

平成 21 年 5 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18591718
 研究課題名 (和文) 難治性疼痛治療の新しいアプローチ、ミクログリア P2X4 受容体機能と発現の検討
 研究課題名 (英文) Novel therapeutic approach for severe chronic pain - the analysis of function and expression of microglia P2X4 receptors.
 研究代表者 森 隆 (MORI TAKASHI)
 大阪市立大学・大学院医学研究科・講師
 研究者番号 00336786

研究成果の概要：ミクログリアに発現する P2X4 受容体、プロトンチャネルはそれぞれ慢性疼痛機序、食作用において重要な役割を持つ。これらの受容体・チャネルに対する麻酔薬の作用をパッチクランプ法によりセルライン (GMI-R1, BV2) を用いて検討した。BV2 において低濃度 ATP (100 μ M 以下) で誘起する電流はイベルメクチンによって増強し、P2X4 受容体電流と同定できた。GMI-R1 においてプロトンチャネルは局所麻酔薬で抑制され、食作用抑制が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

研究分野：医歯薬学

分科・細目：外科系臨床医学・麻酔・蘇生学・疼痛治療学

キーワード：ミクログリア、P2X4 受容体、パッチクランプ法、麻酔薬、プロトンチャネル、

1. 研究開始当初の背景

神経障害性疼痛に代表される慢性の難治性疼痛はその発症機序の多様性ゆえ治療に難渋することが多い。より良い治療法を導入また開発するためには、疼痛発症機序の解明が重要な課題である。最近の基礎研究で、脊髄ミクログリア、そして発現する P2X4 受容体が神経障害性疼痛に特徴的なアロディニアを引き起こすことが示された。それらをターゲットとした新しい疼痛治療法の開発に関心が寄せられている。そのためミクログリア P2X4 受容体機能、そして受容体発現の機序の解明により、難治性疼痛の治療に有益な

情報が得られることが期待される。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛の発生において重要なミクログリア P2X4 受容体機能と発現についての研究を行なう。パッチクランプ法を用いてミクログリア P2X4 受容体の電気生理学および薬理的機能を調べ、また発現のメカニズムとしては免疫組織学的手法を用いる。P2X4 受容体は ATP をアゴニストとするイオンチャネルであり、主にパッチクランプ法を用いて、臨床で疼痛治療に用いる薬物、神経ブロックなどに用いる局所麻酔薬、そして全身

麻酔薬などが、P2X₄受容体機能および発現にどのように影響するかを調べ、従来使用してきた薬物の難治性疼痛治療への新たな可能性を検討することを目標とする。

3. 研究の方法

＜マイクログリアセルラインの培養＞

ラットマイクログリアセルラインの継代培養を行う。培養液中の血清、GM-CSFの濃度等の調整により、パッチクランプ法を用いた電気生理学的研究、蛍光免疫法を用いた研究それぞれに適した安定した培養条件を作る。

＜パッチクランプ法によるP2X₄受容体の電気生理学的・薬理学性質の検討＞

ホールセルパッチクランプ法を用いて、ATPにより誘起する電流を記録する。パッチクランプアンプにAxopatch200B (Axon Instruments, Inc. USA)、ADコンバーターにDigidata1200 (Axon Instruments, Inc. USA)を使用する。ATPはU-tube system等のrapid perfusion systemを用いて投与する。マイクログリアには主にP2X₄受容体とP2X₇受容体の2種類のイオンチャンネル型ATP受容体が存在する。P2X₄受容体を介する電流(P2X₄受容体電流)を記録するために、マイクログリアに多く発現するP2X₇受容体をoxidized ATP (200 μM)等のブロッカーを用いてブロックする。P2X₄受容体電流を記録し、薬理的・電気生理学的手法を用いてその性質を評価する。ピーク電流量、ATP用量反応曲線、電流・電圧曲線、受容体脱感作、電流のdensity (電流の大きさ/膜容量)などを評価する。プロトコール設定、記録、解析はパッチクランプ記録解析ソフトpClamp10 (Axon Instruments, Inc., USA)を用い、コンピューター上で行う。次にP2X₄受容体電流に対する、リドカイン、ケタミン、α2アゴニスト(デキサメドミジン)等の麻酔薬、鎮痛薬の影響を調べる。投与濃度、投与時間による影響を検討する。

