、例えば０．１～１０ｍｇの有効成分を投与すればよい。

[0025] また、本実施形態の鎮痛剤の１日あたりの投与量は、対象の症状、体重、年齢、性別等によって異なり、一概には決定できないが、例えば、成人１日あたり０．１～１０ｍｇ／ｋｇ体重の有効成分を１日１回又は２～４回程度に分けて投与すればよい。

[0026] 本実施形態の鎮痛剤が、鎮痛作用を有することは、公知の鎮痛作用の評価系を用いて評価することができる。例えば、下記のカプサイシンモデル動物を用いた評価系により調べることができる。

［鎮痛作用の評価］

８～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア社製）に被験薬を投与した後、０．１６μｇ／μＬのカプサイシン溶液１０μＬをマウスの後肢足裏に投与し、投与後、マウスの投与側後肢足底部に知覚試験用フィラメント(ｖｏｎ Ｆｒｅｙ Ｆｉｌａｍｅｎｔ ０．０２～２ｇ、Ｎｏｒｔｈ Ｃｏａｓｔ Ｍｅｄｉｃａｌ社製)を押しあて、アップダウン法［Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ Ｍｅｔｈｏｄｓ，１９９４，５３（１）：５５－６３］に従って５回から９回の異なった力のフィラメントで評価する。その軽度機械刺激に対する動物の後肢逃避行動を経時的に観察し、下記式により５０％逃避閾値

（Ｐａｗ　ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を算出する。

[0027] ５０％逃避閾値（ｇ）＝１０$^{(xf+(k\times 0.224))}$／１００００

ｘｆ：最後に用いたフィラメントの値

ｋ：逃避行動あり或いは逃避行動なしのパターンにより決定される値

[0028] ［鎮痛薬のスクリーニング方法］

１実施形態において、本発明は、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択することを特徴とする、鎮痛剤のスクリーニング方法を提供する。

アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質は、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する活性を有していれば、特に制限はないが、例えば、アドレナリンα１受容体拮抗剤、アドレナリン受容体発現抑制剤等が挙げられる。アドレナリンα１受容体拮抗剤としては、アドレナリンα１受容体に作用して、アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害できる活性を有していれば、特に制限はなく、アドレナリンα１受容体遮断剤と呼ばれることもある。アドレナリンα１受容体発現抑制剤としては、アドレナリンα１受容体の発現を抑制できる物質であれば、特に制限はなく、例えば、アドレナリンα１受容体の発現を抑制するｓｈ（ｓｈｏｒｔ　ｈａｉｒｐｉｎ）ＲＮＡ等が挙げられる。前記アストロサイトのアドレナリンα１受容体は、α１Ａ、α１Ｂ及びα１Ｄの何れでもよい。ある実施形態では、アドレナリンα１受容体は、α１Ａ受容体である。

[0029] 本実施形態において、アストロサイトは、脊髄に存在するアストロサイトであってもよい。ある実施形態では、アストロサイトは、脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである。脊髄後角の表層に存在するアストロサイトとしては、転写因子であるＨｅｓ５を発現しているアストロサイト等が挙げられる。

[0030] 本実施形態の鎮痛剤としては、痛みを抑制する効果があれば、特に制限はなく、一過性の痛みを抑制する効果を有する鎮痛剤であっても、神経障害性疼痛等の慢性疼痛治療剤のような、持続的な痛みに対して抑制する効果を有

する鎮痛剤であってもよい。

[0031] 本実施形態のスクリーニング方法としては、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択できる方法であれば、特に制限はなく、例えば、アストロサイトのアドレナリンα１受容体を発現する細胞に、被験物質を添加し、アドレナリンα１受容体のアゴニストを添加したときに生じる、該アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する被験物質を選択する方法、アストロサイトのアドレナリンα１受容体を発現する細胞に、被験物質存在下に、放射性物質等により標識した選択的なリガンドを結合させ、当該リガンドと前記受容体との結合を阻害する被験物質を選択する方法等が挙げられる。

[0032] また、本実施形態のスクリーニング方法としては、ＤＲＥＡＤＤ（Ｄｅｓｉｇｎｅｒ Ｒｅｃｅｐｔｏｒｓ Ｅｘｃｌｕｓｉｖｅｌｙ Ａｃｔｉｖａｔｅｄ ｂｙ Ｄｅｓｉｇｎｅｒ Ｄｒｕｇ）法を用いた方法も例示される。例えば、内因性アセチルコリンに不応答である、変異型ヒトムスカリンＭ３受容体ｈＭ３Ｄｑを組み込んだアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）を、アストロサイトでＣｒｅが発現しているＧｆａｐ－Ｃｒｅマウス、Ｈｅｓ５－ＣｒｅＥＲＴ２マウス等の脊髄後角へ微量注入し、脊髄後角アストロサイト特異的にｈＭ３Ｄｑ受容体を発現させ、ｈＭ３Ｄｑ受容体を該受容体のアゴニストであるクロザピン－Ｎ－オキサイド（ｃｌｏｚａｐｉｎｅ－Ｎ－ｏｘｉｄｅ；ＣＮＯ）で活性化し、感覚刺激による行動の変化を測定し、脊髄後角アストロサイトの活性化により誘発される、軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）が、被験物質を予め投与した時に抑制されるか否かを評価し、該疼痛様行動を抑制する物質を選択することにより、鎮痛剤をスクリーニングすることができる。

[0033] 本実施形態のスクリーニング方法により得られるアストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質は、末梢組織から入力した痛み刺激を抑制することができるため、鎮痛剤として用いることができる。当該鎮痛剤は、痛みの治療、緩和及び／又は予防のために用いることができ

る。

[0034] 1実施形態において、本発明は、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質の有効量を、対象に投与する工程を備える、痛みの治療、緩和及び／又は予防方法を提供する。本実施形態において、痛みとしては、特に制限はなく、一過性の痛みであっても、神経障害性疼痛等の慢性疼痛のような、持続的な痛みであってもよい。また、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質としては、上述した物質が挙げられる。

対象に投与する工程としては、中枢に移行する形態で投与する工程が好ましい。中枢に移行する形態で投与する工程としては、例えば、有効成分である、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質を、血液脳関門を通過するようにデザインして投与する工程や、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質を脊髄内に投与する工程等が挙げられる。

[0035] 1実施形態において、本発明は、痛みの治療、緩和及び／又は予防における使用ための、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質を提供する。本実施形態において、痛みとしては、特に制限はなく、一過性の痛みであっても、神経障害性疼痛等の慢性疼痛のような、持続的な痛みであってもよい。また、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質としては、上述した物質が挙げられる。

[0036] 1実施形態において、本発明は、鎮痛剤を製造するための、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質の使用を提供する。本実施形態において、鎮痛剤としては、痛みを抑制する効果があれば、特に制限はなく、一過性の痛みを抑制する効果を有する鎮痛剤であっても、神経障害性疼痛等の慢性疼痛治療剤のような、持続的な痛みに対して抑制する効果を有する鎮痛剤であってもよい。また、アストロサイトのアドレナリンα1受容体からのシグナルを阻害する物質としては、上述した物質が挙げられる。当該鎮痛剤は、痛みの治療、緩和及び／又は予防のために用いるこ

とができる。

実施例

[0037] 次に実験例を示して本発明を更に詳細に説明するが、本発明は以下の実験例に限定されるものではない。

[0038] ［実験例１］

（脊髄後角の表層に存在するアストロサイト集団の同定）

Ｈｅｓ５－ＣｒｅＥＲＴ２マウス（Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．，２０１２ Ｆｅｂ １４；３：６７０）及びＲｏｓａ－ｔｄＴｏｍａｔｏマウス（Ｎａｔ Ｎｅｕｒｏｓｃｉ．，２０１０ Ｊａｎ；１３（１）１３３－４０）を掛け合わせた８～１２週齢のＨｅｓ－５ＣｒｅＥＲＴ２／Ｒｏｓａ－ｔｄＴｏｍａｔｏマウスに、コーン油を使用し２０ｍｇ／ｍＬに調製したタモキシフェン（シグマ社製）溶液を２ｍｇ／０．１ｍＬを１日１回１０日間、マウスへ腹腔内投与することによりＣｒｅリコンビナーゼ活性を誘導した。

[0039] タモキシフェンを投与終了時から１週間後に、ペントバルビタールナトリウム製剤（ソムノペンチル（登録商標）注射液、共立製薬社製）の腹腔内投与でマウスを麻酔し、翻尾反射の消失を確認した後、直ちに腹部を切開し、心臓よりリン酸緩衝液（ＰＢＳ）２０ｍＬを灌流して脱血した。続いて、氷冷した４％パラホルムアルデヒド（ｐａｒａｆｏｒｍａｌｄｅｈｙｄｅ；ＰＦＡ）溶液５０ｍＬを灌流することにより全身組織を固定後、動物を約１時間氷冷した。続いて、脊髄を摘出し、実体顕微鏡下で第４腰髄を単離した。単離した脊髄は氷中静置後４～５時間経過するまで４％ＰＦＡ溶液中にて浸漬固定を行った。その後、冷３０％ショ糖溶液中に脊髄を移し、４℃で２４時間振盪した。脊髄をＯ．Ｃ．Ｔ．Ｃｏｍｐｏｕｎｄ（サクラファインテックジャパン社製）に包埋し、ドライアイス上で急速凍結させ、使用するまで－８０℃で保存した。

[0040] 上記－８０℃で保存していた包埋脊髄を、クライオスタット（Ｌｅｉｃａ社製）内で－２０℃の条件下、約６０分間静置した。その後、クライオスタットを用いて３０μｍ厚の切片を作製した後、ＰＢＳ中に移し、組織周辺の

