

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08679

研究課題名(和文) 脊髄後角抑制系増強による慢性疼痛治療におけるシナプス機構の解明

研究課題名(英文) Synaptic mechanisms of pain relief by increasing inhibitory transmission in the spinal dorsal horn

研究代表者

田辺 光男 (Tanabe, Mitsuo)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：20360026

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛や炎症性疼痛などの慢性疼痛では、脊髄後角における抑制の減少すなわち脱抑制が疼痛シグナルの増幅をもたらす一因となる。従って、抑制を強めて崩れたバランスを取り戻すことは疼痛緩和の重要な戦略である。慢性疼痛モデル動物を用いた実験で、グリシントランスポーター(GlyT)阻害薬やGABAトランスポーター(GAT)阻害薬の脊髄内投与が鎮痛効果を示すことが報告されている。本研究では、成熟マウス脊髄スライス標本を用い、これら阻害薬による内在性抑制性伝達物質の増加が脊髄後角のシナプス伝達に及ぼす影響を解明し、鎮痛効果に結び付く可能性のあるシナプスレベルでの作用メカニズムを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An excessive excitation due to disinhibition in the superficial dorsal horn is considered to contribute to hyperalgesia and allodynia of chronic pain conditions including neuropathic and inflammatory pain. Normalizing excitatory and inhibitory balance in the dorsal horn is a possible strategy to develop a novel therapeutic drug for chronic pain. Pharmacological blockade of spinal glycine and GABA transporters (GlyTs and GATs, respectively) was reported to produce analgesic effects in animal models of chronic pain. In this study, we investigated the effects of GlyT and GAT inhibitors on excitatory and inhibitory synaptic transmission in the dorsal horn in slices prepared from adult mice by using the whole-cell voltage-clamp technique, and tried to explore synaptic mechanisms of pain relief by GlyT and GAT inhibitors.

研究分野：神経薬理学

キーワード：神経障害性疼痛 シナプス伝達 脊髄スライス パッチクランプ グリシントランスポーター GABAトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

脊髄後角は、一次求心性神経が入力するだけでなく、上位中枢からの下行性モノアミン神経や脊髄内の興奮性あるいは抑制性介在ニューロンの影響を受けるため、痛みシグナルの制御に大きく関わる部位である。そのため、脊髄後角における興奮と抑制のバランスは非常に重要であるが、慢性疼痛の病態ではこのバランスが崩れて興奮性が増大 (= 中枢性感作) し、痛覚シグナルの増大につながると考えられる。近年、中枢性感作に関わる要因として、脊髄後角ニューロンの興奮性の増加、神経発芽による神経伝達異常、抑制の減少 (脱抑制) さらにグリア細胞の活性化などが挙げられている。従って、興奮と抑制のバランスを正常化することは痛みを緩和する上で重要であり、このバランスを正常化させる低分子化合物から新たな慢性疼痛治療薬が生まれる可能性が高い。

本研究課題代表者は、脊髄後角の興奮と抑制のバランスを正常化する上で抑制性神経伝達物質グリシンの取り込みを担う**グリシントランスポーター** (glycine transporter; GlyT) に着目し、その 2 つあるサブタイプの 1 つである GlyT1 の阻害薬を神経障害性モデル動物に脊髄内投与することにより鎮痛作用が得られることを世界で初めて報告した (Tanabe et al., *Anesthesiology* 2008;108:929-937)。その後、国内外の他の研究グループから GlyT1 同様に GlyT2 阻害薬も鎮痛作用を示すことが報告されている。なお、GlyT1 は主にアストロサイトに、GlyT2 はグリシン神経終末に存在し、いずれのサブタイプもグリシン神経終末から遊離したグリシンの取り込みを担うが、GlyT2 はグリシンをグリシン神経終末に取り込んで供給することで抑制性伝達を維持する上で重要であると報告されている。また、グリシンと並び GABA も主要な抑制性神経伝達物質であり、3 つの GABA トランスポーター (GABA transporter; GAT) サブタイプの GAT1、GAT2、GAT3 がその取り込みに関わっている。近年、GAT1 あるいは GAT3 の阻害薬が慢性疼痛状態を改善することが他の研究グループから報告されている。

