

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 27 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07104

研究課題名(和文) 神経伝達経路をターゲットとした掻痒治療薬の創薬基盤の創設研究

研究課題名(英文) Establishment of the drug discovery research for pruritus treatments targeting neurotransmitter pathways

研究代表者

田辺 光男 (Tanabe, Misuo)

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、マウスのneckモデル、cheekモデルおよびcalfモデルを用い、KCNQチャンネル開口薬retigabineがヒスタミン依存性および非依存性の急性掻痒を抑制することを明らかにした。特にcalfモデルにおいて、掻痒シグナルが入力する腰部脊髄にretigabineを投与することにより痒みを反映するbiting行動が抑制されたことから、脊髄が重要な鎮痒作用部位であることが示された。しかし、retigabineの鎮痒作用はKCNQチャンネル遮断薬XE-991で拮抗されなかったことから、retigabineはKCNQチャンネル開口に依存せずに鎮痒作用を示すことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

掻痒治療では、従来から皮膚病変や免疫機能異常に焦点を当てた治療が行われてきたが、既存薬に抵抗性を示す難治性掻痒が存在する。慢性掻痒は、アトピー性皮膚炎や慢性腎肝疾患など抗ヒスタミン薬抵抗性の難治性疾患である。近年、痒みを伝達する神経機構の解明が急速に進み、脊髄後角での痒み特異的経路の存在が明らかになっている。痒みも痛みと同様に慢性化には神経の可塑的变化が重要であることから、中枢神経を標的とした鎮痛薬が鎮痒作用も併せ持つ可能性がある。脊髄後角を作用点とする鎮痒薬は今までにない新しい機序の掻痒治療薬となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used mouse neck, cheek, and calf models to investigate whether the KCNQ channel opener retigabine suppresses histamine-dependent and -independent acute pruritus. Especially in the calf model, injection of retigabine to the lumbar spinal cord, where peripheral itch signals are transmitted in this model, suppressed the biting behavior reflecting itching, indicating that the spinal cord is an important antipruritic site of action of retigabine. However, this antipruritic effect of retigabine was not antagonized by the KCNQ channel blocker XE-991, suggesting that retigabine exhibits antipruritic effects independent of KCNQ channel opening.

研究分野：神経薬理学

キーワード：掻痒 KCNQチャンネル 抑制性 疼痛 脊髄

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

痛みの慢性化では、末梢から痛みを伝える一次求心性神経の興奮性増加(末梢性感作)や、上位中枢への中継点となる脊髄後角の可塑的变化(中枢性感作)が痛覚伝達の増幅に関係する。末梢性感作には、イオンチャネルの発現変化などが大きく寄与する。中枢性感作では、関わる機序の一つに脊髄後角での抑制性の減少すなわち脱抑制があり、興奮と抑制のバランスが崩壊する。最近、痒みの慢性化において、脊髄後角の中枢性感作が果たす役割が示され、脊髄後角の脱抑制が激しい痒みを引き起こすことが報告されている。すなわち、脊髄後角で抑制性を強めることが掻痒に対する新しい治療戦略となり得る。神経の興奮性の制御においてイオンチャネルの果たす役割は大きく、抑制性を強める上でK⁺チャネルの開口は重要である。中でも、KCNQ (Kv7) K⁺チャネルはその開口薬が神経障害性疼痛モデル動物や炎症性疼痛モデル動物において鎮痛効果を示すことが近年報告された。これを受け、研究代表者は予備検討を行い、KCNQ 開口薬がクロロキン誘発急性掻痒モデル動物の引っ掻き行動を抑制することを確認した。研究代表者のこれらの予備検討は、慢性化した痛みと痒みに対し少なくとも一部は共通した治療戦略が存在することを示唆している。

2. 研究の目的

KCNQ チャネルが、痒みの調節の上でも積極的に関わることを明らかにし、痒み調節につながる神経メカニズムの解明に結びつく研究を展開する。これを達成するために、次の3点を重点研究項目とする。

- (1) 複数の掻痒マウスモデルを用いることで、KCNQ チャネルの痒みへの関与とその特性を明らかにする。
- (2) 痛みと痒みを区別して同時に測定できるマウスの cheek モデルや calf モデルを用い、痛みと痒みへの KCNQ チャネルの関与の違いあるいは同等性を明らかにする。
- (3) 脊髄スライス標本を用い、KCNQ チャネル開口薬の痒み抑制メカニズムを電気生理学的に解明する。

