

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04765

研究課題名(和文) 副腎皮質ホルモン作動性因子による神経障害痛の概日リズム制御と鎮痛標的としての評価

研究課題名(英文) The underlying mechanism of glucocorticoid-regulated diurnal exacerbation of neuropathic pain hypersensitivity and its evaluation as a target of anti-allodynic drug

研究代表者

小柳 悟 (Koyanagi, Satoru)

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：60330932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,700,000円

研究成果の概要(和文)：末梢神経の損傷等で引き起こされる神経障害疼痛は、既存の鎮痛薬が奏効しない慢性痛であり、軽い触刺激でも激痛を引き起こす「疼痛過敏」を特徴とする。この疼痛過敏には概日性の変動があることが知られていたが、そのメカニズムは不明であった。本研究では、疼痛過敏の概日リズムが副腎皮質ホルモン作動性因子によって引き起こされることを発見した。本因子はグルコルチコイドの分泌に応答して脊髄アストロサイトからのATPの放出を促進させ、疼痛過敏が特定の時間帯に悪化させることを明らかにした。本研究で明らかにした成果や方法論は概日性の変動を示す他の疾患における新たな治療標的分子の同定にも応用できることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Neuropathic pain hypersensitivity is often caused by peripheral nerve injury, which is refractory to contemporary analgesic treatment. Diurnal exacerbation in pain hypersensitivity are common in the patients with nerve injury, but the underlying mechanisms are enigmatic. In this study, we found that diurnal exacerbation of pain hypersensitivity is mediated by glucocorticoid (GC)-induced enhancement of the extracellular release of ATP in the spinal cord, which stimulates purinergic receptors on microglia in the dorsal horn. GC-regulatory factor (SGK-1) was the key molecule responsible for the GC-enhanced release of ATP from astrocytes. Using high-throughput screening system, we identified candidate as an anti-analgesic drug that has the ability to inhibit SGK-1 activity. Now novel therapeutic approaches are facilitated by development of synthetic ligands targeted to the key molecule that causing diurnal exacerbation of pathological events.

研究分野：薬剤学、時間薬理学

キーワード：副腎皮質ホルモン 概日リズム 神経障害痛

1. 研究開始当初の背景

医薬品は医療を支え生活の質を維持・向上するために不可欠なツールであるが、いまだ有効な治療法のない難治性疾患が数多く存在し、優れた新薬の開発が待ち望まれている。神経障害痛はヘルペスウイルス感染、糖尿病による末梢神経障害、がん細胞の神経への浸潤などによって発症し、全世界における患者数は2,000万人を超えると推定されている。神経障害痛は軽い触刺激でも激痛を引き起こす「アロディニア」を特徴とし、患者のQOLを著しく低下させるが、その疼痛強度は夜間に増悪することが知られている。しかしながら、そのメカニズムは解明されていなかった。

2. 研究の目的

我々は、がん性疼痛における概日変動のメカニズムを解析するなかで、体内時計と神経障害痛をつなぐ因子として副腎皮質ホルモン作動性因子を同定した。本因子は副腎皮質ホルモンの分泌パターンに反応して、脊髄内において概日性的変動を示していたことから、本研究では副腎皮質ホルモン作動性因子による神経障害痛の概日変動メカニズムの解明を通じて、難治性疼痛の治療薬開発を目指して検討を行った。

3. 研究の方法

(1)神経障害性疼痛が概日リズムを示すモデルマウスの作成: 実験に用いたマウスはいずれも明暗周期(明期: 7:00~19:00)、自由摂食・摂水環境下で飼育した。マウス大腿部を切開し坐骨神経を露呈させ、シルク糸で部分結紮後に切開部を包合した。神経結紮後、経日的に結紮側および非結紮側後肢の疼痛閾値を von Fray フィラメントを用いたアップ・ダウン法にて測定した。

また、神経障害痛を発症したマウスから副腎を摘出し、疼痛閾値に及ぼす影響を検討した。副腎摘出の確認は血中コルチコステロン濃度を測定することで行った。

(2)マウス脊髄における遺伝子の発現リズム解析: 麻酔下においてマウスから坐骨神経が投射する部位の脊髄(L3~L5)を摘出し、RNAを抽出後、マイクロアレイ解析を行った。疼痛過敏が悪化する時間帯に発現が上昇するような概日リズムを示すもの。また、そのリズムは副腎を摘出した場合に消失することを指標に因子の絞込を行った。候補に上がった因子につい

ては、リアルタイム RT-PCR 法およびウエスタンブロット法により、mRNA およびタンパク質の概日変動を検討した。

(3)脊髄の免疫組織染色: 坐骨神経を部分結紮したマウスから脊髄の薄切片を作成し、実験(2)で同定した因子の免疫組織染色を行った。標的タンパクの可視化には蛍光プローブを標識した二次抗体を用いた。同時に抗 NeuN 抗体、抗 CD11b 抗体、および抗 GFAP 抗体を用いて同定したタンパクの細胞局在を観察した。