2. 研究の目的

本研究課題代表者は、行動薬理学的研究を実施すると共に、電気生理学的研究によりシナプス伝達レベルでの鎮痛作用機序解明を目指した研究を実施してきた。上述したように、GlyT 阻害薬あるいは GAT 阻害薬は行動薬理学的研究が先行しているが、鎮痛作用をシナプス伝達レベルまで掘り下げた作用機序の解明研究は皆無である。そこで、成熟マウス脊髄スライスを作製して後角ニューロンにおいて誘発・記録するシナプス電流を指標に、GlyT 阻害や GAT 阻害による鎮痛作用のシナプス機構を明らかにしたい。また、得られた電気生理学的知見を行動実験にフィ

ードバックすることで、行動実験とシナプス伝達レベルで相互に互換性を持つ信頼性の高い鎮痛作用メカニズムを提供し、それに基いた創薬へのメッセージを発信する。

3. 研究の方法

(1) 行動実験

神経障害性疼痛モデル動物の作製

マウスは ddY 系雄性 4-5 週齢のものを使用し、pentobarbital 麻酔下に右後肢あるいは左後肢の坐骨神経を部分結紮して作製した (Seltzer モデル)。マウスは手術後約 1 週間後に行動実験に用いた。

疼痛評価

触覚刺激を痛みと感じる機械アロディニアの測定を von Frey 試験で行い、up-down 法により 50% 閾値を算出した。

(2) *In vitro* 電気生理学的実験

脊髄スライス標本

ddY 系雄性 5 - 7 週齢のマウスを urethane および α -chloralose で麻酔し、脊椎骨を剥離して腰仙髄部位を根を付けたまま摘出した。左側 L4 および L5 後根のみを残して根を切除後、脊髄をスライサーに固定し、L4 後根と L5 後根をそれぞれ付けた厚さ 450 μ m のスライスを作製した。後根を付けない場合は 300 μ m のスライスを作製した。スライスは室温で 60 分インキュベーション後、電気生理実験に使用した。

パッチクランプ記録

近赤外微分干渉法によって視認した深部ニューロンから CsCl [研究成果(1)および(2)の実験の場合] あるいは K-gluconate [研究成果(2)の実験の場合] を主成分とした内液を充填したパッチ電極を用いてホールセル記録を行った。細胞を -70 mV に保持し、シナプス電流を記録した。後根を付けたスライスでは、後根先端の一部をガラス管で作製した吸引電極内に吸引し、定電流刺激することによって A-線維性あるいは C-線維性の興奮性シナプス後電流 (EPSCs) を誘発した。また、記録細胞の近傍を電気刺激することで eEPSCs あるいは eIPSCs を記録した。CsCl を主成分とするパッチ電極を用いた場合、EPSCs は GABA_A 受容体阻害薬 bicuculline 及びグリシン受容体阻害薬 strychnine 存在下に、グリシン性 IPSCs は non-NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬 CNQX 及び bicuculline 存在下に、GABA 性 IPSCs は CNQX 及び strychnine 存在下に記録した。微小興奮性シナプス後電流 (mEPSCs) あるいは微小抑制性シナプス後電流 (mIPSCs) は、灌流液にさらに tetrodotoxin (TTX) を加えて記録した。

4. 研究成果

(1) マウス脊髄スライス標本におけるグリシントランスポーター阻害薬のグリシン性シナプス伝達に及ぼす影響について

グリシンは中枢神経系において GABA と

同様に主要な抑制性神経伝達物質である。グリシンの細胞外濃度はグリシントランスポーター(GlyT)によって調節されている。GlyTは2種類のサブタイプ GlyT1、GlyT2 が同定されている。GlyT1 はアストロサイトおよび興奮性神経終末に存在し、グリシン性の抑制性シナプス伝達を終了させる役割を持つ。一方、GlyT2 はグリシン性神経終末に存在し、GlyT1 と同様のグリシン性の抑制性シナプス伝達を終了させる役割に加えて、グリシン性神経終末から放出されたグリシンを再び神経終末に取り込みシナプス小胞にグリシンを供給する役割を持つ。

本報告では、まず最初に、平成 24 年度～26 年度の基盤研究(C)一般の研究課題において一部開始していたグリシン性 eIPSCs と mIPSCs に対する GlyT1 阻害薬 NFPS と GlyT2 阻害薬 ALX-1393 の作用について継続完成させた。その結果、NFPS 及び ALX-1393 は、0.1 Hz の近傍電気刺激で誘発した eIPSCs に対し、その振幅を変化させずに電流衰退過程を延長させた。また、mIPSCs 記録において、NFPS はその振幅や頻度に影響せず、ALX-1393 は頻度を増加させ、両薬物は細胞外グリシン増加に伴う保持電流の変化を起こした。これらは、GlyT 阻害はシナプス直下及びシナプス外のグリシン受容体活性化を増加させて抑制増強を起こすことを示唆する。