3. 研究の方法

(1) 掻痒モデル動物の作製

動物は、ICR 系雄性マウスを用い、急性掻痒モデルとして neck モデル、cheek モデルおよび calf モデルを作製した。Compound 48/80 をヒスタミン依存性、抗マラリア薬のクロロキンをヒスタミン非依存性の起痒物質としてそれぞれ用いた。Neck モデルでは、吻側背部の約 1×2 cm の範囲の毛をバリカンで刈り、その2日後に同部位に起痒物質を皮内注射し、後肢による引っ掻き行動回数を計測した。Cheek モデルでは、右頬の皮内に起痒物質あるいは発痛物質のカプサイシンを投与した。起痒物質では痒み反応(後肢による頬の引っ掻き行動)と弱い痛み行動(前肢による顔面の wiping)を示す。一方、カプサイシンの場合は逆で、痛み行動が顕著である。Calf モデルでは、左後肢のふくらはぎに起痒物質あるいはカプサイシンを皮内投与し、痒みを反映する biting 行動と痛みを反映する licking 行動を誘発した。

また、慢性掻痒モデルとして ICR 系雄性マウスを用いて接触性皮膚炎モデル(DNFB モデル)を作製した。麻酔下で吻側背部を毛刈りした2日後、露出部位に 0.5%1-fluoro-2,4-dinitrobenzene (DNFB)を塗布して感作させ、その5日後を day 1 として、day 1, 3, 5, 7 に DNFB を塗布して 型アレルギーを誘発した。Day 2, 4, 6, 8 に引っ掻き回数測定を行った。

(2) 電気生理学的実験

ICR 系雄性マウスを麻酔し、ラミネクトミー後に脊髄を取り出し、氷冷下に後根を付けて厚さ 450 μm のスライスを作製した。視認した後角ニューロンから patch-clamp 法で whole-cell 記録した。

(3) 統計

データは平均値±標準誤差で表した。Control 群と薬物投与群との比較には分散分析(ANOVA)を行った後、Dunnnett の多重比較検定を行い、危険率 $p < 0.05$ で有意とした。

4. 研究成果

- (1) 掻痒モデル動物を用いた行動実験
急性掻痒モデル

Neck モデルにおいて、起痒物質の 15 分前に腹腔内投与した retigabine (10, 30 mg/kg) は、compound 48/80 誘発およびクロロキン誘発の引っ掻き行動を抑制した。一方、retigabine (10, 30 μ g) を起痒物質投与の 15 分前あるいは 5 分前に脊髄髄腔内投与した場合も、これら起痒物質誘発の引っ掻き行動は抑制されなかった。また、KCNQ チャネル遮断薬 XE-991 (5, 10 mg/kg) を腹腔内投与後に retigabine (30 mg/kg) を腹腔内投与すると、retigabine の鎮痒効果は拮抗されずにむしろ増強された(図 1)。