(4)疼痛モデルマウスへの薬物投与: 疼痛を発症したマウスの髄腔内に同定した疼痛原因物質の阻害を投与し、後肢の疼痛閾値を経時的に測定した。

(5)統計解析: 多群間比較には分散分析および Post-hoc テストには Turkey-Kramer 法を用いた。また、対応のある 2 群間の比較には Paired-T テストを用い、有意水準は 5%とした。

4. 研究成果

(1) グルココルチコイドによる疼痛過敏の概日リズム制御: 坐骨神経を部分結紮したマウス後肢の von Frey フィラメント触刺激に対する応答性(疼痛閾値)は、経日的に低下し、神経損傷による疼痛過敏の発症が確認された。また、神経損傷から7日目における疼痛閾値には有意な概日変動が認められ、その変動は神経損傷から21日後も観察された。

マウスから副腎を摘出すると、血中コルチコステロン濃度の概日リズムは消失した。この状態において、坐骨神経を損傷したマウスの行動量に変化は認められなかったが、後肢疼痛閾値の概日リズムは消失した。一方、副腎を摘出した神経損傷マウスに対して、浸透圧ミニポンプを用いて生理的容量(概日変動のピークレベル)のコルチコステロンを持続的に投与したところ、疼痛閾値自体は低下したものの、その値に概日変動は認められなかった。これらの結果から、神経損傷によって誘発される疼痛過敏の概日リズムは副腎皮質ホルモンによって引き起こされることが明らかになった。

(2)グルココルチコイドによる脊髄細胞外への ATP 放出の概日リズム制御: 過去の報告から末梢神経の損傷による神経障害痛の発症には脊髄におけるミクログリア細胞の活性化とその細胞表面におけるプリン受容体の発現上昇が

深く関与していることが示唆されている。しかしながら、坐骨神経を部分結紮したマウス脊髄におけるミクログリアの活性化状態とプリン受容体の発現量には、いずれも有意な概日変動は認められなかった。一方、プリン受容体のアゴニストである細胞外 ATP 濃度には有意な概日リズムが認められ、そのリズムは副腎摘出マウスにおいては消失していた。

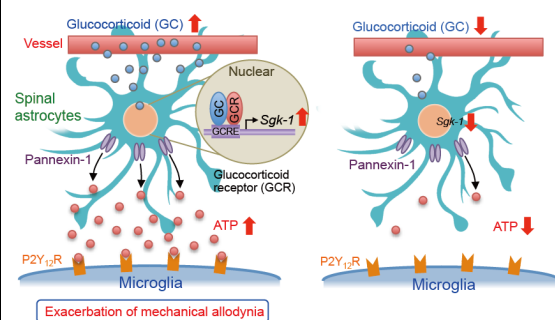
神経を損傷して副腎を摘出したマウスに生理的容量のコルチコステロンを投与すると、疼痛過敏が悪化した。プリン受容体の阻害薬はこのコルチコステロン誘発性の疼痛過敏を有意に抑制した。これらの結果から、神経障害痛を発症したマウスにおいて、グルココルチコイドの分泌が上昇する時間帯には脊髄細胞外への ATP 放出量が上昇し、それらが活性化したミクログリア細胞表面のプリン受容体を刺激することで、疼痛過敏が悪化することが明らかになった。

(3)脊髄内におけるグルココルチコイド作動性因子による疼痛閾値の概日リズム制御: 坐骨神経を部分結紮し、副腎を摘出したマウスの脊髄から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、グルココルチコイドの概日リズム依存的に発現が変動する遺伝子が 25 個抽出された。これらの中で、プロモーター領域におけるグルココルチコイド応答配列がヒトと高い相同性を示す因子として serum- and glucocorticoid regulatory kinase-1(SGK-1)に着目して更に検討を行った。免疫組織染色およびデータベースを用いた解析の結果、SGK-1 は主に脊髄アストロサイトに発現するが、直接には疼痛の発症に関与せず、標的となる因子をリン酸化することで神経障害痛を悪化させることが示唆された。そこで SGK-1 のキナーゼ活性を阻害する薬剤を坐骨神経が損傷したマウスの髄腔内に投与したところ、神経損傷側後肢における疼痛過敏は有意に緩和された。

(4) SGK-1 による脊髄アストロサイトからの ATP 放出における概日リズム制御: グルココルチコイドに反応して脊髄アストロサイトで発現が上昇する SGK-1 が、細胞外への ATP の放出を促進したことから、そのメカニズムの解明を試みた。その結果、SGK-1 の発現上昇によってカルシウムチャンネルのひとつである Orai-1 の細胞膜への局在が安定化し、細胞内へのカルシウムイオンの流入が促進されること。さらに、

細胞内カルシウムイオン濃度の上昇によってパネキシンチャンネルが開き、細胞外への ATP 放出が促進されることが明らかとなった。

以上のことから、神経損傷による疼痛閾値の概日変動には脊髄アストロサイト内における SGK-1 がパネキシンの開口を介して細胞外への ATP の放出を促進し、それらが活性化したミクログリア表面のプリン受容体を過度に刺激して疼痛過敏を悪化させることが明らかになった (下図)。これらの結果は、概日時計による病態の日内変動の制御メカニズムの解明が、新規の治療標的分子の探索において有用であることを示唆している。