次に、GlyT2 のグリシン性シナプス伝達維持における重要性に着目して GlyT1 阻害薬と GlyT2 阻害薬の差別化を行った。すなわち、GlyT2 はグリシン性神経終末へのグリシン供給を担うことでグリシン性神経伝達維持に必須であるため、その長期的阻害を検討した。GlyT 阻害薬を適用する長時間に渡り 0.1 Hz で eIPSCs を誘発しながら安定したホールセル記録を続けることは技術的に困難であるため、一時的に誘発刺激条件を 3 分間 10 Hz に変化させることでグリシン性シナプス伝達を短時間に高頻度で起こさせ、長時間適用時に発生する可能性のあるシナプス活動を短時間で疑似誘発させた。この刺激条件単独や GlyT1 阻害下の条件刺激はその後の 0.1 Hz 刺激の eIPSCs に影響を与えなかった(図

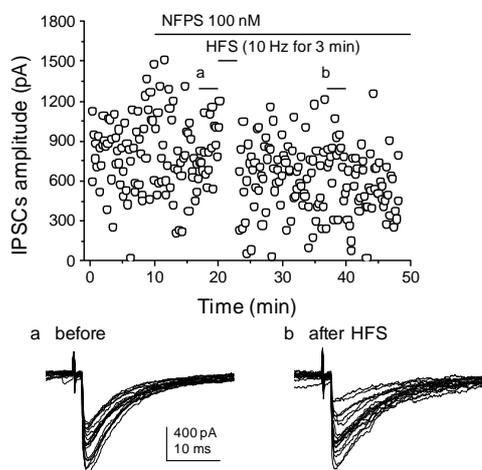


図 1 . GlyT1 阻害下の高頻度刺激の影響

1)。一方、GlyT2 阻害下では高頻度刺激後の eIPSCs は強く抑制された。すなわち、長期的に GlyT2 阻害薬を使用した場合に、グリシン性シナプス伝達が弱まり鎮痛効果にマイ

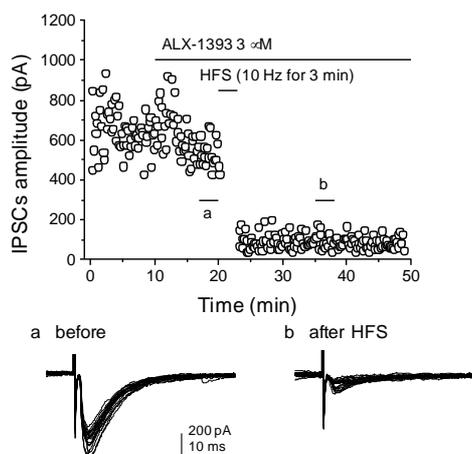


図 2 . GlyT2 阻害下の高頻度刺激の影響

ナスの影響を与える可能性が示唆された(図 2)。

(2) マウス脊髄スライス標本における GABA トランスポーター阻害薬の GABA 性シナプス伝達に及ぼす影響について

GAT1 阻害の影響

灌流適用した GAT1 阻害薬 NNC-711 は mIPSCs の頻度と振幅を減少し、また mEPSCs の頻度を減少した。この mEPSCs 頻度減少作用は、GABA_A 受容体アンタゴニスト bicuculline ではなく、GABA_B 受容体アンタゴニスト CGP55845 により拮抗された。さらに、坐骨神経を部分結紮して作製した神経障害性疼痛モデルマウスにおいて、脊髄髄腔内投与した NNC-711 は用量依存的な抗アロディニア作用を示した。さらに、CGP55845 の髄腔内投与後に NNC-711 を髄腔内投与すると、NNC-711 の抗アロディニア作用はほぼ完全に消失した。従って、GAT1 阻害により増加した GABA は、脊髄後角内で制性伝達を増強するよりも、シナプス前性に GABA_B 受容体を介して興奮性伝達を抑制することにより疼痛緩解作用を示すことが、電気生理学的及び行動薬理的に明らかとなった。