＜蛍光免疫染色法によるP2X₄受容体の発現に対する臨床使用薬剤の検討＞

マイクログリア P2X₄ 受容体の発現に関わる生理活性物質を調べる実験を行う。ガラスボトムディッシュに撒いたマイクログリアを用い、蛍光標本を作成する。倒立型共焦点レーザー स्क्यान顕微鏡 (LSM510、ツアイス社)を用いて、蛍光標本をレーザー光で走査し、画像処理用ソフトにより解析を行い、蛍光強度を測定する。蛍光強度により、P2X₄ 受容体の発現を評価する。パッチクランプの研究で得られたデータとも比較し、適切な培養状態の作成にフィードバックする。慢性難治性疼痛において、マイクログリア活性化に関わる生理活性物質の候補として考えられている、グルタミン酸、サブスタンス P、ATP、フラクタ

ルカイン、他にも脊髄の神経細胞から放出される NO、プロスタグランジン (PGE₂、PGI₂)、アセチルコリンなどについて、それぞれを添加して培養を行い、P2X₄受容体発現増加について検討する。さらに局所麻酔薬、全身麻酔薬(吸入麻酔薬、静脈麻酔薬)、鎮痛薬の P2X₄受容体発現への影響を検討する。

4. 研究成果

マイクログリアセルラインを用いたため基本的に活性化型マイクログリアでの実験となった。大阪市立大学・大学院医学研究科・生理学教室、同共同研究施設の協力を得て、安定した継代培養を行なった。

当初はラットマイクログリアセルライン GMI-R1を用いた。ホールセルパッチクランプ法により(膜電位を-70mVに固定)、ATP投与による誘起電流を記録した。Uチューブシステムを作成し、ATPの投与を行った。他のP2X受容体活動を除外し、P2X₄受容体のみの記録を行うために、oxidized ATP 1 mMを培養細胞に前処置した。その結果、100 μM付近のATPにより誘起される20~50 pAの小さな電流が記録された。この電流波形の特徴として、ATP投与による脱感作を認め、繰り返しATP投与により電流が小さくなる傾向を認めた。静脈麻酔薬によりP2X₄受容体電流の影響を認めた。しかし、この微小なP2X₄受容体電流は脱感作する傾向があり安定した記録が困難で、培養細胞の中のごく少数でしか記録ができなかった。P2X₄受容体発現を増やすためフィブロネクチン処理を行なったが、電流の増加を認めず、GMI-R1ではフィブロネクチンによる発現増加は少ないと考えられた。そこでP2X₄受容体発現の多いマイクログリアセルラインBV-2を用いた。BV-2では低濃度ATP (100 μM) で誘起する電流を認めた。P2X₄受容体刺激作用のあるイベルメクチンでの著明な増加を認め、P2X₇受容体ブロッカーbrilliant blue Gで抑制されないことより、P2X₄受容体電流であることが確認できた。また100 μM付近でのATP濃度ではP2X₇受容体電流は生じないことがわかった。P2X₄受容体電流記録の条件を調整することにより、安定した記録を行い、麻酔薬や鎮痛薬の作用について評価を行なう段階に到達した。

蛍光免疫染色を用いた受容体発現については、現在も検討課題である。最近の報告で、マイクログリア P2X₄ 受容体発現増加メカニズムに関する物質として、細胞外マトリックスのフィブロネクチン、サイトカインの一種であるインターフェロンγが示されており、興味を持たれている。今回の研究では、パッチクランプを用いた P2X₄ 受容体電流記録による実験を優先した。

GMI-R1を用いて、マイクログリアの食作用に必須とされるプロトンチャンネルの記録を行っ

た。中枢神経系のマクロファージであるミクログリアは、異常事態に対応して食作用やサイトカインの分泌などの免疫機能を発揮する。麻酔薬の免疫系細胞の機能への作用も重要な課題と考え、パッチクランプ法を用い電位依存性プロトンチャンネル電流を記録し、全身・局所麻酔薬の作用を検討した。全身麻酔薬には明らかな作用が無かったが、局所麻酔薬（リドカイン、ブピバカイン）によるプロトンチャンネル抑制作用という興味深い結果が観察されたので、詳細に検討した。図1のように、リドカインは濃度依存性にプロトンチャンネルを抑制した。この抑制は可逆的であった。ブピバカインのほうがリドカインより強く抑制した。Ramp波を用いて電流電圧曲線を調べたところ、リドカインによる逆転電位（RP）のプラス側への移動を認めた（図2）。このことから局所麻酔薬が細胞内のpHを変化させることが抑制のメカニズムの1つと考えられた。しかしそれだけでは全ての抑制の説明はつかず、それ以外の機序も存在することが示唆された。またイオン化のリドカイン誘導体QX-314では全く影響を受けないことから、局所麻酔薬はチャンネルの細胞膜外側から作用しないことが明らかになった。局所麻酔薬は免疫・炎症作用を抑制するが、今回の結果はそれを支持する重要な一面と考えられた。