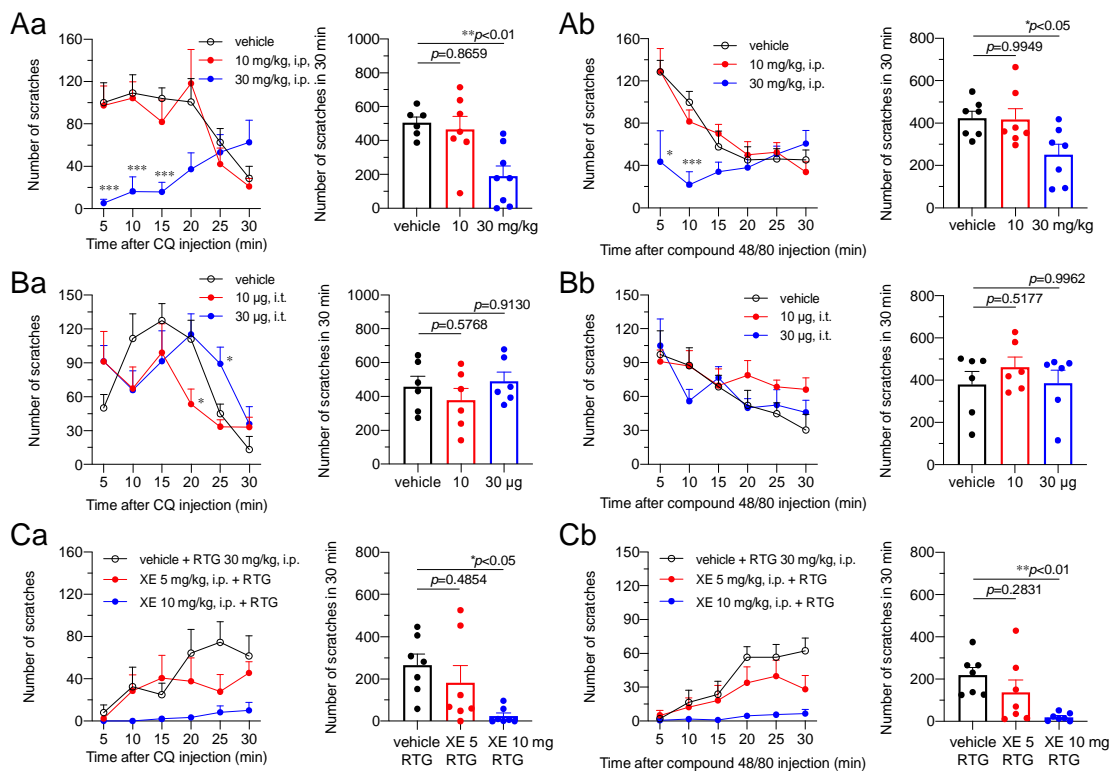


図 1. Neck モデルにおける retigabine の搔痒抑制作用

Retigabine は腹腔内投与(A, C)または脊髄髄腔内投与(B)した。XE-991 は腹腔内投与した(C)。

Cheek モデルについては、研究代表者らにとり搔痒行動評価モデルとして初めての導入であったため、正確な行動解析を可能とするような記録方法を試み、その確立後に retigabine の薬効評価を行った。Cheek モデルにおいて、カプサイシンは痛みを反映する wiping 行動を、起痒物質は痒みを反映する引っ掻き行動を増加させた。腹腔内投与した retigabine (10, 30 mg/kg) はこれら行動を抑制した。Retigabine は鎮痛作用を有することが既に報告されているため、本結果はそれを支持すると共に、鎮痒作用も併せ持つことを明確に示している。

Retigabine の鎮痒作用部位として脊髄が寄与するかどうかを検討する上で calf モデルに着目した。Neck モデルでは脊髄髄腔内投与した retigabine が鎮痒作用を示さなかったが、neck モデルでは起痒物質を首背部に投与するため、腰髄部分で retigabine が高濃度となる脊髄髄腔内投与との組み合わせが適していない可能性が考えられた。そこで痒みシグナルが坐骨神経を介して腰髄に入力する calf モデルでの評価を行った。Calf モデルについても研究代表者らにとり搔痒行動評価モデルとして初めての導入であったため、正確な行動解析を可能とするような記録方法を試み、その確立後に retigabine の薬効評価を行った。Calf モデルにおいて、脊髄髄腔内投与した retigabine (10, 30 μ g) はカプサイシン誘発の licking 行動を抑制し、起痒物質誘発の biting 行動を抑制した。すなわち、retigabine の鎮痛作用と鎮痒作用において、脊髄が重要な作用部位であることを示している。ただし、鎮痒作用は compound 48/80 よりもクロロキン誘発の biting 行動に対する方が強く認められたため、XE-991 による拮抗実験はクロロキンとの組合せで実施したが、XE-991 (5, 10 μ g) を事前に脊髄髄腔内投与しても retigabine は単独時と同様の鎮痒作用を示した(図 2)。

我々は別の研究課題において retigabine が神経障害性疼痛モデルマウスの機械的アロディニアや熱痛覚過敏を緩解し、この緩解作用は XE-991 で拮抗されることを明らかにしている(2019年~2021年若手研究: 研究課題番号 19K16377, 研究代表者: 尾山実砂)。従って、retigabine は KCNQ チャネル開口による鎮痛作用を示す一方、その鎮痒作用は KCNQ チャネル開口に依存しないと考えられる。