一方、NNC-711 は、近傍電気刺激で誘発した eEPSCs と A-線維誘発 EPSCs の振幅には影響せず、C-線維誘発 EPSCs の振幅に対して有意な抑制作用を示した。また、NNC-711 は近傍電気刺激で誘発した eIPSCs を抑制した。mIPSCs の頻度抑制や eIPSCs の振幅減少が脊髄髄腔内投与後の鎮痛作用に寄与する可能性は低いと考えられる。C-線維誘発 EPSCs の振幅抑制は鎮痛効果に寄与する可能性もあり、GABA_B 受容体の関与について更に検討したい。

GAT3 阻害の影響

GAT3 阻害薬 SNAP-5114 は、mEPSC の振幅及び頻度のいずれに対しても作用を示さなかった。一方、mIPSCs の頻度に対して有意な抑制作用を示した。また、SNAP-5114 は eEPSCs の振幅に対して抑制傾向を、A-線維誘発 EPSCs と C-線維誘発 EPSCs の振幅に対して有意な抑制作用を示した。この抑制作用は A-線維誘発よりも C-線維誘発に対する方が強かった。eIPSCs は影響を受けなかった。さらに、坐骨神経を部分結紮して作製する神経障害性疼痛モデルマウスの機械アロディニアに対し、脊髄髄腔内に投与した SNAP-5114 は抑制作用を示した。その作用発現は緩徐で投与後 90 分にかけて増大を続けた。脊髄髄腔内投与した NNC-711 の抗アロディニア作用が投与後 15 分から 30 分には最大に達したのとは明らかに異なった。また、鎮痛試験時に SNAP-5114 投与後のマウスの動きが悪くなることが確認されており、改めて行動量測定試験を実施予定である。A-線維誘発 EPSCs と C-線維誘発 EPSCs に対する抑制作用は鎮痛に寄与する可能性が高く、関与する GABA 受容体を明らかにする予定であるが、個体レベルでは行動量低下が鎮痛作用用量で発現して区別が困難である可能性が考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

尾山実砂, 倉岡聖哉, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, Electrophysiological evidence of increased glycine receptor-mediated phasic and tonic inhibition by blockade of glycine transporters in spinal superficial dorsal horn neurons of adult mice, J Pharmacol Sci, 査読有, vol.133, No.3, 2017, 162-167

[学会発表](計 9 件)

尾山実砂, 田辺光男, 脊髄後角の内在性 glycine 増加による鎮痛作用のシナプス機序、第 133 回日本薬理学会関東部会、2015 年 10 月 10 日(柏市)

田辺光男, Synaptic mechanisms of pain relief by increasing inhibitory transmission in the spinal cord、日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 28 日(横浜市)

尾山実砂, 沼崎怜奈, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, ランスポーター阻害を介した内在性抑制性神経伝達増強が成熟マウス脊髄後角シナプス伝達に与える影響、生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 25 日(仙台市)

田辺光男, グリシンや GABA の取り込み阻害が脊髄後角シナプス伝達に及ぼす影響、生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 25 日(仙台市)

尾山実砂, 岩井孝志, 渡辺俊, 田辺光男,

GABA トランスポーター阻害による鎮痛作用は脊髄の興奮性神経伝達の抑制を介する可能性がある、第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 16 日(長崎市)

尾山実砂, 沼崎怜奈, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, 内在性 GABA 増強による鎮痛作用のシナプスメカニズム、第 39 回日本疼痛学会、2017 年 6 月 16 日(神戸市)

尾山実砂, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, GABA トランスポーター1 阻害薬は GABA_B 受容体を介した脊髄興奮性シナプス伝達抑制により抗アロディニア作用を示す、第 40 回日本神経科学大会、2017 年 7 月 20 日(千葉市)

尾山実砂, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, GABA トランスポーター阻害による内在性 GABA 増強が成熟マウス脊髄後角シナプス伝達に与える影響、第 137 回日本薬理学会関東部会、2017 年 10 月 28 日(東京)

尾山実砂, 渡辺俊, 岩井孝志, 田辺光男, GAT 阻害薬は興奮性神経伝達減弱を介して鎮痛作用を示す、日本薬学会第 138 年会、2018 年 3 月 26 日(金沢市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/pharmacology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田辺 光男 (TANABE MITSUO)

北里大学・薬学部・教授

研究者番号：20360026

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし