

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09077

研究課題名(和文) Riluzoleの脊髄損傷治療薬としての作用機序の電気生理学的解明

研究課題名(英文) Analysis of synaptic action of riluzole on inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa neurons using whole-cell patch clamp recordings

研究代表者

筒井 俊二 (Tsutsui, Shunji)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70423960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：パッチクランプ法による電気生理学的解析により、リルゾールはラットの脊髄膠様質細胞に対して、細胞の過分極を示す外向き電流を発生させ、シナプス伝達抑制作用を有することが示された。受容体拮抗薬の同時灌流試験により、この外向き電流にはGABAA受容体が関与していることが示された。神経障害性疼痛モデルラットを用いた行動学実験で、リルゾールは投与後短時間、神経障害性疼痛を抑制する作用を有することが示された。これらの結果は、リルゾールが脊髄レベルでGABAA受容体を介して抑制性シナプス伝達を亢進し、疼痛に対して抑制的に作用することを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛は、持続的な自発痛や痛覚過敏、アロディニアなどを生じる過酷な痛みである。現在に至るまで種々の作用機序の鎮痛薬が開発されているが、既存の治療薬では十分な鎮痛効果が得られていない患者が未だ多く存在し、新たな治療薬の開発が待ち望まれている。本研究では、すでに他疾患に対して臨床使用されているリルゾールという薬剤が、ラットの神経障害性疼痛を抑制することを明らかにした。電気生理学的な実験により、本薬は痛みの伝達に深く関与している脊髄後角の神経細胞に作用し、痛みの伝導に対して抑制的に作用することが明らかとなった。神経障害性疼痛の治療薬として転化応用できる可能性を示唆する研究結果である。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the synaptic action of riluzole on inhibitory synaptic transmission in substantia gelatinosa (SG) neurons using whole-cell patch clamp recordings. The results showed that riluzole induced an outward current in rat SG neurons. Furthermore, we found that the outward current was suppressed by simultaneous bicuculline and strychnine application, but not by strychnine alone. We also investigated the ameliorating effect of riluzole on mechanical allodynia using the von Frey test in a rat model of neuropathic pain. We found that single-dose intraperitoneal riluzole administration effectively attenuated mechanical allodynia. Altogether, these results suggest that riluzole enhances inhibitory synaptic transmission by potentiating GABAergic synaptic transmission in the rat spinal dorsal horn, and has an inhibitory effect on neuropathic pain.

研究分野：神経生理学

キーワード：Riluzole patch-clamp

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

脊髄損傷は運動麻痺や感覚障害などの後遺障害をもたらす、ADL や QOL を大きく損なう原因となっているが、未だ骨性損傷に対する除圧・固定術など外科的手術と副腎皮質ステロイド投与が主たる治療法でその他の有効な治療法が確立されていない。近年、筋萎縮性側索硬化症の治療薬リルゾールが、脊髄損傷における細胞死を抑制して運動機能を回復させるとともに脊髄損傷後疼痛を改善する神経保護作用を有するなどの報告が上がっている。これらの報告はリルゾールが脊髄レベルに作用して、鎮痛作用をもたらす可能性を示唆している。リルゾールの主たる薬理作用はグルタミン酸を介した興奮性シナプス伝達の抑制作用であるとされているが、種々の受容体に作用することが明らかにされてきた。例えば、海馬レベルでは興奮性シナプス伝達のみならず、GABA_A 受容体を介した抑制性シナプス伝達に作用することも報告されている。痛覚の伝導路であり、GABA_A 受容体が発現している脊髄後角においても何らかの抑制性の作用を有する可能性は十分に示唆される。しかしながら、脊髄内において、リルゾールが抑制性シナプス伝達に対する作用を有するかは明らかにされていない。

2. 研究の目的

ラット脊髄スライス標本にパッチクランプ法を用いて脊髄後角細胞における抑制性シナプス伝達へのリルゾールの作用を電気生理学的に解析すること、及び神経障害性疼痛モデルを用いて神経障害性疼痛に対する抑制効果を行動学的に評価すること。

3. 研究の方法

本研究は和歌山県立医科大学動物実験委員会の審査を受けて承認された。

(1)パッチクランプ法による電気生理学的解析

・脊髄標本の作製

電気生理学実験のため Sprague-Dawley 系雄性ラット (5~7 週齢) を使用した。ウレタン (1.2 ~ 1.5 g/kg) の腹腔内注射で麻醉し、第 10 胸椎から第 4 腰椎高位の椎弓を切除し、腰仙レベルの脊髄を摘出した。脊髄を摘出後、ラットは失血により速やかに絶命させた。摘出した脊髄は酸素負荷し、1~3 に冷却したクレブス液 (117 mM NaCl, 3.6 mM KCl, 1.2 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.2 mM MgCl₂, 25 mM NaHCO₃, 11 mM glucose; pH 7.4) に浸漬した後、硬膜、くも膜、軟膜を剥離して、マイクロスライサーを用いて腰膨大部から 650 μm の厚さの脊髄横断スライスを作成した。