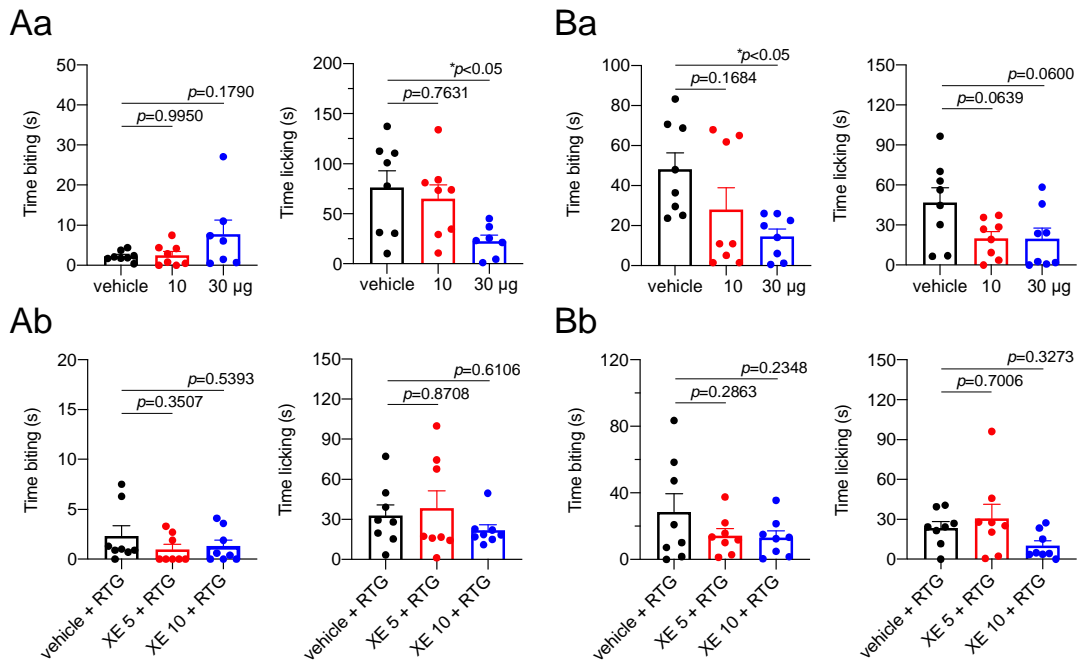


図 2. Calf モデルにおける retigabine の搔痒抑制作用
 カプサイシン(A)やクロロキン(B)誘発の biting および licking 行動に対する脊髄髄腔内投与した retigabine の作用(Aa, Ba)と XE-991 を脊髄髄腔内投与後の retigabine の作用(Ab, Bb)。

慢性搔痒モデル

DNFB モデルについては、研究代表者らにとり搔痒行動評価モデルとして初めての導入であったため、モデルの確立から開始した。感作時には、毛刈りした吻側背部に 0.5% DNFB を 50 μ L 塗布し、型アレルギー誘発時には 0.25% DNFB を 30 μ L 塗布することで、持続的な引っ掻き行動を誘発することができたが、本研究課題期間中に retigabine の評価には至らなかったため、課題期間終了後に引き続き実施したい。

(2) 電気生理的評価

別の研究課題(2019 年～2021 年若手研究：研究課題番号 19K16377、研究代表者：尾山実砂)で、神経障害性疼痛マウスから作製した後根付き脊髄スライス標本で、retigabine が C-線維性単シナプス性 EPSCs には影響せず A-線維性単シナプス性 EPSCs を抑制することが判明した。研究課題申請時には慢性搔痒モデルから作製した脊髄スライスをを用いてシナプス伝達レベルの作用メカニズム解明を期待したが、痒みが C-線維を介して脊髄後角に入力することからも、この入力を retigabine が抑制する可能性は小さい。そこで、naive マウスから脊髄スライスを作製し、痒みシグナル応答に与える電気生理的な評価系の確立に取り組んだ。

脊髄後角でガストリン放出ペプチド(gastrin-releasing peptide; GRP)とその受容体 GRPR が痒みの特異的な伝達を担うことがわかってきた(Nature 2007; 448: 700-703)。また、脊髄後角で遅延性の活動電位発火応答を示すニューロンは、GRP 適用により脱分極して持続性活動電位発火を示すことが報告されている(Neuron 2019;103:102-117)。本研究課題では、後角ニューロンを patch-clamp 法による current-clamp 記録下で膜電位を測定し、脱分極性電流を加えて活動電位を誘発した。遅延性の活動電位発火応答が確認される場合に GRP (300 nM)を灌流適用すると、膜電位の脱分極と共に持続性活動電位発火に変化することを再現した(図 3)。これを基に、retigabine が与える作用を引き続き検討していきたいと考えている。

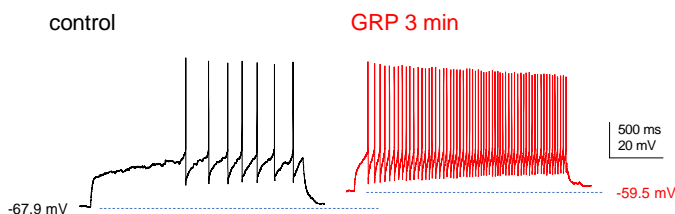


図 3. GRP による脱分極と活動電位発火パターンの変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村友哉、尾山実砂、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男
2. 発表標題 KCNQ(Kv7)K+チャネル開口薬retigabineは急性疼痛及び急性掻痒を抑制する
3. 学会等名 第144回日本薬理学会関東部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾山実砂、中村友哉、平山重人、渡辺俊、岩井孝志、藤井秀明、田辺光男
2. 発表標題 KCNQ(Kv7)K+チャネル開口薬retigabineはcheek modelにおける疼痛及び掻痒を抑制する
3. 学会等名 第40回鎮痛薬・オピオイドペプチドシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾山実砂、中村友哉、神崎智子、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男
2. 発表標題 KCNQ (Kv7) K+チャネル開口薬retigabineの鎮痛および鎮痒作用の行動薬理的・電気生理学的解析
3. 学会等名 第95回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 尾山実砂、渡辺俊、岩井孝志、田辺光男
2. 発表標題 KCNQ (Kv7) K+チャネル開口薬retigabineは鎮痛と鎮痒作用を示す
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------