

令和 4 年 5 月 28 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16377

研究課題名（和文）KCNQ(Kv7)K+チャネル開口薬による慢性疼痛緩解の脊髄後角シナプス機構

研究課題名（英文）The synaptic analgesic mechanisms of KCNQ (Kv7) K+ channel opener in the spinal dorsal horn.

研究代表者

尾山 実砂 (Oyama, Misa)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：20804503

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、KCNQチャネル開口による鎮痛作用機序解明を目指し、行動薬理学的及び電気生理学的手法を用いて検討した。行動実験より、全身または脊髄内投与したKCNQチャネル開口薬retigabineが鎮痛効果を有し、これはKCNQチャネル遮断薬XE-991の全身または脊髄内投与により拮抗された。よってretigabineの鎮痛効果にはKCNQチャネルの開口が必須であり、その作用点として脊髄が重要であることが示唆された。この脊髄におけるretigabineの作用を電気生理学的に解析したところ、一次求心性A線維由来の興奮性神経伝達を大きく抑制したため、これが鎮痛作用へ寄与していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

急性痛は生体に危険を伝える生理的役割を持つため必要な感覚だが、慢性痛はそれ自体が疾患とされ、患者の生活の質の低下を招くため積極的治療を要する疾患である。本邦の成人における慢性疼痛の有病者は4人に1人とされ、労働意欲の減退による生産力の減弱なども伴うことから、医療費以外にも経済的損失は大きい。しかし、慢性疼痛の治療薬として使われるオピオイド鎮痛薬には乱用や依存への懸念がある。このため、本研究によりKCNQチャネルの開口による鎮痛機序を解明したことは、非オピオイド性の新規鎮痛薬としてKCNQチャネルが新たな治療ターゲットとなる可能性を示し、慢性疼痛患者へ新たな選択肢を増やすことに繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the analgesic mechanisms of KCNQ channel opening with behavioral pharmacology and electrophysiology. In the behavioral experiments, systemic or intrathecal administration of the KCNQ channel opener retigabine showed analgesic effects, which were antagonized by systemic or intrathecal administration of the KCNQ channel blocker XE-991. Therefore, it was suggested that the opening of KCNQ channels is essential for the analgesic effect of retigabine, and that the spinal cord is important as the site of action. In the electrophysiological analysis, we studied the effect of retigabine in the spinal cord, which revealed that retigabine strongly suppressed excitatory neurotransmission derived from the primary afferent A-fiber, contributing to pain relief.

研究分野：神経薬理学

キーワード：KCNQチャネル 疼痛 脊髄 抑制性 電気生理学

1. 研究開始当初の背景

痛みシグナルは一次求心性神経を介して脊髄後角に入力し、そこで二次ニューロンにシナプス伝達された後、上位中枢で痛みとして認識される。慢性疼痛の病態形成や維持では、この痛覚伝達経路の感受性や活動が末梢性あるいは中枢性に亢進する末梢性感作や中枢性感作により痛覚シグナルが増幅されている。脊髄後角での興奮と抑制のバランスは非常に重要であり、末梢性感作に起因する一次求心性神経からの入力増大や中枢性感作による脊髄後角における興奮性増大あるいは抑制の減弱(脱抑制)など、様々な要因によりバランスが崩れて興奮優位な状態が持続して痛覚異常を引き起こすと考えられる。従って、興奮性入力を減弱させ崩れたバランスを正常化させることは、新規慢性疼痛治療薬開発に繋がる可能性が高い。

一般に K⁺チャンネルは開口により神経細胞の膜電位を過分極させるが、中でも KCNQ チャンネルは、活性化閾値が低く不活化しない M 電流(ムスカリンに名称が由来して M 電流と呼ばれる)に関わる K⁺チャンネルであり、弱い興奮性入力で持続的に活性化され神経細胞の興奮性を抑制する働きがある。近年、KCNQ チャンネル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報告され、慢性疼痛病態時に KCNQ チャンネルの発現が低下することからも、一次求心性神経あるいは脊髄に存在する KCNQ チャンネルが疼痛治療のターゲットとなることが示唆されている。

2. 研究の目的

KCNQ チャンネルが痛み感覚調節においてどのように関与するか、また、KCNQ チャンネル開口薬の鎮痛メカニズムの解明を目指し、慢性疼痛モデル及び naïve マウスを用いて以下の2点を実施することを本研究の目的としている。