Ｏ．Ｃ．Ｔ．Ｃｏｍｐｏｕｎｄを溶解させた。得られた脊髄切片を０．３％ＴｒｉｔｏｎＸ－１００／ＰＢＳ（ＰＢＳＴ）中で振盪しながら洗浄した。洗浄後、３％ｎｏｒｍａｌ　ｄｏｎｋｅｙ　ｓｅｒｕｍ／ＰＢＳＴ中、室温で２時間ブロッキングした。次に、３％ｎｏｒｍａｌ　ｄｏｎｋｅｙ　ｓｅｒｕｍ／ＰＢＳＴにポリクローナルｇｏａｔ－ａｎｔｉ　Ｓｏｘ９抗体（１０００倍希釈、Ｒ＆Ｄ社製）を希釈し、４℃で４８時間反応させることにより、一次抗体反応を行った。反応終了後、ＰＢＳＴ溶液で洗浄し、３％ｎｏｒｍａｌ　ｄｏｎｋｅｙ　ｓｅｒｕｍ／ＰＢＳＴにｄｏｎｋｅｙ　ａｎｔｉ－ｇｏａｔ　ＩｇＧ（Ｈ＋Ｌ）Ａｌｅｘａ　Ｆｌｕｏｒ４８８抗体（１０００倍希釈、インビトロジェン社製）を希釈し、室温暗所で３時間反応させることにより、二次抗体反応を行った。反応終了後、暗所において、ＰＢＳＴ溶液およびＰＢＳ溶液で洗浄した。その後、脊髄切片をａｍｉｎｏｐｒｏｐｙｌｔｒｉｅｔｈｏｘｙｓｉｌａｎｅ（ＡＰＳ）でコートしたスライドグラス（松浪硝子工業社製）に貼り付け、切片周囲の余分なＰＢＳ溶液を除去した後、乾燥させた。続いて、退色防止剤ＶｅｃｔａＳｈｉｅｌｄ（Ｖｅｃｔｏｒ　Ｌａｂｏｌａｔｏｒｉｅｓ社製）をスライドグラスに滴下し、カバーガラスをかけ、ＶｅｃｔａＳｈｉｅｌｄが乾燥するまで暗所に静置し、その後４℃で保存した。観察には共焦点レーザー顕微鏡（ＬＳＭ７００、Ｚｅｉｓｓ社製）を使用した。

[0041] その結果を図１に示す。図１の左図に示したように、ｔｄＴｏｍａｔｏ陽性細胞は脊髄後角の表層に発現していた。また、図１に右図に示したようにアストロサイトマーカーであるＳｏｘ９は、脊髄後角広範に発現していた。このことから、アストロサイトは脊髄後角広範に存在するが、Ｈｅｓ５陽性のアストロサイトは、脊髄後角の表層に存在することが確認された。

[0042] ［実験例２］

（カプサイシン誘発の脊髄アストロサイトのCa^{2+}応答と下行性ノルアドレナリン神経の関与）

最初に、脊髄アストロサイト特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質Ｇ

ＣａＭＰ６ｍを発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／９－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ＧＣａＭＰ６ｍ－ＷＰＲＥを以下のようにして作製した。

[0043] ＧＣａＭＰ６ｍ（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃４０７５４）の配列をｐＥＮＴＲプラスミド（Ｔｈｅｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）にサブクローニングした。次に、このＧＣａＭＰ６ｍカセットをｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄプロモーター（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃１９９７４）を搭載したＡＡＶシャトルベクター（ｐＺａｃ２．１、Ｖｅｃｔｏｒ ｃｏｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａより入手）に挿入した。

[0044] 上記プラスミドを用いたウイルスベクター作製は定法（Ｓｃｉ Ｒｅｐ．，２０１５ Ｓｅｐ ２１；５：１４３０６）に従い実施した。Ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｋｉｄｎｅｙ ２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に上記プラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐプラスミド（ｐＡＡＶ２／９）及びヘルパープラスミド（ｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６）（Ｒｅｐ／Ｃａｐ及びｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６はＶｅｃｔｏｒ ｃｏｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａより入手）をトランスフェクションすることにより作製し、塩化セシウム密度勾配遠心法（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，２０１０ Ａｐｒ；１７（４）：５０３－１０）により精製した。ウイルスベクターはＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １００Ｋ ｆｉｌｔｅｒ ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を用いて０．００１％（ｖ／ｖ）Ｐｌｕｒｏｎｉｃ－Ｆ６８を含有したＰＢＳ溶液で透析した。ウイルスベクターの力価測定はＰｉｃｏ Ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅ社製）を用いて行い、使用時まで－８０℃で保存した。

[0045] ８～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア社製）の腹腔内に、生理食塩水、又はノルアドレナリン神経選択的毒素であるＤＳＰ－４［Ｎ－（２－ｃｈｌｏｒｏｅｔｈｙｌ）－Ｎ－ｅｔｈｙｌ－２－ｂｒｏｍｏｂｅｎｚｙｌａｍｉｎｅ］（シグマ社製）を５０ｍｇ／ｋｇで投与した。投与３～５日後に、ケタミン（１００ｍｇ／ｋｇ；ケタラール（登録商標）筋注用）

とキシラジン（１０ｍｇ／ｋｇ；セラクタール(登録商標)）の混合液を０．００５ｍＬ／ｇ皮下投与することで麻酔を行った。麻酔の効果を確認後、背部の毛を剃り、局所麻酔薬(キシロカイン（登録商標）ゼリー ２%)を塗布した。胸髄湾曲部を中心に正中に沿って３ｃｍ程皮膚を切開した。椎骨の第１腰髄の棘突起吻側先端から１ｍｍ側方の筋組織を直径２ｍｍ程度で切開し第１３胸髄と第１腰髄椎骨間の膜を露出した。ガラスキャピラリー（エッペンドルフ社製）を介して左側各椎骨間に、ウイルス濃度８．５×10^{12} ＧＣ／ｍＬで、０．７μＬを１か所、上記で作製した、脊髄アストロサイト特異的にカルシウム感受性蛍光タンパク質のＧＣａＭＰ６ｍを発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／９－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ＧＣａＭＰ６ｍ－ＷＰＲＥを微量注入した。処置後は５－０絹糸を用いて皮膚を縫い合わせた。縫合部には局所麻酔薬（キシロカイン（登録商標）ゼリー ２%）を塗布し動物の苦痛の軽減を図った。同時に希ヨードチンキとゲンタシン（登録商標）軟膏（０．１%）の塗布も行い感染の防止を図った。さらに術後翌日および２日後に、カルプロフェン（リマダイル（登録商標）注射液、カルプロフェンとして５ｍｇ／ｋｇ）を腹腔投与することで術後の苦痛軽減を図った。

[0046] ウイルス投与から３～４週間後に２光子励起顕微鏡を用いて、生きたままの動物で脊髄腰髄部における脊髄アストロサイトCa^{2+}イメージングを行うための観察用窓作製手術を行った。動物への麻酔処置は、鎮痛・炎症予防のためカルプロフェン（リマダイル（登録商標）注射液、カルプロフェンとして５ｍｇ／ｋｇ）、デキサメタゾン（デキサート（登録商標）注射液、デキサメタゾンとして０．２ｍｇ／ｋｇ）混合溶液を０．０１ｍＬ／ｇ腹腔投与した。

次に、ケタミン（１００ｍｇ／ｋｇ、ケタラール（登録商標）筋注用）とキシラジン（１０ｍｇ／ｋｇ、セラクタール（登録商標））の混合液を０．００５ｍＬ／ｇ皮下投与することで麻酔を行った。麻酔の効果を確認後、背部の毛を剃り、局所麻酔薬（キシロカイン（登録商標）ゼリー２%）を塗布した。観察窓作製中及びイメージング中の眼の乾燥予防のため動物用眼軟膏

（クロラムフェニコール２ｍｇ／０．１ｇ、マイコクロリン（登録商標））の塗布を行った。胸髄湾曲部を中心に正中に沿って３ｃｍ程皮膚を切開した。椎骨の第１３胸髄から第１／２腰髄背側を露出するために結合組織を切り離した。筋肉はできる限り切断をさけて剥離した。露出させた椎骨背部を専用の固定具を用いて固定し、椎弓切除を行った。露出した脊髄を覆うように専用のステンレス製器具を固定した。組織と器具の間隙に細胞毒性のない透明なシリコンエストラマーを充填し観察用窓をカバーガラスで覆った。観察器具を設置した部分以外の皮膚を縫い合わせた。

[0047] 観察は観察用窓作製時に投与したケタミン／キシラジン混合溶液の麻酔から覚醒の後、イソフルラン吸入麻酔下（エスカイン（登録商標）；導入時５．０％、維持には１．２～１．５％混合空気）において２光子励起顕微鏡（Ｏｌｙｍｐｕｓ　ＦＶ１０００、オリンパス社製）を使用し、対物レンズはＯｌｙｍｐｕｓ　ＸＬＰｌａｎＮ（水浸２５倍、開口数１．０５）、ＧＣａＭＰ６ｍの励起には９００ｎｍの波長のレーザー（～２０ｍＷ）を用いた。レーザー照射に伴う光毒性を避けるために０．３Ｈｚの頻度で画像を取得した。３７℃に設定したｓｍａｌｌ　ｈｅａｔ　ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｒ（ユニークメディカル社製）を用いてマウス直腸温が３４℃以上になるように体温を維持した。

[0048] 次に、マウス足裏に０．１μｇ／μＬカプサイシン溶液１０μＬを投与し、投与後３０分後まで観察を行った。イメージング画像はＩｍａｇｅ　Ｊを用いて解析し、拍動に伴った観察画像のずれ補正はＴｕｒｂｏＲｅｇを用いて行った（ＩＥＥＥ　Ｔｒａｎｓ　Ｉｍａｇｅ　Ｐｒｏｃｅｓｓ．，１９９８；７（１）：２７－４１）。細胞の形態および下記式で表される蛍光シグナルのピーク値（Ｐｅａｋ　ａｍｐｌｉｔｕｄｅ）ΔＦ／Ｆの値が３０％以上を解析対象とした。解析対象領域は直径１０μｍの範囲で選択し、Ｉｍａｇｅ　Ｊのｍｕｌｔｉ　ｍｅａｓｕｒｅ　ｐｌｕｇｉｎを用いて解析を行った。

