

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592316

研究課題名(和文) 新しい神経障害性疼痛治療薬としてのカリウムチャンネル開口薬の行動薬理学的研究

研究課題名(英文) Behavioral study on potassium channel openers as a novel remedy for neuropathic pain

研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：20331001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：雄SDラットの坐骨神経を結紮する神経障害性疼痛モデルを作製し、3種類のグループに属するカリウム(K)チャンネル開口薬を脊髄と脳内に投与し神経障害性疼痛の抑制効果を検討した。その結果、カルシウム活性化Kチャンネル(Kca)開口薬が脊髄及び脳内で機械的痛覚過敏と冷的痛覚過敏を抑制した。一方、電位依存性KチャンネルとTwo-pore-domain Kチャンネルの開口薬は神経障害性疼痛の痛覚過敏を抑制しなかった。本研究からKcaチャンネル開口薬には脊髄及び脳内で神経障害性疼痛の抑制作用を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The analgesic effects of three groups of potassium (K) channel openers were examined using a rat neuropathic pain model. Several K channel openers were administered intrathecally or intracerebroventricularly to examine the central effects on mechanical, thermal, and cold hyperalgesia induced by chronic constriction injury to the sciatic nerve. Spinally- and supraspinally-applied calcium-activated potassium channel (Kca) openers attenuated mechanical and cold hyperalgesia. On the other hand, the openers of voltage-dependent K channel and two-pore-domain K channel had no effect on the hyperalgesia displayed in the rats. The Kca channel openers may exert antihyperalgesic effects both in the spinal cord and the brain.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学

キーワード：神経障害性疼痛 鎮痛薬 行動薬理学

1. 研究開始当初の背景

近年、治療が難しく慢性疼痛の原因となる神経障害性疼痛の病態解明が精力的に行われている。病態の複雑性が次第に明らかになる一方で、その治療薬は効果が限定的なうえ副作用が強いいため十分な用量を用いることができないのが現状である。従ってこれまでと異なる作用機序を持ち、耐性出現・鎮静作用・運動機能抑制などの副作用の少ない全く新しい治療薬の開発が強く求められている。このため、侵害受容伝達を選択的に抑制する特性をもつ薬物の開発が必要である。

2. 研究の目的

カリウム(K)チャネルは神経細胞や心筋などの興奮性細胞だけでなく腎、膵、肝細胞など非興奮性細胞にも分布し静止膜電位や活動電位に関与している。興奮性細胞ではKチャネルの活性化によりKイオンが細胞外に流出し細胞膜が過分極する。電位依存性カルシウムチャネルの活性が抑制されるため活動電位の発生頻度が減少し神経細胞の興奮は抑制される。その結果、侵害受容伝達では一次ニューロンからのグルタミン酸放出抑制と二次ニューロンのシナプス後抑制により抗侵害作用が発現すると考えられる。Kチャネルはサブユニットの種類が非常に豊富で中枢神経内分布が特異的なことから、副作用が少なく侵害受容伝達を選択的に抑制する治療薬の有望なターゲットとして理想的な条件を備えている。Kチャネルは構造的に内向き整流性Kチャネル(Kir)、Two-pore-domain Kチャネル(K2P)、電位依存性Kチャネル(Kv)、カルシウム活性化Kチャネル(Kca)の4つのグループに分類される。これまでに侵害受容伝達におけるKチャネルの生理的役割が示唆されている。Kirに属するG蛋白活性化Kチャネル(GIRK)がオピオイド、GABAB、 $\alpha 2$ アドレナリン、ヒスタミン、カンナビノイド受容体などの活性化により開口し、侵害受容ニューロンの興奮を抑制させることが分かっている。Kcaは神経細胞で脱分極により細胞内に流入したCaにより活性化し、Kを細胞外に流出させ脱分極を終了させる。神経細胞の後過分極に関与しておりその活性の調節は活動電位の発生頻度に影響を与える。特にSKチャネルとIKチャネルは脳内で記憶や情動に関与している他、脊髄と後根神経節の侵害受容ニューロンに発現していることが報告されており治療薬のターゲットとして期待される。Kvでは神経障害性疼痛の病態が進展する過程で侵害受容ニューロンのKv4.3サブタイプにdownregulationが起こることが最近報告され痛覚過敏の原因になっていると考えられる。K2PについてはTREK-1を揮発性麻酔薬のハロタンやイソフルランが活性化することが明らかになりTREK-1が麻酔薬の新たな標的蛋白質として注目されている。K2P活性は静止膜電位に強く影響するため神経細胞の

興奮性の調節に非常に大きな役割を持っている。TREK-1とTRAAKノックアウトマウスは温度刺激に対して痛覚過敏を示すことが報告されておりK2P活性が侵害受容伝達の調節に関与していることが示唆されている。このため治療的意義を考えると、その開口薬を投与することにより抗侵害受容作用が発現するのかを正常動物だけでなく神経障害性疼痛モデルでも調べるのが重要である。さらにK2P活性は温度、皮膚の伸張、組織酸素分圧により生理的調節を受けており寒冷刺激や気圧変化で増悪する神経障害性疼痛の臨床像と一致する。本研究は各種Kチャネル開口薬の鎮痛作用と運動機能抑制作用を腹腔内、髄腔内、脳室内に投与して調べ標的部位と作用機序を解析する。鎮痛薬のターゲットとなるKチャネルサブタイプを同定し、現存するKチャネル開口薬の鎮痛薬としての可能性と将来の新薬開発を見据え、薬物が備えるべき化学構造や薬物動態を理解するための研究を行う。

3. 研究の方法

Two-pore-domain Kチャネル(K2P)、電位依存性Kチャネル(Kv)、カルシウム活性化Kチャネル(Kca)の各種開口薬が急性疼痛および神経障害性疼痛モデルで腹腔内・髄腔内・脳室内投与により鎮痛作用が発現するか行動薬理的に調べた。ラットの髄腔内・脳室内に薬物を投与するためクモ膜下カテーテル及び側脳室カニューレを留置した。

(1)K2P: BL1249

(2)Kv: NS1643, DIDS, L-364373

(3)Kca

大コンダクタンスチャネル(BK): NS1619, pimelic acid, BMS191011

中コンダクタンスチャネル(1K,SK4): EB10, chlorzoxazone, zoxazolamine

小コンダクタンスチャネル(SK1-3): CyPPA, SKA31, NS309

各薬物は1, 10, 50または100mg/ml DMSO溶液を作製した。髄腔内または脳室内に10 μ l投与し以下の実験を行った。

(1) 急性痛に対する作用

Tail flick test(脊髄反射への影響)

Hot plate test(上位中枢への影響)

Paw pressure test

(2) 神経障害性疼痛に対する作用

坐骨神経絞扼モデル: 左側の坐骨神経を4.0-絹糸を用いて1mm間隔で4箇所緩く結紮する。

Plantar test(熱的痛覚過敏への作用)

Cold plate test(冷的痛覚過敏への作用)

Electronic von Frey test(機械的痛覚過敏への作用)

Rotarod test(運動機能への作用)

(3) 投与経路

髄腔内投与: 大槽から尾側に向かってポリエチレンカテーテル(PE-10)を8.5 cm挿入する。

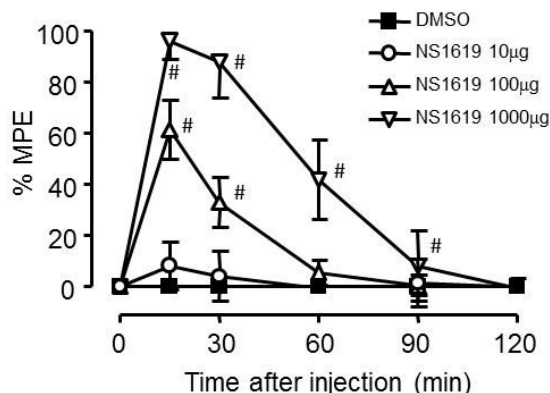
脳室内投与: 右側脳室に21Gステンレスのガイドカニューレを頭頂骨より4.0 mm挿入しネジと歯科用のセメントで頭部に固定する。