・In vitro ホールセルパッチクランプ法

脊髄スライスのパッチクランプ装置の記録チャンバーに静置し、O₂ 95%、CO₂ 5% に負荷し、36 ± 1 に加温したクレブス液を 5 ml/分 で持続的に灌流した。実体顕微鏡視認下に脊髄後角第 1 層に微小ガラス電極を刺入し、ブライントホールセル・パッチクランプ法により脊髄膠様質ニューロンから細胞膜電流の記録を行った。0 mV の膜電位固定下で記録を行い、細胞膜電流、および自発性抑制性シナプス後電流 (spontaneous inhibitory postsynaptic current: sIPSC) を観察した。ガラス電極内液は、110 mM Cs₂SO₄, 5 mM tetraethylammonium, 0.5 mM CaCl₂, 2 mM, MgCl₂, 5 mM EGTA, 5 mM ATP-Mg, 5 mM HEPES-KOH; pH 7.2 に設定した。

・試薬の適用

本研究では、リルゾール (Wako, Osaka, Japan)、テトロドトキシン (Wako, Osaka, Japan)、ピククリン (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA)、ストリキニーネ (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA) を使用した。リルゾール、ピククリン、ストリキニーネは、Dimethyl sulfoxide に、テトロドトキシンは distilled water にそれぞれ目的濃度の 1000 倍になるよう溶解した後、適用する直前にクレブス液により希釈して目的濃度に調整した。試薬の適用は、脊髄スライスを灌流するクレブス液を、試薬を含むクレブス液に切り替えることで行い、灌流速度、液温度を変化させることなく施行した。

(2)行動学実験

・神経障害性疼痛モデルラットの作成

Sprague-Dawley 系雄性ラット (5-6 週齢) を用いた。5% イソフルラン吸入麻醉下にて右後肢に Spered nerve injury (坐骨神経の 3 分枝のうち腓腹神経を除く脛骨神経と総腓骨神経を結紮切断し、腓腹神経領域にアロディニアを誘発する) モデルを作成した。術後 7 日目に、10g の von Frey フィラメントを用いた足底刺激に対する逃避反応を観察し、機械的アロディニアが完成したことを確認した。

・試薬の適用

モデルラットを、リルゾール投与群とコントロール群に分けた。リルゾール投与群は、5%

dimethyl sulfoxide に溶解したリルゾール 4 mg/kg を腹腔内投与した。コントロール群は、リルゾールを含まない溶媒 (5% dimethyl sulfoxide) のみを腹腔内投与した。試薬の投与は術後 7 日目に単回施行した。

・行動学的評価

10g のフィラメントを用いた von Frey 試験を施行した。試験するラットを金属ワイヤーメッシュの床面を有する 18×25×18cm の専用のケージに入れ、手術側の右後肢足底をフィラメントで 2 秒間刺激し、床面から足底を浮かす行動がみられた場合に逃避反応陽性と判定した。刺激は 10 回行い、機械刺激に対する逃避反応の出現頻度を算出した。試験はブラインド化した評価者により施行された。試験は薬剤投与前、投与後 1 時間、6 時間、12 時間、24 時間に施行した。

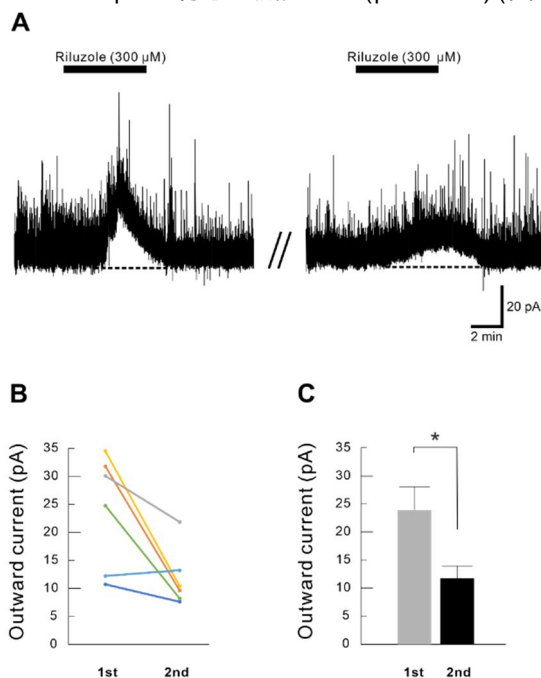
統計学的解析は、電気生理実験においてはリルゾール適用前後での膜電流の変化、sIPSC の頻度、振幅の変化を比較するために、Student's t-test を施行した。行動学実験の解析には、二元配置分散分析と、事後検定として Holm Sidak の検定を施行した。解析には JMP Pro 14 を使用し、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