[0049] 蛍光シグナルのピーク値ΔＦ／Ｆ＝１００＊（Ｆｔ－F_0）／F_0

ｔ：蛍光シグナルがピークに達した時の観察時間

Ｆｔ：ピーク時の蛍光シグナル

F_0：観察開始時から５０秒の無処置時における蛍光シグナルの平均値

[0050] その結果を、図２の左図に示す。図２の左図に示すように、マウス足裏へのカプサイシン投与時における脊髄アストロサイトのカルシウム応答が、ノルアドレナリン神経選択的毒素であるＤＳＰ－４により抑制された。このことから、カプサイシン誘発の痛み刺激により、脊髄アストロサイトのカルシウム応答が下行性アドレナリン神経を介して誘発されることが確認された。

[0051] ［実験例３］

（カプサイシン誘発の脊髄アストロサイトのCa^{2+}応答におけるアストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤の効果）

実験例２において、ＤＳＰ－４を投与せず、又、カプサイシン投与前に、軽度のイソフルラン麻酔下において、ＰＢＳ溶液又はアドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤であるシロドシン溶液（３ｎｍｏｌ／５μＬ、和光純薬社製）を３０Ｇの注射針を付けたＨａｍｉｌｔｏｎマイクロシリンジを用いて脊髄くも膜下腔内へ定法［Ｅｕｒ Ｊ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，１９８０ Ｏｃｔ １７；６７（２－３）：３１３－６］に従い投与する以外は、実験例２と同様に行った。カプサイシンは、ＰＢＳ溶液又はシロドシン溶液投与３０～４０分後に投与した。

[0052] その結果を図２右図に示す。図２の右図に示すように、マウス足裏へのカプサイシン投与時における脊髄アストロサイトのカルシウム応答が、アドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤であるシロドシンにより抑制された。このことから、カプサイシン誘発の痛み刺激による下行性ノルアドレナリン神経の活性化は、アドレナリンα１Ａ受容体の活性化を阻害する物質により抑制されることが確認された。

[0053] ［実験例４］

（Ｈｅｓ５陽性脊髄アストロサイト刺激時の軽度機械刺激に対するマウスの行動解析）

最初に、Ｈｅｓ５陽性アストロサイト特異的にｈＭ３Ｄｑ受容体を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＥＦ１α-ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥを以下のようにして作製した。

[0054] ｈＭ３Ｄｑ（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃４５５４７）の配列をｐＥＮＴＲプラスミド（Ｔｈｅｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）にサブクローニングした。また、ｐＡＡＶ－ＣＡ－ＦＬＥＸ（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃３８０４２）を利用し、ＣＡプロモーターをＥＦ１αに置換したベクターｐＡＡＶ－ＥＦ１α－ＦＬＥＸも作製し、上記ｈＭ３ＤｑカセットをｐＡＡＶ－ＥＦ１α－ＦＬＥＸに挿入した。

[0055] 上記プラスミドを用いたウイルスベクター作製は定法（Ｓｃｉ Ｒｅｐ．，２０１５ Ｓｅｐ ２１；５：１４３０６）に従い実施した。Ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｋｉｄｎｅｙ ２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に上記プラスミド、及びＲｅｐ／Ｃａｐプラスミド（ｐＡＡＶ２／５）及びヘルパープラスミド（ｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６）（Ｒｅｐ／Ｃａｐ及びｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６はＶｅｃｔｏｒ ｃｏｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａより入手）をトランスフェクションすることにより作製し、塩化セシウム密度勾配遠心法（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，２０１０ Ａｐｒ；１７（４）：５０３－１０）により精製した。得られたアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＥＦ１α-ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥはＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １００Ｋ ｆｉｌｔｅｒ ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を用いて０．００１％（ｖ／ｖ）Ｐｌｕｒｏｎｉｃ－Ｆ６８を含有したＰＢＳ溶液で透析した。ウイルスベクターの力価測定はＰｉｃｏ Ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅ社製）を用いて行い、使用時まで－８０℃で保存した。

[0056] ８～１２週齢のＨｅｓ５ＣｒｅＥＲＴ２マウス（Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．，２０１２ Ｆｅｂ １４；３：６７０)を用い、ケタミンとキシラジンの混合液を０．００５ｍＬ／ｇ皮下投与することで麻酔を行った。麻酔の効果

を確認後、背部の毛を剃り、局所麻酔薬(キシロカイン（登録商標）ゼリー２％)を塗布した。胸髄湾曲部を中心に正中に沿って３ｃｍ程皮膚を切開した。椎骨の第１３胸髄および第１／２腰髄の棘突起吻側先端から１ｍｍ側方の筋組織を直径２ｍｍ程度で切開し第１２胸髄と第１３胸髄、第１３胸髄と第１腰髄および第１腰髄と第２腰髄椎骨間の膜を露出した。ガラスキャピラリー（エッペンドルフ社製）を介して左側各椎骨間に、ウイルス濃度１×１０^{12}ＧＣ／ｍＬで、０．５～０．６μＬをそれぞれ１か所、合計３か所に、上記で作製した、Ｈｅｓ５陽性アストロサイト特異的にｈＭ３Ｄｑ受容体を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＥＦ１α-ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥを微量注入した。処置後は５－０絹糸を用いて皮膚を縫い合わせた。縫合部には局所麻酔薬（キシロカイン（登録商標）ゼリー ２％）を塗布し動物の苦痛の軽減を図った。同時に希ヨードチンキとゲンタシン（登録商標）軟膏（０．１％）の塗布も行い感染の防止を図った。

[0057] 次に、タモキシフェン（シグマ社製）溶液（溶媒にコーン油を使用し２０ｍｇ／ｍＬで調製したもの）２ｍｇ／０．１ｍＬを１日１回１０日間、マウスへ腹腔内投与することによりＣｒｅリコンビナーゼ活性を誘導し、ｈＭ３Ｄｑ受容体をＨｅｓ５陽性アストロサイト特異的に発現させた。なお、アデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＥＦ１α-ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥは、ｈＭ３Ｄｑ遺伝子を逆行性に配置しているため、タモキシフェンを投与した場合は、Ｈｅｓ５陽性アストロサイトでＣｒｅリコンビナーゼ活性が誘導され、ウイルスベクター内のｈＭ３Ｄｑ配列の部分が反転し、ｈＭ３Ｄｑ受容体が発現するが、Ｈｅｓ５陰性アストロサイトでは、ウイルスベクター内のｈＭ３Ｄｑ配列の部分が反転しないためｈＭ３Ｄｑ受容体が発現しない。

[0058] その結果を図３の左図に示す。図３左図に示すように、ｈＭ３Ｄｑ受容体は、脊髄後角表層のＨｅｓ５陽性アストロサイトに発現した。

[0059] 次に、ｈＭ３Ｄｑ受容体をＨｅｓ５陽性アストロサイト特異的に発現させたマウスに、ｈＭ３Ｄｑ受容体の選択的刺激薬であるクロザピン－Ｎ－オキ

サイド［Ｃｌｏｚａｐｉｎｅ－Ｎ－ｏｘｉｄｅ（ＣＮＯ；Ｅｎｚｏ　Ｌｉｆｅ　Ｓｃｉｅｎｃｅ社製）］を含む溶液１０ｍｇ／ｋｇを腹腔内投与し、動物の後肢足底部に知覚試験用フィラメント（ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ　Ｆｉｌａｍｅｎｔ　０．０２～２ｇ；Ｎｏｒｔｈ　Ｃｏａｓｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ社製）を押しあて、アップダウン法［Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，１９９４，５３（１）：５５－６３］に従って５回から９回の異なった力のフィラメントで評価した。その軽度機械刺激に対する動物の後肢逃避行動を投与０分後、３０分後、６０分後、９０分後、１２０分後、１８０分後に経時的に観察し、５０％逃避閾値（Ｐａｗ　ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を算出した。コントロールとして、それぞれのマウスにＣＮＯの代わりに、生理食塩水を投与し、上記と同様に５０％逃避閾値を算出した。

[0060] その結果を図３右図に示す。図３右図に示すように、脊髄後角表層のＨｅｓ５陽性アストロサイトに発現したｈＭ３Ｄｑ受容体をＣＮＯで刺激することにより、マウス左後肢に逃避閾値の低下が観察された。なお、ウイルスベクターを投与していない右側脊髄に投射している右後肢においては逃避閾値の低下は観察されなかった。図３の結果から、脊髄後角表層に存在するＨｅｓ５陽性アストロサイトを刺激することにより、軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）が誘発されることが明らかとなった。

[0061] ［実験例５］

（Ｈｅｓ５陰性脊髄アストロサイト刺激時の軽度機械刺激に対するマウスの行動解析）

最初に、Ｈｅｓ５陰性アストロサイト特異的にｈＭ３Ｄｑ受容体を発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥを以下のようにして作製した。

[0062] ｈＭ３Ｄｑ（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃４５５４７）の配列およびｐＡＡＶ－ＣＡ－ＦＬＥＸ（ａｄｄｇｅｎｅ社製、＃３８０４２）を利用し、ｈＭ３Ｄｑ遺伝子を順行性に配置したＦＬＥＸ－ｈＭ３ＤｑをｐＥＮＴＲプラスミド（Ｔｈｅｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）にサブクローニングした。このカセット

を、ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄプロモーターを搭載したｐＺａｃ２．１へ挿入した。

[0063] 上記プラスミドを用いたウイルスベクター作製は定法（Ｓｃｉ Ｒｅｐ．，２０１５ Ｓｅｐ ２１；５：１４３０６）に従い実施した。Ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｋｉｄｎｅｙ ２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に上記プラスミド、Ｒｅｐ／Ｃａｐプラスミド（ｐＡＡＶ２／５）及びヘルパープラスミド（ｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６）（Ｒｅｐ／Ｃａｐ及びｐＡｄ ＤｅｌｔａＦ６はＶｅｃｔｏｒ ｃｏｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａより入手）をトランスフェクションすることにより作製し、塩化セシウム密度勾配遠心法（Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．，２０１０ Ａｐｒ；１７（４）：５０３－１０）により精製した。得られたアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥはＡｍｉｃｏｎ Ｕｌｔｒａ １００Ｋ ｆｉｌｔｅｒ ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を用いて０．００１％（ｖ／ｖ）Ｐｌｕｒｏｎｉｃ－Ｆ６８を含有したＰＢＳ溶液で透析した。ウイルスベクターの力価測定はＰｉｃｏ Ｇｒｅｅｎ ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｐｒｏｂｅ社製）を用いて行い、使用時まで－８０℃で保存した。

[0064] ８～１２週齢のＨｅｓ５－ＣｒｅＥＲＴ２マウス（Ｎａｔ Ｃｏｍｍｕｎ．， ２０１２ Ｆｅｂ １４；３：６７０)を用い、ケタミンとキシラジンの混合液を０．００５ｍＬ／ｇ皮下投与することで麻酔を行った。麻酔の効果を確認後、背部の毛を剃り、局所麻酔薬(キシロカイン（登録商標）ゼリー２％)を塗布した。胸髄湾曲部を中心に正中に沿って３ｃｍ程皮膚を切開した。椎骨の第１３胸髄および第１／２腰髄の棘突起吻側先端から１ｍｍ側方の筋組織を直径２ｍｍ程度で切開し第１２胸髄と第１３胸髄、第１３胸髄と第１腰髄および第１腰髄と第２腰髄椎骨間の膜を露出した。ガラスキャピラリー（エッペンドルフ社製）を介して左側各椎骨間に、ウイルス濃度１×１０^{12} ＧＣ／ｍＬで、０．５～０．６μＬをそれぞれ１か所、合計３か所に、上記で作製した、Ｈｅｓ５陰性アストロサイト特異的にｈＭ３Ｄｑ受容体を

発現させるアデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ｈＭ３Ｄｑ－ＷＰＲＥを微量注入した。処置後は５－０絹糸を用いて皮膚を縫い合わせた。縫合部には局所麻酔薬（キシロカイン（登録商標）ゼリー ２％）を塗布し動物の苦痛の軽減を図った。同時に希ヨードチンキとゲンタシン（登録商標）軟膏（０．１％）の塗布も行い感染の防止を図った。

[0065] 次に、コーン油又はタモキシフェン（シグマ社製）溶液（溶媒にコーン油を使用し２０ｍｇ／ｍｌで調製したもの）２ｍｇ／０．１ｍＬを１日１回１０日間、マウスへ腹腔内投与することによりＣｒｅリコンビナーゼ活性を誘導し、ｈＭ３Ｄｑ受容体をＨｅｓ５陰性アストロサイト特異的に発現させた。なお、アデノ随伴ウイルスベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ｇｆａＡＢＣ$_1$Ｄ－ｈＭ３Ｄｑは、ｈＭ３Ｄｑ遺伝子を順行性に配置しているため、コーン油を投与した場合は、Ｃｒｅリコンビナーゼ活性の有無に関わらず、アストロサイトでｈＭ３Ｄｑ受容体が発現する。一方、タモキシフェンを投与した場合は、Ｈｅｓ５陽性アストロサイトでＣｒｅリコンビナーゼ活性が誘導されるため、ウイルスベクター内のｈＭ３Ｄｑ配列の部分が反転し、ｈＭ３Ｄｑ受容体が発現しなくなるが、Ｈｅｓ５陰性アストロサイトではＣｒｅリコンビナーゼが誘導されないため、ウイルスベクター内のｈＭ３Ｄｑ配列の部分が反転せず、ｈＭ３Ｄｑ受容体が発現する。

[0066] その結果を、図４の左図に示す。図４左図に示すように、コーン油投与群において脊髄後角広範のアストロサイトにｈＭ３Ｄｑ受容体が発現したが、タモキシフェン投与群では脊髄後角深層部に存在するＨｅｓ５陰性アストロサイトにのみｈＭ３Ｄｑ受容体が発現した。

[0067] ｈＭ３Ｄｑ受容体をＨｅｓ５陰性アストロサイト特異的に発現させたマウスに、ｈＭ３Ｄｑ受容体の選択的刺激薬であるクロザピン－Ｎ－オキサイド［Ｃｌｏｚａｐｉｎｅ－Ｎ－ｏｘｉｄｅ（ＣＮＯ；Ｅｎｚｏ Ｌｉｆｅ Ｓｃｉｅｎｃｅ社製）］を含む溶液１０ｍｇ／ｋｇを腹腔内投与し、動物の後肢足底部に知覚試験用フィラメント（ｖｏｎ Ｆｒｅｙ Ｆｉｌａｍｅｎｔ

０．０２～２ｇ；Ｎｏｒｔｈ　Ｃｏａｓｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ社製）を押しあて、アップダウン法［Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　Ｍｅｔｈｏｄｓ，１９９４，５３（１）：５５－６３］に従って５回から９回の異なった力のフィラメントで評価した。その軽度機械刺激に対する動物の後肢逃避行動を投与０分後、３０分後、６０分後、９０分後、１２０分後、１８０分後に経時的に観察し、５０％逃避閾値（Ｐａｗ　ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を算出した。

[0068] その結果を図４右図に示す。図４右図に示すように、脊髄後角広範に存在するアストロサイトに発現しているｈＭ３Ｄｑ受容体をＣＮＯで刺激すると、マウスの後肢逃避閾値が低下したが、Ｈｅｓ５陰性アストロサイトに発現しているｈＭ３Ｄｑ受容体をＣＮＯで刺激しても、マウスの後肢逃避閾値に大きな変化はなかった。なお、ウイルスベクターを投与していない右側脊髄に投射する右後肢においては逃避閾値の低下は観察されなかった。図４の結果から、脊髄後角深層部に存在するＨｅｓ５陰性アストロサイトを刺激しても、軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）は誘発されないことが明らかとなった。

[0069] ［実験例６］

（アドレナリンα１受容体アゴニストの脊髄くも膜下腔内投与による軽度機械刺激痛覚過敏）

軽度のイソフルラン麻酔下において、８～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア社製）に３０Ｇの注射針を付けたハミルトンマイクロシリンジを用いて、フェニレフリン［（Ｒ）－（－）－ｐｈｅｎｙｌｅｐｈｒｉｎｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；和光純薬社製］を１５ｐｍｏｌ／５μＬ生理食塩水、及び５０ｐｍｏｌ／５μＬ生理食塩水を脊髄くも膜下腔内に投与した。

[0070] 次に、動物の後肢足底部に知覚試験用フィラメント（ｖｏｎ　Ｆｒｅｙ　Ｆｉｌａｍｅｎｔ　０．０２～２ｇ；Ｎｏｒｔｈ　Ｃｏａｓｔ　Ｍｅｄｉｃａｌ社製）を押しあて、アップダウン法［Ｊ．Ｎｅｕｒｏｓｃｉ　Ｍｅｔｈ

ｏｄｓ，１９９４，５３（１）：５５－６３］に従って５回から９回の異なった力のフィラメントで評価した。その軽度機械刺激に対する動物の後肢逃避行動を投与０分後、及び３０分後に観察し、５０％逃避閾値（Ｐａｗ　ｗｉｔｈｄｒａｗａｌ　ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ）を算出した。

その結果を図５に示す。図５に示したように、野生型マウスの脊髄くも膜下腔内へアドレナリンα１受容体アゴニストであるフェニレフリンを投与すると、用量依存的な後肢逃避閾値の低下が観察された。これにより、脊髄のアドレナリンα１受容体の活性化により軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）が誘発されることが確認された。

[0071] ［実験例７］

（フェニレフリン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対するアドレナリンα１Ａ受容体の関与１）

８～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア社製）を、軽度のイソフルラン麻酔下において、リン酸緩衝液（ＰＢＳ）又は３ｎｍｏｌ／５μＬシロドシン溶液（和光純薬社製）を３０Ｇの注射針を付けたハミルトンマイクロシリンジを用いて、定法［Ｅｕｒ　Ｊ　Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．，１９８０　Ｏｃｔ　１７；６７（２－３）：３１３－６］に従い、脊髄くも膜下腔内へ投与した。ＰＢＳ又はシロドシン投与３０分後に、フェニレフリン［（Ｒ）－（－）－ｐｈｅｎｙｌｅｐｈｒｉｎｅ　ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；和光純薬社製］を５０ｐｍｏｌ／５μＬ生理食塩水を脊髄くも膜下腔内に投与した。

[0072] 次に、実験例５と同様にして、マウスの行動解析を行い、５０％逃避閾値を算出した。その結果を図６左図に示す。図６左図に示したように、アドレナリンα１Ａ受容体選択的拮抗剤であるシロドシンを、脊髄くも膜下腔内に前投与すると、フェニレフリンによる脊髄くも膜下内腔投与で誘発される後肢逃避閾値の低下が抑制された。このことから、アドレナリンα１Ａ受容体拮抗剤は、フェニレフリンによる軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）を抑制することが確認された。

[0073] ［実験例８］

（フェニレフリン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対するアドレナリンα１Ａ受容体の関与２）

最初に、アドレナリンα１Ａ受容体選択的ノックダウンベクターＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ＡＤＲＡ１Ａ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥ及びコントロールベクターＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｃｒａｍｂｌｅ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥを以下のようにして作製した。

[0074] ＡｃＧＦＰおよびｍｉｒ３０－ｓｈＲＮＡ（ｐＧＩＰＺ－ｍｉｒ３０－ｓｈＧｒａｐｄｈ、Ｔｈｅｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）の配列をｐＥＮＴＲプラスミド（Ｔｈｅｍｏｆｉｓｈｅｒ社製）にサブクローニングした。次に、ｐＥＮＴＲ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０のターゲット配列の部分を配列番号１で表される塩基配列からなる配列に置換した。得られたＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｈＲＮＡカセットはｐＡＡＶ－ＣＡ－ＦＬＥＸに挿入し、ｐＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ＡＤＲＡ１Ａ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥを得た。

[0075] また、ｐＥＮＴＲ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０のターゲット配列の部分を配列番号２で表される塩基配列からなる配列に置換し、得られたＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｈＲＮＡカセットはｐＡＡＶ－ＣＡ－ＦＬＥＸに挿入し、ｐＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｃｒａｍｂｌｅ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥを得た。

[0076] 上記プラスミドを用いたウイルスベクター作製は定法（Ｓｃｉ Ｒｅｐ．，２０１５ Ｓｅｐ ２１；５：１４３０６）に従い実施した。Ｈｕｍａｎ ｅｍｂｒｙｏｎｉｃ ｋｉｄｎｅｙ ２９３（ＨＥＫ２９３）細胞に、上記で得られたｐＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ＡＤＲＡ１Ａ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥ又はｐＡＡＶ－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｃｒａｍｂｌｅ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥ及びＲｅｐ／Ｃａｐプラスミド（ｐＡＡＶ２／５）及びヘルパープラスミド（ｐＡｄ Ｄｅｌ