4. 研究成果

(1) 急性痛・炎症性疼痛に対する K チャネル開口薬の脊髄作用(髄腔内投与)

Tail flick test

BL1249、NS1619、SKA31 は10mg/ml と100mg/ml で用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。



Hot plate test

BL1249とNS1619は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。

Paw pressure test

全ての薬物は100mg/mlまで作用が見られなかった。これは刺激強度が強すぎるため機械的侵害刺激に対して全ての薬物に作用がないことを示唆するものではないと考えている。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。

BL1249とNS1619のみ急性熱刺激に対して脊髄反射および上位中枢が関与する逃避行動を抑制した。これらの薬物は脊髄で急性熱刺激に対して鎮痛作用を示した。一方、DIDSとCyPPAが痛覚閾値を減少させる機序は現時点で不明である。

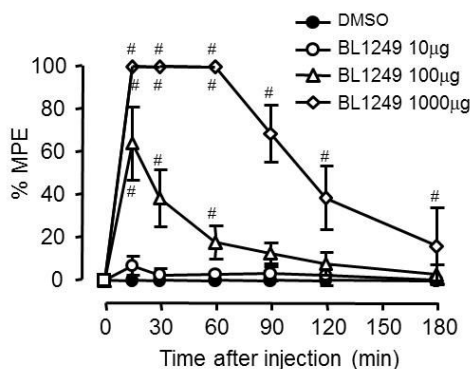
(2) 急性痛・炎症性疼痛に対する K チャネル開口薬の脳作用(脳室内投与)

Tail flick test

BL1249とNS1619は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。

Hot plate test

BL1249とNS1619は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。



Paw pressure test

全ての薬物は100mg/mlまで作用が見られなかった。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。

BL1249とNS1619のみ急性熱刺激に対して脊髄反射および上位中枢が関与する逃避行動を抑制した。これらの薬物は脳内で急性熱刺激に対して鎮痛作用を示した。一方、DIDSとCyPPAが痛覚閾値を減少させる機序は現時点で不明である。

(4) 神経障害性疼痛に対する K チャネル開口薬の脊髄作用(髄腔内投与)

Plantar test

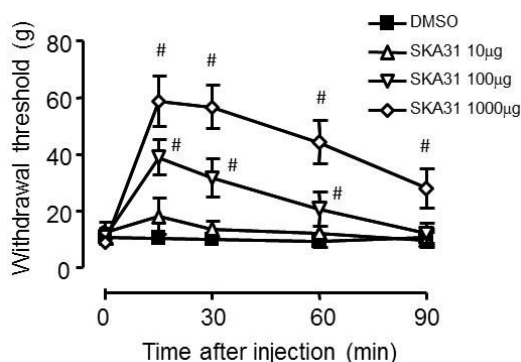
全ての薬物は100mg/mlまで反応潜時に影響を与えなかった。

Cold plate test

BL1249、NS1619、SKA31は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。

Electronic von Frey test

BL1249、NS1619、SKA31は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。



髄腔内投与の結果から一部の薬物は用量依存的に冷痛的痛覚過敏と機械的痛覚過敏に対して鎮痛作用を示した。一方、本研究の投与量では全ての薬物は熱痛的痛覚過敏を抑制し

なかった。これらは熱的痛覚過敏に対する作用が見られないものの神経障害性疼痛の症状で臨床上重要な機械的痛覚過敏と冷的痛覚過敏をKチャンネル開口薬が脊髄で抑制することを示唆している。

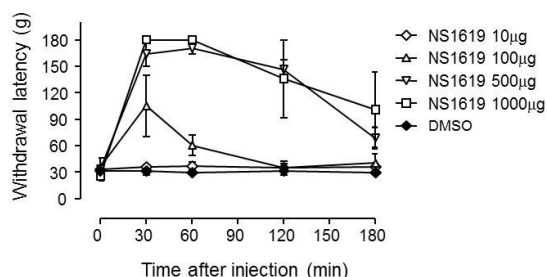
(5) 神経障害性疼痛に対するKチャンネル開口薬の脊髄作用(脳室内投与)