(5) SGK-1 阻害作用を有する神経障害痛緩和薬の探索: 上記までの結果で、脊髄内での SGK-1 の発現上昇が神経障害による疼痛過敏を悪化させることが明らかになったことから、既承認薬のライブラリーを用いて本キナーゼの阻害薬の探索を行った。High-through put screening 系に用いることが可能なセルフリーの SGK-1 アッセイ系を構築し、1,280 既承認薬から探索を行った。その結果、11 種類の候補薬がヒットし、その中から神経障害痛モデルマウスに対しても鎮痛効果を発揮する薬物を 3 種類同定した。これら薬物はいずれも既に鎮痛以外の用途で臨床適応されていることから、同定した薬物の適応拡大を目指して現在国内企業との共同研究を進行中である。

体内時計の働きにより、様々な生体機能に概日性的変動が生じる。また、これらのリズムが相互に作用し合うことによって、疾患の症状や発症にも時刻依存的な変動が引き起こされる。本研究で得られた一連の結果は、病態の概日変動の制御メカニズムの解明が、新規の治療標的分子の探索において有用であることを示唆している。今後、同様のアプローチがより有効な医薬品の開発につながることを期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

1. Akamine T, Koyanagi S, Kusunose N, Hashimoto H, Taniguchi M, Matsunaga N, Ohdo S; Dosing time-dependent changes in the analgesic effect of pregabalin on diabetic neuropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 354: 65-72, 2015.
2. Koyanagi S, Kusunose N, Taniguchi M, Akamine T, Kanado Y, Ozono Y, Masuda T, Kohro Y, Matsunaga N, Tsuda M, Salter MW, Inoue K, Ohdo S. Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of neuropathic mechanical allodynia. *Nature Commun.* 7: 13102, 2016.

〔学会発表〕 (計 9 件)

1. 谷口真理恵、小柳 悟、楠瀬直喜、赤嶺孝祐、松永直哉、大戸茂弘. Molecular basis for circadian regulation of the intensity of cancer-derived pain in tumor-bearing mice. 第 9 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2015 年 11 月 (千葉市)
2. 赤嶺孝祐、和田恵里香、楠瀬直喜、橋本華、谷口真理恵、松永直哉、小柳 悟、大戸茂弘. Circadian oscillation in the intestinal expression of Octn1/Slc22a4 underlies the dosing time-dependent changes in the absorption of pregabalin and its analgesic effects on diabetic neuropathy. 第 9 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム. 2015 年 11 月 (千葉市)
3. 赤嶺孝祐、和田恵里香、楠瀬直喜、橋本華、谷口真理恵、松永直哉、小柳 悟、大戸茂弘. Chronopharmacological study of pregabalin for diabetic peripheral neuropathic pain. 第 22 回日本時間生物学会学術大会. 2015 年 11 月 (東京)
4. Satoru Koyanagi. Glucocorticoid regulation of ATP release from spinal astrocytes underlies diurnal exacerbation of pain hypersensitivity after peripheral nerve injury. Sapporo Symposium on Biological Rhythm in 2016. 2018 年 11 月 (札幌市)
5. 楠瀬直喜、小柳 悟、松永直哉、大戸茂弘. 神経障害性疼痛の概日リズム制御機構と治療・創薬研究への応用. 医療薬学フォーラム 2017(シンポジウム). 2017 年 7 月 (鹿児島市)
6. 小柳 悟. 副腎皮質ホルモンによる脊髄細胞外への ATP 放出と慢性痛の概日変動. 第 44 回日本毒性学会学術年会(シンポジウム). 2017 年 7 月 (横浜市)
7. 小柳 悟. 概日リズム研究の創薬・医療への応用. 第 11 回次世代を担う若手医療薬科学シンポジウム(教育講演). 2017 年 10 月 (京都市)
8. Satoru Koyanagi. Chrono-omics analysis for exploring diagnostic and therapeutic target for neuropathic pain. 日本薬物動態学会 第 32 回年会 (シンポジウム). 2017 年 11 月 (東京)
9. 楠瀬直喜、小柳 悟、松永直哉、大戸茂弘. 神経障害性疼痛の概日リズム制御機構を基盤とした病態解明と創薬への応用. 日本薬学会 138 回年会 (シンポジウム) 2018 年 3 月 (金沢市)

〔図書〕 (計 1 件)

1. Koyanagi S, Kusunose N, Matsunaga N, Ohdo S; Diurnal exacerbation of neuropathic pain hypersensitivity. Chapter IV Physiological Function as Integrated Outputs of Circadian Clock. Edited by Ken-ichi Honma, Biological Clock with reference to suprachiasmatic nucleus, 163-175, Hokkaido University Press, 2017.

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.kyushu-u.ac.jp/ja/researches/view/52>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小柳 悟 (KOYANAGI Satoru)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：60330932

(2)連携研究者

津田 誠 (TSUDA Makoto)
九州大学・薬学研究院・教授
研究者番号：40373394

松永 直哉 (MATSUNAGA Naoya)
九州大学・薬学研究院・助教
研究者番号：10432915