ｔａＦ６）（Ｒｅｐ／Ｃａｐ及びｐＡｄ　ＤｅｌｔａＦ６はＶｅｃｔｏｒ ｃｏｒｅ ｏｆ ｔｈｅ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｐｅｎｎｓｙｌｖａｎｉａより入手）をトランスフェクションすることにより作製し、塩化セシウム密度勾配遠心法（Ｇｅｎｅ　Ｔｈｅｒ．，２０１０　Ａｐｒ；１７（４）：５０３－１０）により精製した。得られたＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ＡＤＲＡ１Ａ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥ及びコントロールベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ｓｃｒａｍｂｌｅ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥはＡｍｉｃｏｎ　Ｕｌｔｒａ　１００Ｋ　ｆｉｌｔｅｒ　ｕｎｉｔ（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ社製）を用いて０．００１％（ｖ／ｖ）Ｐｌｕｒｏｎｉｃ－Ｆ６８を含有したＰＢＳ溶液で透析した。ウイルスベクターの力価測定はＰｉｃｏ　Ｇｒｅｅｎ　ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ　ｒｅａｇｅｎｔ（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｐｒｏｂｅ社製）を用いて行い、使用時まで－８０℃で保存した。

[0077] ８～１２週齢のＨｅｓ５－ＣｒｅＥＲＴ２マウス（Ｎａｔ　Ｃｏｍｍｕｎ．，　２０１２　Ｆｅｂ　１４；３：６７０)を用い、ケタミンとキシラジンの混合液を０．００５ｍＬ／ｇ皮下投与することで麻酔を行った。麻酔の効果を確認後、背部の毛を剃り、局所麻酔薬(キシロカイン（登録商標）ゼリー２％)を塗布した。胸髄湾曲部を中心に正中に沿って３ｃｍ程皮膚を切開した。椎骨の第１腰髄の棘突起吻側先端から１ｍｍ側方の筋組織を直径２ｍｍ程度で切開し、第１３胸髄と第１腰髄椎骨間の膜を露出した。ガラスキャピラリー（エッペンドルフ社製）を介して左側各椎骨間の両端に、ウイルス濃度1×10^{12}ＧＣ／ｍＬで、０．５～０．６μＬをそれぞれ２か所、上記の配列番号１で表される塩基配列を含むアドレナリンα１Ａ受容体選択的ノックダウンベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０－ＡＤＲＡ１Ａ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥを微量注入し、Ｈｅｓ５陽性アストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体をノックダウンしたマウスを作製した。また、コントロールベクターとして、上記の配列番号２で表される塩基配列を含むベクターＡＡＶ２／５－ＦＬＥＸ－ＣＡ－ＡｃＧＦＰ－ｍｉｒ３０

－ｓｃｒａｍｂｌｅ－ｓｈＲＮＡ－ＷＰＲＥを微量注入し、コントロールマウスを作製した。処置後は５－０絹糸を用いて皮膚を縫い合わせた。縫合部には局所麻酔薬（キシロカイン（登録商標）ゼリー ２％）を塗布し動物の苦痛の軽減を図った。同時に希ヨードチンキとゲンタシン（登録商標）軟膏（０．１％）の塗布も行い感染の防止を図った。

[0078] 次に、タモキシフェン（シグマ社製）溶液（溶媒にコーン油を使用し２０ｍｇ／ｍＬで調製したもの）２ｍｇ／０．１ｍＬを１日１回１０日間、上記で作製したマウスへ腹腔内投与することによりＣｒｅリコンビナーゼ活性を誘導した。アデノ随伴ウイルスベクター投与２８日後に、フェニレフリン［（Ｒ）－（－）－ｐｈｅｎｙｌｅｐｈｒｉｎｅ ｈｙｄｒｏｃｈｌｏｒｉｄｅ；和光純薬社製］を５０ｐｍｏｌ／５μＬ生理食塩水を脊髄くも膜下腔内に投与し、実験例６と同様にして、マウスの行動解析を行い、５０％逃避閾値を算出した。その結果を図６右図に示す。

[0079] 図６右図に示したように、Ｈｅｓ５陽性アストロサイト特異的アドレナリンα１Ａ受容体をノックダウンすることにより、フェニレフリンによる脊髄くも膜下腔内投与で誘発される後肢逃避閾値の低下が抑制された。このことから、アストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体を発現抑制することにより、フェニレフリンによる軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）が抑制されることが確認された。

[0080] ［実験例９］

（カプサイシン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対する下行性ノルアドレナリン神経の関与）

８～１２週齢のＣ５７ＢＬ／６Ｊマウス（日本クレア社製）の腹腔内に生理食塩水、又はＤＳＰ－４［Ｎ－（２－ｃｈｌｏｒｏｅｔｈｙｌ）－Ｎ－ｅｔｈｙｌ－２－ｂｒｏｍｏｂｅｎｚｙｌａｍｉｎｅ］（シグマ社製）を５０ｍｇ／ｋｇで投与した。投与３日後に、カプサイシン溶液０．１６μｇ／μＬを１０μＬ足裏に投与し、その後、実験例４と同様にして、５０％逃避閾値を算出した。その結果を図７に示す。

[0081] 図７に示したように、ノルアドレナリン神経選択的毒素であるＤＳＰ－４を投与することにより、ノルアドレナリン神経を破壊すると、カプサイシン誘発の後肢逃避閾値の低下が抑制された。このことにより、ノルアドレナリン神経が、軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）に関与することが明らかとなった。

[0082] ［実験例１０］

（カプサイシン誘発の軽度機械刺激痛覚過敏に対するＨｅｓ５陽性アストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体の関与）

実験例８で作製したＨｅｓ５陽性アストロサイト特異的アドレナリンα１Ａ受容体ノックダウンマウスに、カプサイシン溶液０．１６μｇ／μＬを１０μＬ足裏に投与し、実験例４と同様にして、５０％逃避閾値を算出した。その結果を図８に示す。

[0083] 図８に示したように、脊髄後角のＨｅｓ５陽性アストロサイト選択的にアドレナリンα１Ａ受容体をノックダウンすることにより、カプサイシン誘発の後肢逃避閾値が顕著に抑制された。このことにより、Ｈｅｓ５陽性アストロサイトのアドレナリンα１Ａ受容体の発現を抑制することにより、軽度機械刺激に対する疼痛様行動（アロディニア）が抑制されることが明らかとなった。

産業上の利用可能性

[0084] 本発明によれば、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を有効成分として含有する鎮痛剤、及び、アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択することを特徴とする、鎮痛剤のスクリーニング方法を提供することができる。

請求の範囲

[請求項1] アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を有効成分として含有する鎮痛剤。

[請求項2] 前記アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質が、アドレナリンα１受容体拮抗剤又はアドレナリンα１受容体発現抑制剤である請求項１に記載の鎮痛剤。

[請求項3] 前記アストロサイトが脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである、請求項１又は２に記載の鎮痛剤。

[請求項4] 前記脊髄後角の表層に存在するアストロサイトが、Ｈｅｓ５を発現しているアストロサイトである、請求項３に記載の鎮痛剤。

[請求項5] 前記アドレナリンα１受容体が、アドレナリンα１Ａ受容体である、請求項１～４のいずれか一項に記載の鎮痛剤。

[請求項6] 前記鎮痛剤が、慢性疼痛治療剤である、請求項１～５のいずれか一項に記載の鎮痛剤。

[請求項7] アストロサイトのアドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質を選択することを特徴とする、鎮痛剤のスクリーニング方法。

[請求項8] 前記アドレナリンα１受容体からのシグナルを阻害する物質が、アドレナリンα１受容体拮抗剤又はアドレナリンα１受容体発現抑制剤である請求項７に記載の方法。

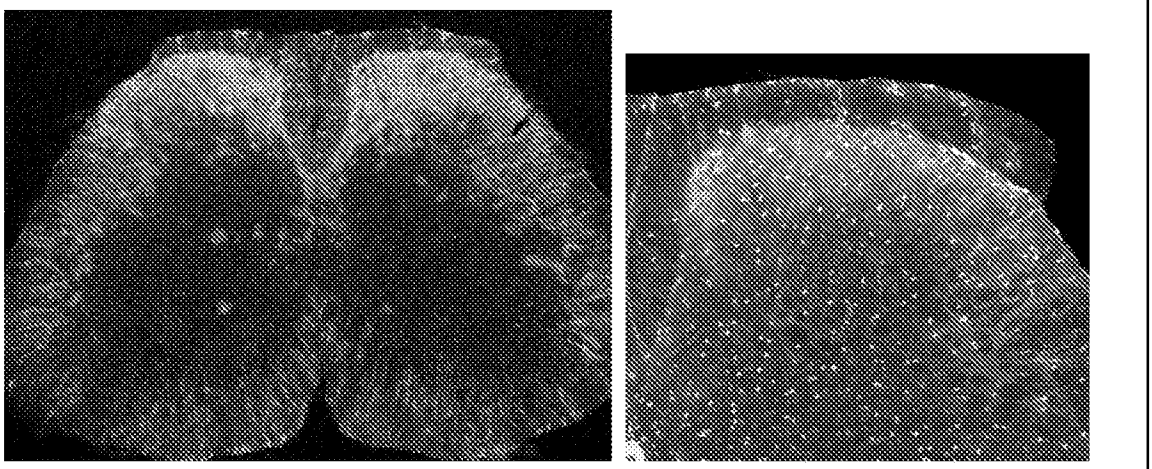
[請求項9] 前記アストロサイトが脊髄後角の表層に存在するアストロサイトである、請求項７又は８に記載の方法。