Plantar test

全ての薬物は100mg/mlまで反応潜時に影響を与えなかった。

Cold plate test

BL1249、NS1619、SKA31は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。



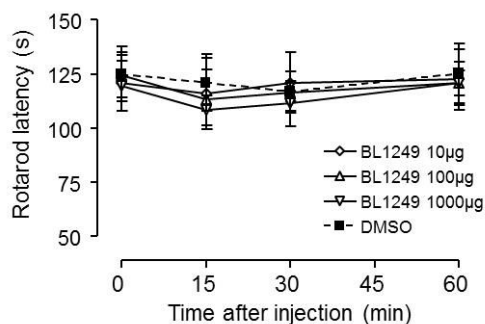
Electronic von Frey test

BL1249、NS1619、SKA31は10mg/mlと100mg/mlで用量依存的に反応潜時を延長した。一方、DIDSとCyPPAは全ての用量で反応潜時を短縮した。その他の薬物は作用を認めなかった。脳室内投与の結果から一部の薬物は用量依存的に冷的痛覚過敏と機械的痛覚過敏に対して鎮痛作用を示した。一方、本研究の投与量では全ての薬物は熱的痛覚過敏を抑制しなかった。これらは熱的痛覚過敏に対する作用が見られないものの神経障害性疼痛の症状で臨床上重要な機械的痛覚過敏と冷的痛覚過敏をKチャンネル開口薬が脳内で抑制することを示唆している。

(5) 運動機能への影響(髄腔内投与)

Rotarod test

神経障害性疼痛モデルラットでBL1249、NS1619、SKA31は100mg/mlまで反応潜時に影響を与えなかった。このことからBL1249、NS1619、SKA31は髄腔内投与で鎮痛作用が現れる用量で運動機能に影響しないことが示唆された。



本研究からKチャンネル開口薬のうち、K2P:のBL1249、BKのNS1619、SKのSKA31には脊髄および脳内で急性疼痛、炎症性疼痛、神経障害性疼痛に随伴する兆候の一部に対して鎮痛作用を持つことが分かった。また運動機能への影響は少ないという結果であった。このことから運動機能以外の副作用に関する検討が更に必要であるがKチャンネル開口薬のある種の薬物には様々なタイプの痛みにも有効な新しい治療薬になる可能性があると考えられる。一方、KvのDIDS、SKのCyPPAは反対に痛覚過敏を示した。この原因は現在のところ不明であるが下行性疼痛抑制系に対する脱抑制やKチャンネルに対する作用以外の薬理作用が関与している可能性がある。

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 3件)

Hara K, Haranishi Y, Kataoka K, Takahashi Y, Terada T, Nakamura M, Sata T. Chlorogenic acid administered intrathecally alleviates mechanical and cold hyperalgesia in a rat neuropathic pain model. *Eur J Pharmacol*. 査読有 2014;723:459-464. DOI: 10.1016/j.ejphar.2013.10.046

Kataoka K, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Sata T. The antinociceptive effect of SNAP5114, a gamma-aminobutyric acid transporter-3 inhibitor, in rat experimental pain models. *Anesth Analg*. 査読有 2013;116:1162-1169. DOI: 10.1213/ANE.0b013e318282dda7

Hara K, Nakamura M, Haranishi Y, Terada T, Kataoka K, Sata T. Antinociceptive effect of intrathecal administration of hypotaurine in rat models of inflammatory and neuropathic pain. *Amino Acids*. 査読有 2012;43:397-404. DOI: 10.1007/s00726-011-1094-9

[学会発表](計 1件)

Kataoka K, Hara K, Haranishi Y, Terada T, Sata T. Analgesic action of intrathecally administered gamma-aminobutyric acid transporter-3 inhibitor in rat pain models. 2013 Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists. 2013年10月12日-16日 San Francisco

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 幸治 (HARA, Koji)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号： 20331001

(2)研究分担者

原西 保典 (HARANISHI, Yasunori)

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号： 90449942

片岡 和史 (KATAOKA, Kazunori)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号： 70441839

中村 元洋 (NAKAMURA, Motohiro)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号： 30461578

佐多 竹良 (SATA, Takeyoshi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号： 60128030