4. 研究成果

(1) パッチクランプ実験

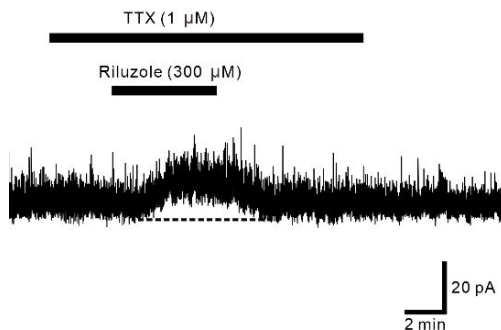
・膜電流への作用

記録はすべて、ニューロンの静止膜電位が -50 mV 以下であることを確認した後に施行し、1 スライス 1 ニューロンとした。300 μM のリルゾールを 5 分間灌流適用したところ、記録した 13 細胞中、約 60% にあたる 8 細胞で 5 pA 以上の外向き電流が観察された (図 1 A)。この外向き電流の振幅の平均値は 20.3 ± 3.9 pA ($n=8$) であった。この外向き電流は 100 μM のリルゾールの適用でも観察されたが、300 μM 時と比較して振幅の平均値が 10.0 ± 7.4 pA ($n=3$) と小さかった。300 μM のリルゾール適用による外向き電流は、25 分の間隔を空けた繰り返し投与でも出現した (図 1 B)。繰り返し投与により、外向き電流の振幅の平均値は、初回 24.0 ± 4.2 pA ($n=6$) から 2 回目 11.8 ± 2.2 pA に有意に減少した ($p < 0.05$) (図 1 C)。



【図 1】 A) リルゾール単回投与による外向き電流。同一ニューロンで反復適応すると反応が減弱することが分かる。B) 反復適応における個々のニューロンの外向き電流の変化。C) 反復適応における外向き電流の平均値。

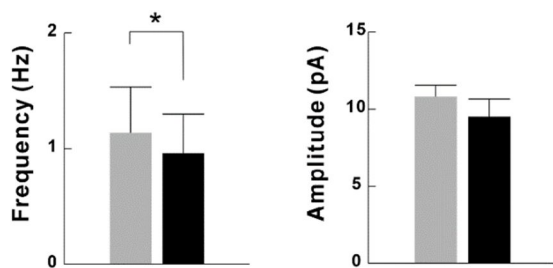
この外向き電流は Na^+ チャンネルブロッカーであるテトロドトキシン($1 \mu\text{M}$)同時適用下でも観察され、テトロドトキシン併用時の振幅の平均値は $17.7 \pm 2.8 \text{ pA}$ ($n=4$)であり、リルゾール単独適用時と比較して差はみられなかった(図2)。



【図2】TTX存在下でリルゾールによって誘発される外向き電流。TTXによって抑制は受けなかった。

・sIPSCへの作用

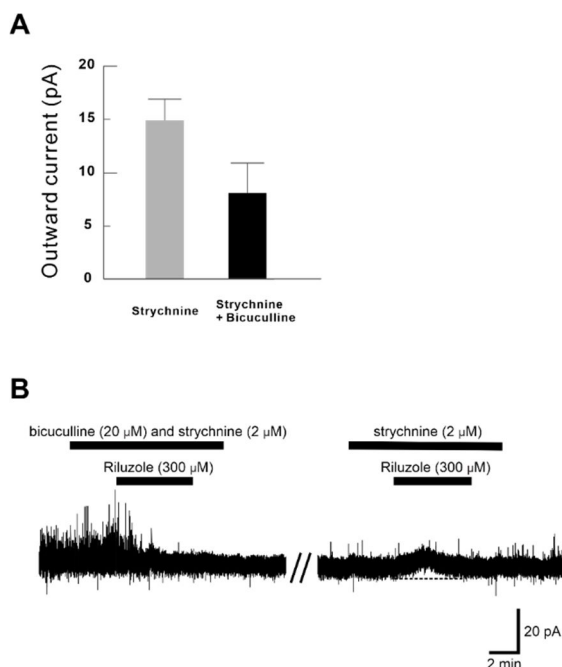
リルゾール適用によりシナプス前終末からの神経伝達物質の放出確立を示すといわれるsIPSCの頻度は、適用前 $1.14 \pm 0.40 \text{ Hz}$ から適用後 $0.96 \pm 0.34 \text{ Hz}$ に減少し、統計学的な有意差を認められた($p < 0.05$)。一方、シナプス後細胞の感受性を示すといわれるsIPSCの振幅の程度は、適用前 $10.8 \pm 0.8 \text{ pA}$ 、適用後 $9.5 \pm 1.1 \text{ pA}$ であり、変化を認めなかった(図3)。