[請求項10] 前記脊髄後角の表層に存在するアストロサイトが、Ｈｅｓ５を発現しているアストロサイトである、請求項９に記載の方法。

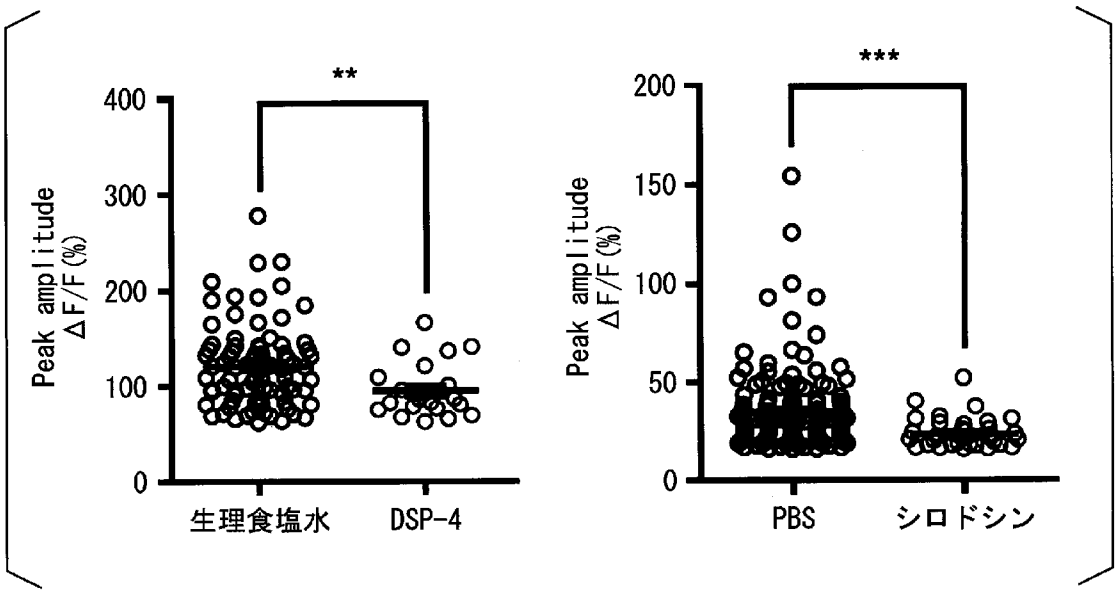
[請求項11] 前記アドレナリンα１受容体が、アドレナリンα１Ａ受容体である、請求項７～１０のいずれか一項に記載の方法。

[請求項12] 前記鎮痛剤が、慢性疼痛治療剤である、請求項７～１１のいずれか一項に記載の方法。

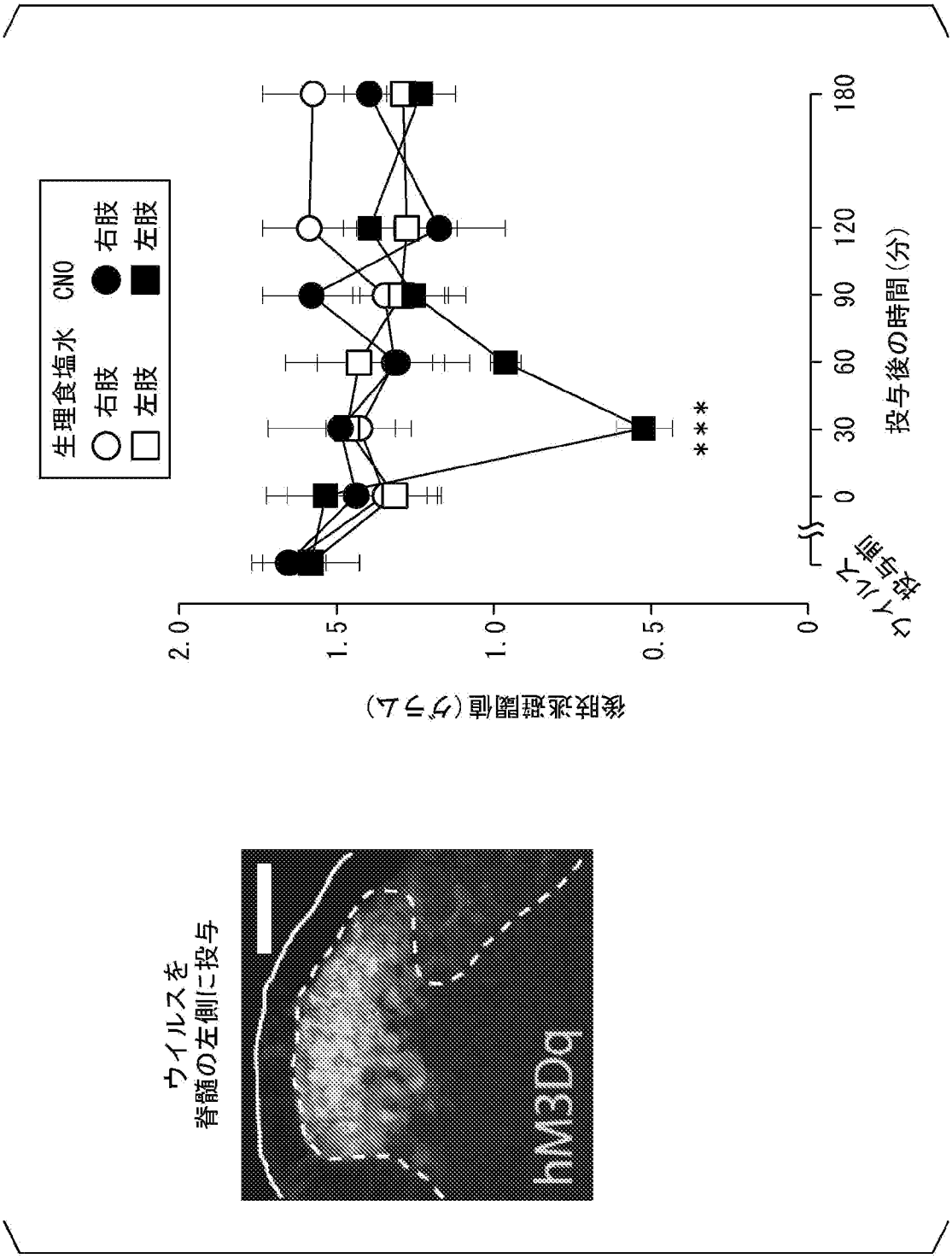
[図1]



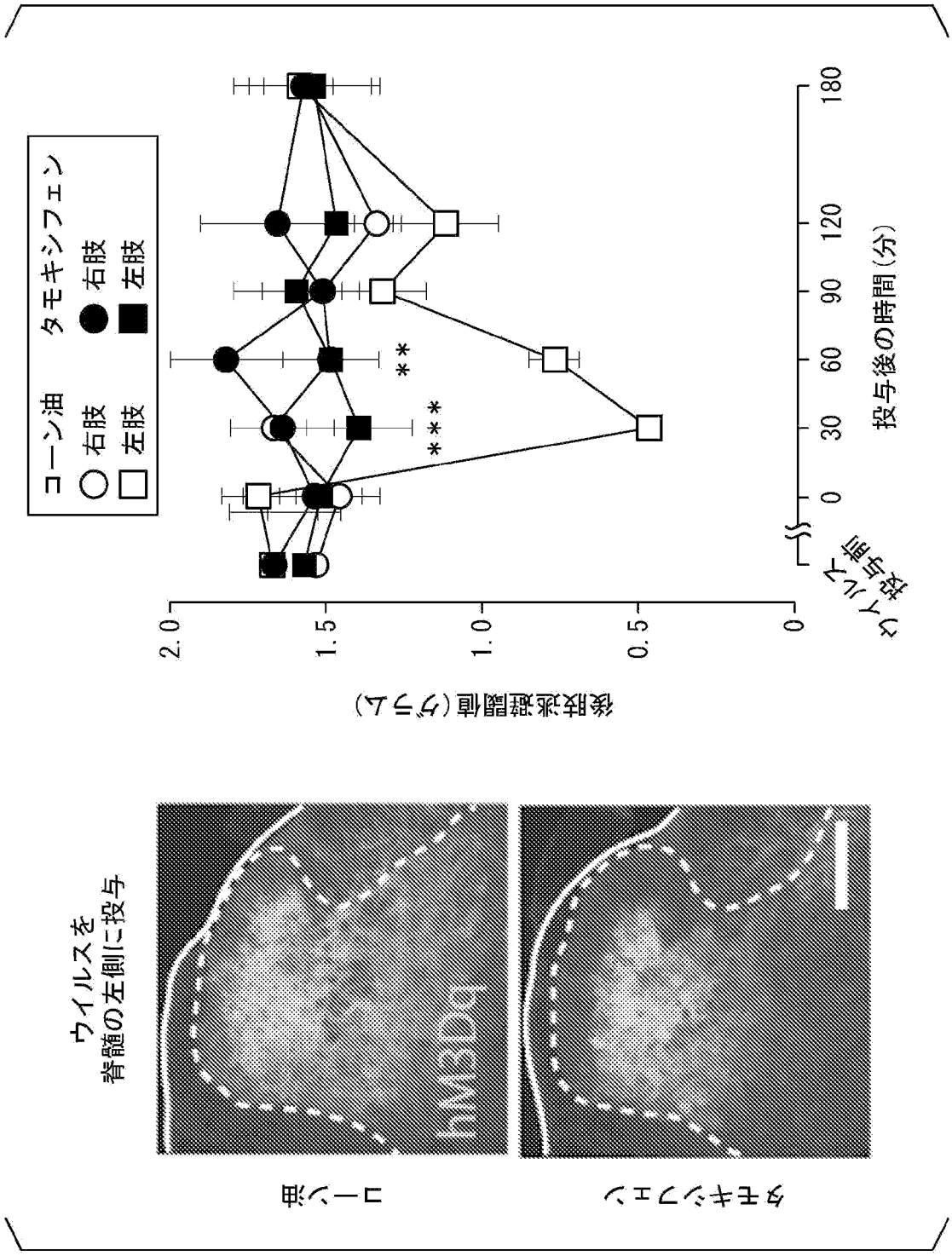
[図2]