図1

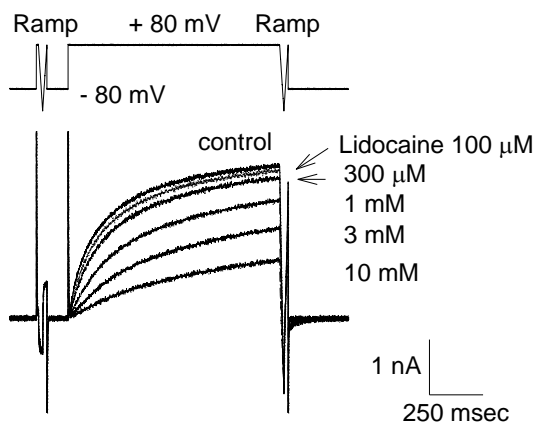
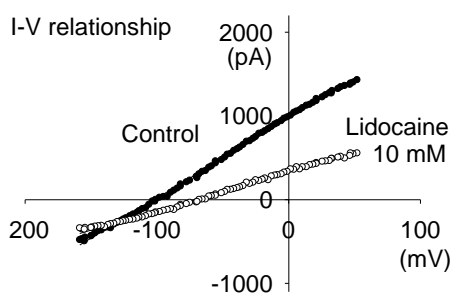


図2



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 4件）

1. Tadashi Matsuura, Yutaka Oda, Katsuki Tanaka, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa, Akira Asada. Advance of age decreases the minimum alveolar concentrations of isoflurane and sevoflurane for maintaining bispectral index below 50. *British Journal of Anaesthesia* 102;331-5 (2009) 査読有
2. 中村武人, 小田裕, 松下三二, 森 隆, 池下和敏, 浅田章: 全身強直症候群に対する胸腺摘出術の全身麻酔経験: 麻酔 56:1200-2 (2007) 査読有
3. 森 隆: 気道確保法の進歩: *Anet* 11;28-30 (2007) 査読無
4. Mika Nakanishi, Takashi Mori, Kiyonobu Nishikawa, Makoto Sawada, Miyuki Kuno, Akira Asada. Effects of general anesthetics on P2X7 and P2Y receptors in a rat microglial cell line. *Anesthesia & Analgesia* 104;1136-44 (2007) 査読有

〔学会発表〕（計 5件）

1. 松山大樹, 山間義弘, 森 隆, 西川精宣, 浅田章: レミフェンタニルは甲状腺手術においてフェンタニルよりも有用か?: 第 55 回 日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008/6/13
2. 山間義弘, 西川精宣, 舟尾友晴, 森 隆, 浅田章: Clonidine と Gabapentin のくも膜下併用投与は相乗的にアロディニアを抑制する—ラット脊髄神経結紮モデルにおける検討: 第 55 回 日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008/6/12
3. 小谷百合子, 松浦正, 森 隆, 池下和敏, 西川精宣, 浅田章: Hunter 症候群 3 例の麻酔経験: 第 55 回 日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008/6/12
4. 松浦正, 小田裕, 森 隆, 吉岡美和子, 西川精宣, 浅田章: イソフルラン、セボフルランの MACBIS50 は加齢により低下する。: 第 55 回 日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2008/6/12
5. 森 隆, 久野み行き, 山間義弘, 仲西未佳, 西川精宣, 浅田章: リドカインのミクログリアプロトンチャンネルに及ぼす影響: 第 54 回 日本麻酔科学会学術集会, 横浜, 2007/5/31

〔図書〕(計 1件)

1. 仲西未佳、森 隆 中枢神経作用と自律神経作用 浅田 章、西川精宣 編集「局所麻酔薬中毒・アレルギー」克誠堂出版(東京)(2008年)総ページ数224ページのうちp.40-56を担当

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 隆 (MORI TAKASHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科
講師
研究者番号 00336786

(2) 研究分担者

西川 精宣 (NISHIKAWA KIYONOBU)
大阪市立大学・大学院医学研究科
准教授
研究者番号 20145791
平成 18 年～19 年度

池下和敏 (IKESHITA KAZUTOSHI)
大阪市立大学・大学院医学研究科
講師
研究者番号 20288898
平成 18 年～平成 19 年度

(3) 連携研究者

西川 精宣 (NISHIKAWA KIYONOBU)
大阪市立大学・大学院医学研究科
准教授
研究者番号 20145791
平成 20 年度