【図3】リルゾール単独投与によるsIPSCへの作用。適応後頻度は統計学的に有意に抑制を受けたが振幅は影響されなかった。

・GABA_A受容体への作用

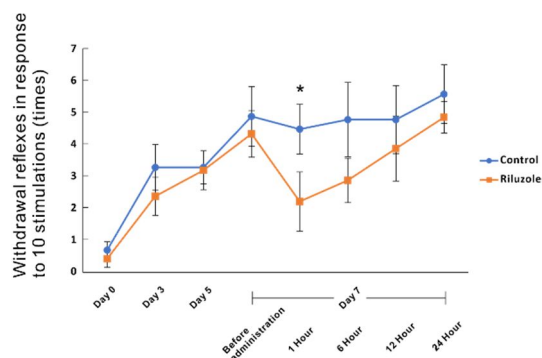
リルゾール適用による外向き電流は、グリシン受容体のアンタゴニストであるストリキニーネ($2 \mu\text{M}$)同時適用下では5細胞中4細胞($14.9 \pm 2.0 \text{ pA}$)で出現したが、GABA_A受容体のアンタゴニストであるピククリン($20 \mu\text{M}$)同時適用下では6細胞中2細胞($8.0 \pm 2.8 \text{ pA}$)でのみしか出現しなかった(図4A)。また同一細胞においてリルゾールと同時にストリキニーネとピククリンを灌流適用したところ外向き電流はブロックされたが、ストリキニーネのみの同時適用では外向き電流はブロックされなかった(図4B)。



【図 4】A)ピククリンとストリキニーネの存在下でリルゾールによって誘発される外向き電流の平均値。B)同一ニューロンでピククリンとストリキニーネの存在下でリルゾールによって抑制された外向き電流がストリキニーネ単独では抑制されなかった。

(2)行動学実験

投与後 1 時間において、リルゾール投与群とコントロール群の逃避反応の出現頻度はそれぞれ 2.0 ± 0.9 回、 4.5 ± 0.8 回であり、リルゾール投与群で有意に少なかった ($p < 0.05$)。この作用は短時間に限り、投与後 6 時間以降では両群間に差を認めなかった (図 5)。



【図 5】神経障害性モデルラットの機械的アロディニアに対するリルゾールの効果。投与後 1 時間でのみ、コントロール群に対して疼痛抑制効果を認めた。

(考察・結論)

本研究結果から、リルゾールはラット脊髄膠様質細胞に対して、細胞の過分極を示す外向き電流を発生させることが判明し、シナプス伝達抑制作用を有することが示された。受容体拮抗薬の同時灌流試験により、この外向き電流には $GABA_A$ 受容体が関与していることが示された。また行動学実験では神経障害性疼痛に対する抑制作用を有することが示された。これらの結果は、リルゾールが脊髄レベルで $GABA_A$ 受容体を介して抑制性シナプス伝達を亢進し、疼痛に対して抑制的に作用することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ryo Taiji, Manabu Yamanaka, Wataru Taniguchi, Naoko Nishio, Shunji Tsutsui, Terumasa Nakatsuka, Hiroshi Yamada	4. 巻 28
2. 論文標題 Anti-allodynic and promotive effect on inhibitory synaptic transmission of riluzole in rat spinal dorsal horn	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemistry and Biophysics Reports	6. 最初と最後の頁 101130
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrep.2021.101130	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 太地良, 西尾尚子, 谷口亘, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏
2. 発表標題 Riluzoleのラット脊髄後角細胞における抑制性シナプス伝達への作用
3. 学会等名 第13回日本運動器疼痛学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 太地良, 西尾尚子, 谷口亘, 山中学, 曾根勝真弓, 筒井俊二, 中塚映政, 山田宏
2. 発表標題 脊髄後角細胞におけるRiluzoleのシナプス伝達抑制作用
3. 学会等名 第41回日本疼痛学会,
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	谷口 亘 (Taniguchi Wataru) (20453194)	和歌山県立医科大学・医学部・客員研究員 (24701)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山 中 学 (Yamanaa Manabu) (30597084)	和歌山県立医科大学・医学部・助教 (24701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関