**
400
300
200
100
0
Peak amplitude
ΔF/F(%)
生理食塩水
DSP-4
***
200
150
100
50
0
Peak amplitude
ΔF/F(%)
PBS
シロドシン

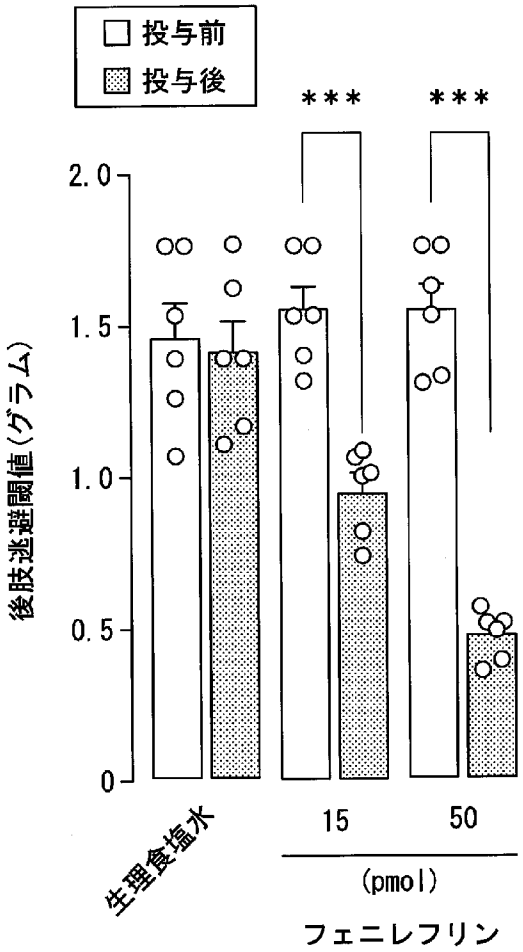
[図3]


生理食塩水 CNO
右肢 右肢
左肢 左肢
後肢遊脚値（グラム）
2.0
1.5
1.0
0.5
0
＊＊＊
0
30
60
90
120
180
投与後の時間（分）
ウイルスを
背髄の左側に投与
hM3Dq

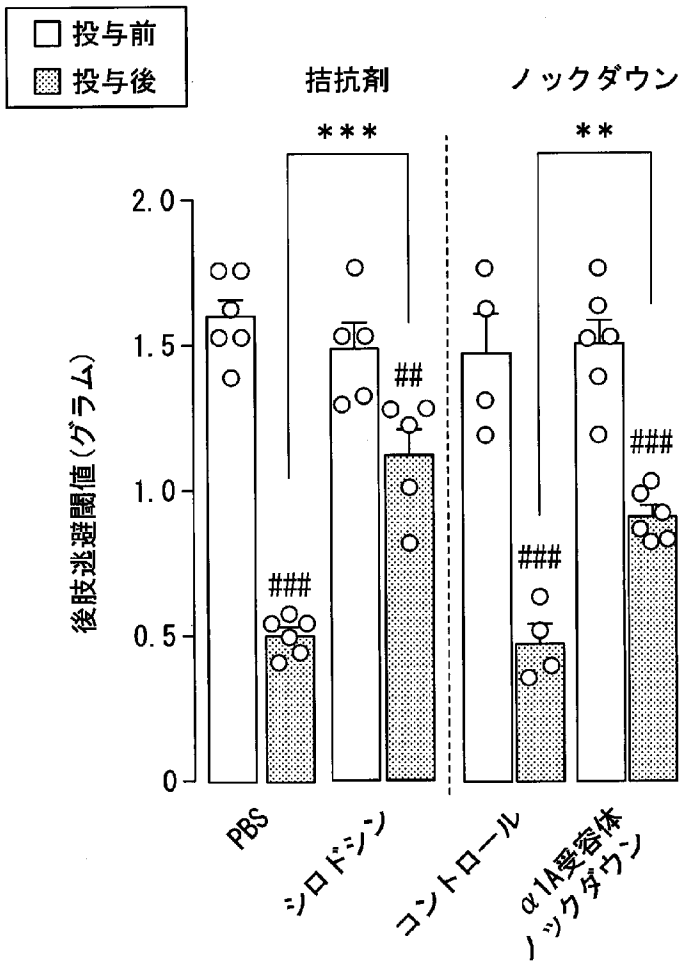
[図4]


ウイルスを
背髄の左側に投与
コーン油
タモキシフェン
hM3Dq
コーン油
右肢
左肢
タモキシフェン
右肢
左肢
**
***
後肢逃避閾値（グラム）
2.0
1.5
1.0
0.5
0
投与後
0
30
60
90
120
180
投与後の時間（分）

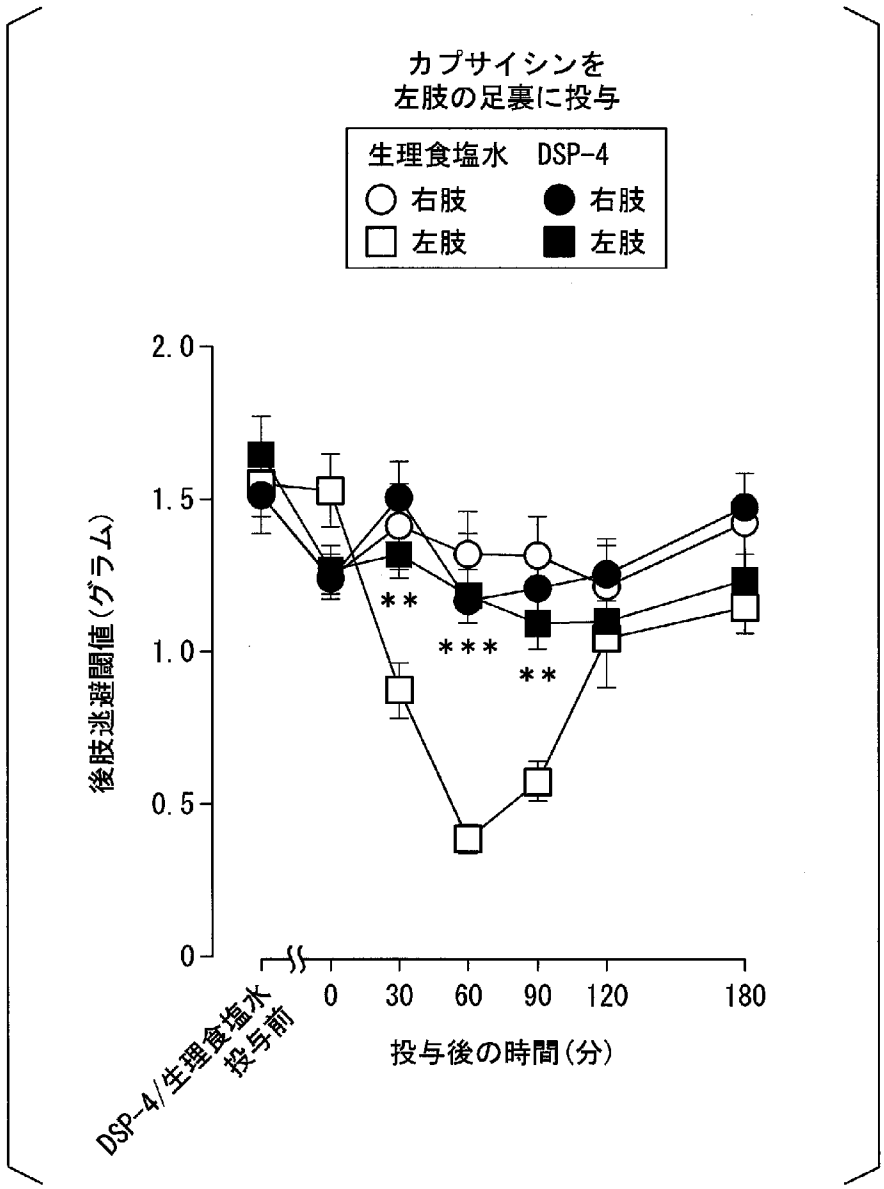
[図5]



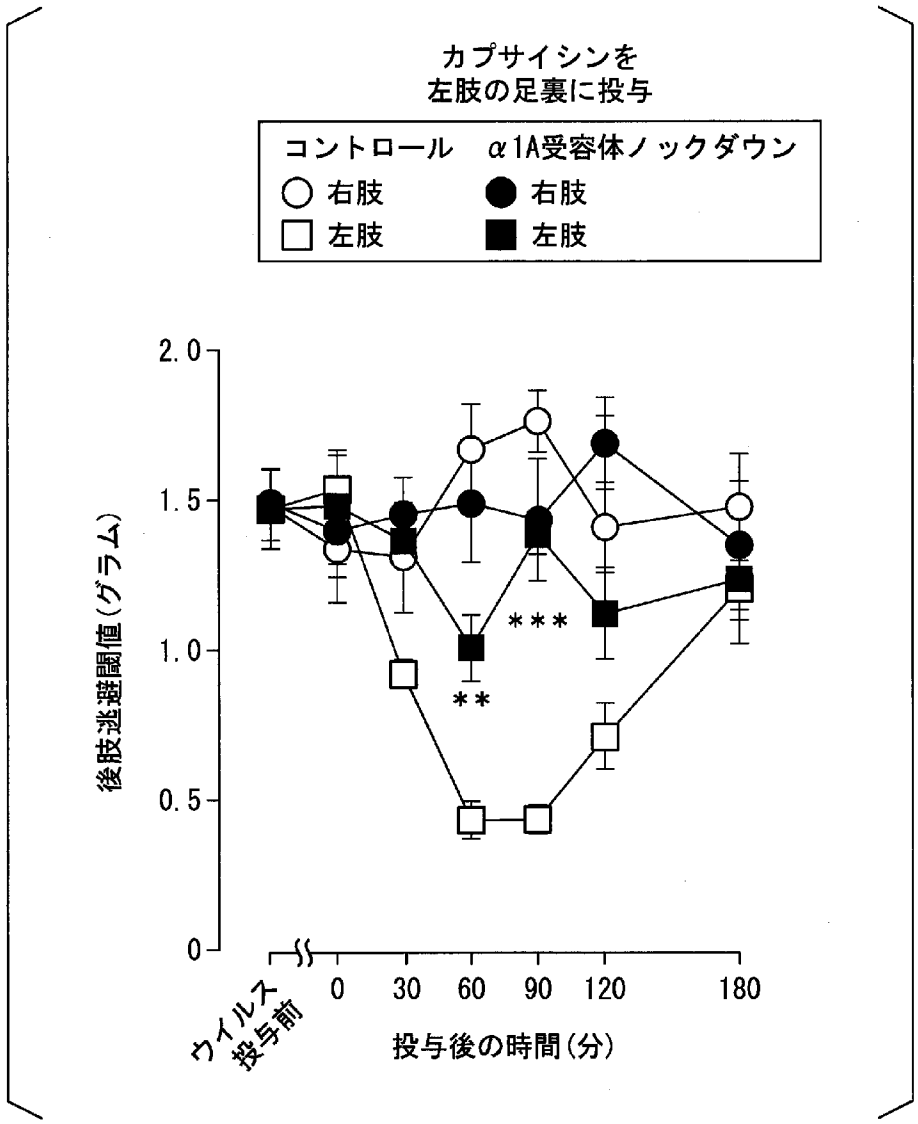
[図6]


投与前
投与後
拮抗剤
ノックダウン
***
**
後肢逃避閾値（グラム）
2.0
1.5
1.0
0.5
0
###
##
###
###
PBS
シロドシン
コントロール
α1A受容体
ノックダウン

[図7]


カプサイシンを
左肢の足裏に投与
生理食塩水 DSP-4
右肢 右肢
左肢 左肢
後肢逃避閾値(グラム)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
**
***
**
0
30
60
90
120
180
DSP-4/生理食塩水
投与前
投与後の時間(分)

[図8]


カプサイシンを
左肢の足裏に投与
コントロール
○ 右肢
□ 左肢
α1A受容体ノックダウン
● 右肢
■ 左肢
後肢逃避閾値(グラム)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
***
**
ウイルス
投与前
0
30
60
90
120
180
投与後の時間(分)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application no.
PCT/JP2018/040319

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl. A61K45/00(2006.01)i, A61P25/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl. A61K45/00, A61P25/04, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2018
Registered utility model specifications of Japan	1996-2018
Published registered utility model applications of Japan	1994-2018

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	MATOS, R. et al., "Bladder pain induced by prolonged peripheral alpha 1A adrenoceptor stimulation involves the enhancement of transient receptor potential vanilloid 1 activity and an increase of urothelial adenosine triphosphate release", Acta Physiologica, 2016, vol. 218, no. 4, pp. 265-275, abstract	1-12
X	KAUSHAL, R. et al., "GABA-A receptor activity in the noradrenergic locus coeruleus drives trigeminal neuropathic pain in the rat; contribution of NAα_1 receptors in the medial prefrontal cortex", Neuroscience, 2016, vol. 334, pp. 148-159, abstract	1-12
A	CAMPOS, M. et al., "Effecct of cyproterone acetate on alphal-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens", Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2003, vol. 36, pp. 1571-1581, page 1574, right column, line 14	5, 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
19 December 2018 (19.12.2018)	05 January 2019 (05.01.2019)

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Telephone no.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application no.
PCT/JP2018/040319

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	WO 2004/022045 A1 (YAMANOUCHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 18 March 2004, claims 1-7, page 2, line 11 from the bottom to bottom line, test example 1 & US 2006/0063842 A1, claims 1-7, paragraphs [0009]-[0010], test example 1 & EP 1547586 A1 & CA 2497464 A & AU 2003261886 A & MX PA05002460 A & KR 10-2005-0057105 A & CN 1694692 A	1-12
X	JP 2002-504523 A (SYNCHRONEURON, LLC) 12 February 2002, case reports 3-5 & WO 1999/043354 A2, case reports 3-5 & US 6159944 A & US 6117877 A & EP 1059940 A2 & AU 2878699 A & CA 2322168 A & NZ 506596 A & CN 1298309 A & CA 2591917 A	1-12
X	JP 2008-505173 A (ALLERGAN, INC.) 21 February 2008, claims 1-60, paragraph [0011], examples 1-3 & WO 2006/011915 A1, claims 1-60, p. 6 lines 17-24, examples 1-3 & US 2005/0058696 A1 & EP 1761261 A1 & CA 2571926 A & BR PI0512903 A & AU 2005267603 A	1-12
A	JP 2004-507527 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 11 March 2004, paragraph [0008] & WO 2002/018348 A2, p. 2 lines 32-33 & US 2002/0045614 A1 & EP 1315714 A2 & AU 9378801 A & CA 2420177 A & BR 113585 A & KR 10-0602929 B1 & MX PA03001777 A & CN 1545510 A	5, 11
A	WO 2000/078716 A1 (TORAY INDUSTRIES, INC.) 28 December 2000, page 2, line 4 & US 6642228 B1, column 1, lines 50-52 & EP 1106605 A1 & AU 5567000 A & CA 2341542 A & CN 1327444 A	5, 11
X	MATOS, R. et al., "The water avoidance stress induces bladder pain due to a prolonged alpha1A adrenoceptor stimulation, Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology", 31 May 2017, vol. 390, no. 8, pp. 839-844, abstract, page 840, right column, line 18	1-5, 7-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application no.
PCT/JP2018/040319

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	GANGKAK, G. et al., "A single oral dose of Silodosin and Diclofenac sodium is effective in reducing pain after ureteric stent removal: a prospective, randomized, double blind placebo-controlled study", SpringerPlus, 2016, vol. 5, no. 23, page 6, abstract	1-5, 7-11
X	MEISNER, J. G. et al., "α_1-adrenergic receptors augment $P2X_3$ receptor-mediated nociceptive responses in the uninjured state", The journal of pain, 2007, vol. 8, no. 7, pp. 556-562, abstract	1-5, 7-11
X	HOLDEN, J.E. et al., "Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by α_1-and α_2-adrenoceptors", Neuroscience, 1999, vol. 91, no. 3, pp. 979-990, abstract	1-5, 7-11
A	ZHANG, Y. et al., "Different roles of α_1-adrenoceptor subtypes in mediating cardiomyocyte protein synthesis in neonatal rats", Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004, vol. 31, pp. 626-633, page 629, right column, lines 15-16	5, 11

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１８／０４０３１９

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00(2006.01)i, A61P25/04(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00, A61P25/04, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０１８年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１８年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１８年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	MATOS, R. et al., Bladder pain induced by prolonged peripheral alpha 1A adrenoceptor stimulation involves the enhancement of transient receptor potential vanilloid 1 activity and an increase of urothelial adenosine triphosphate release, Acta Physiologica, 2016, Vol.218, No.4, pp.265-275, Abstract	1-12

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
１９．１２．２０１８	１５．０１．２０１９

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｕ　３４３６
鳥居　福代

電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４３９

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	KAUSHAL, R. et al., GABA-A receptor activity in the noradrenergic locus coeruleus drives trigeminal neuropathic pain in the rat; contribution of NAα_1 receptors in the medial prefrontal cortex, Neuroscience, 2016, Vol.334, pp.148-159, Abstract	1-12
A	CAMPOS, M. et al., Effecct of cyproterone acetate on alpha1-adrenoceptor subtypes in rat vas deferens, Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 2003, Vol.36, pp.1571-1581, 第1574頁右欄第14行	5,11
X	WO 2004/022045 A1 (山之内製薬株式会社) 2004.03.18, 請求項1-7, 第2頁下から11行目-最終行, 試験例1 & US 2006/0063842 A1 Claims1-7, [0009]-[0010], Test Example1 & EP 1547586 A1 & CA 2497464 A & AU 2003261886 A & MX PA05002460 A & KR 10-2005-0057105 A & CN 1694692 A	1-12
X	JP 2002-504523 A (シンクロニューロン, エルエルシー) 2002.02.12, ケースレポート3～5 & WO 1999/043354 A2 Case Report3～5 & US 6159944 A & US 6117877 A & EP 1059940 A2 & AU 2878699 A & CA 2322168 A & NZ 506596 A & CN 1298309 A & CA 2591917 A	1-12
X	JP 2008-505173 A (アラーガン、インコーポレイテッド) 2008.02.21, 請求項1-60, 段落0011, 実施例1-3 & WO 2006/011915 A1 Claims1-60, p.6 lines17-24, Examples1-3 & US 2005/0058696 A1 & EP 1761261 A1 & CA 2571926 A & BR PI0512903 A & AU 2005267603 A	1-12
A	JP 2004-507527 A (エフ．ホフマンーラ　ロシュ　アーゲー) 2004.03.11, 段落0008 & WO 2002/018348 A2 p.2 lines32-33 & US 2002/0045614 A1 & EP 1315714 A2 & AU 9378801 A & CA 2420177 A & BR 113585 A & KR 10-0602929 B1 & MX PA03001777 A & CN 1545510 A	5,11
A	WO 2000/078716 A1 (東レ株式会社) 2000.12.28, 第2頁第4行 & US 6642228 B1 column1 lines50-52 & EP 1106605 A1 & AU 5567000 A & CA 2341542 A & CN 1327444 A	5,11

C（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	MATOS, R. et al., The water avoidance stress induces bladder pain due to a prolonged alpha1A adrenoceptor stimulation, Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 2017.05.31, Vol.390, No.8, pp.839-844, Abstract, 第840頁右欄第18行	1-5,7-11
X	GANGKAK, G. et al., A single oral dose of Silodosin and Diclofenac sodium is effective in reducing pain after ureteric stent removal: a prospective, randomized, double blind placebo-controlled study, SpringerPlus, 2016, Vol.5, No.23, 6pages, Abstract	1-5,7-11
X	MEISNER, J.G. et al., α_1-adrenergic receptors augment $P2X_3$ receptor-mediated nociceptive responses in the uninjured state, The journal of pain, 2007, Vol.8, No.7, pp.556-562, Abstract	1-5,7-11
X	HOLDEN, J.E. et al., Microinjection of morphine in the A7 catecholamine cell group produces opposing effects on nociception that are mediated by α_1- and α_2- adrenoceptors, Neuroscience, 1999, Vol.91, No.3, pp.979-990, Abstract	1-5,7-11
A	ZHANG, Y. et al., Different roles of α_1-adrenoceptor subtypes in mediating cardiomyocyte protein synthesis in neonatal rats, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2004, Vol.31, pp.626-633, 第629頁右欄第15-16行	5,11