- (1) KCNQ チャンネル開口薬の鎮痛作用メカニズムをシナプスレベルで解明するために、電気生理学的手法を駆使し、KCNQ チャンネル開口薬あるいは阻害薬が脊髄後角のシナプス伝達に与える影響をミクロに捉える。
- (2) 膜電位感受性色素を用いた光学測定により、一次求心性神経刺激が誘発する脊髄後角の膜電位変化に対する KCNQ チャンネル開口薬あるいは阻害薬の作用をマクロな視点で検討する。

3. 研究の方法

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスの作製

4 週齢の ddY 系雄性マウスを用いて、神経障害性疼痛モデルの 1 つである PSNL (partial sciatic nerve ligation, Seltzer) モデルを作製した。まず、麻酔下に大腿骨上の皮膚を切開してその下の筋膜に切れ込みを入れることで坐骨神経を視認し、1/3-1/2 を部分的に結紮した。坐骨神経の部分結紮は左後肢に行い、左後肢足底の熱及び機械刺激に対する反応を調べた。手術から 6-8 日後に、paw withdrawal latency (PWLs; 熱刺激に対する潜時)が 5 秒未満かつ 50%閾値が 0.1 g 未満を示す場合に熱痛覚過敏及び機械的アロディニアが生じているとした。

(2) 疼痛評価

機械的アロディニアの評価

太さの異なる、すなわち刺激強度の異なる数種のフィラメントをマウスの左後肢足底に対して垂直にフィラメントが曲がるまで押し付け、逃避反応を測定した。Dixon らの up-down 法を用いて 50%閾値を計測した。

熱痛覚過敏の評価

Hargreaves らの方法に従い、Plantar test を用いて熱痛覚過敏を評価した。薄いガラス板の上に置いたアクリル製チャンパーにマウスを 1 匹ずつ入れ、薄いガラス板の下で可動式赤外線光源をマウスの左後肢足底直下へと動かし、赤外線を照射してからマウスが逃避行動を起こすまでの潜時(PWLs)を測定した。

(3) 電気生理学の実験

神経障害性疼痛を誘発した ddY 系雄性マウス (PSNL モデルマウス) 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た厚さ 450 μm のスライスもしくは後根を除去した 300 μm のスライスを作製した。電極には K-gluconate を主体とした内液を用い、視認した後角ニューロンから patch-clamp 法で whole-cell 記録し、-70 mV に膜電位を保持した。なお、一次求心性神経由来の興奮性伝達 (A- or C-fiber-mediated excitatory postsynaptic currents; A- or C-fiber-mediated EPSCs) の記録は、後根付き脊髄スライスの後根を吸引電極に吸い込み、電気刺激することで誘発した。一方、後根を除去したスライスを用いて、tetrodotoxin (0.5 M) の灌流適用により電位依存性 Na⁺チャンネルを阻害した条件下で活動電位によらない微小興奮性シナプス後電流 (miniature EPSCs; mEPSCs) を記録した。

(4) 膜電位感受性色素を用いた光学測定

電気生理学実験と同様に、PSNL モデルマウスを用いて後根を付けた厚さ 450 μm のスライスを作製した。作製したスライスは、膜電位感受性色素の di-4-ANEPPS を溶解した人工脳脊髄液中でインキュベーションし、色素を組織内に取り込ませた。その後、後根を吸引電極で刺激し、刺激後の脊髄スライスにおける膜電位変化を記録した。

(5) 統計処理

データは平均値 \pm 標準誤差で表した。

行動実験より得られたデータの差異の評価には、Kruskal-Wallis test を行った後に Dunn の多重比較を行った。

電気生理学の実験より得られたデータの差異の評価には、2 群の比較では paired t-test あるいは Student's t-test を、3 群以上の比較では反復測定 1 元配置分散分析 (ANOVA) を行った後に Bonferroni の多重比較検定を行った。

4. 研究成果

(1) 神経障害性疼痛モデルマウスを用いた行動実験

KCNQ チャネル開口薬 retigabine の単独投与による鎮痛効果

神経障害性疼痛を誘発したマウスに対して、腹腔内投与した KCNQ チャネル開口薬の retigabine (10, 30 mg/kg) または脊髄髄腔内投与した retigabine (10, 30 μg) は、用量依存的な熱痛覚過敏緩解作用及び抗アロディニア効果を示した(図 1)。これまで、retigabine の全身投与が鎮痛効果を示すという報告はされていたが、本結果より retigabine の鎮痛効果には脊髄への作用を含むことが示された。

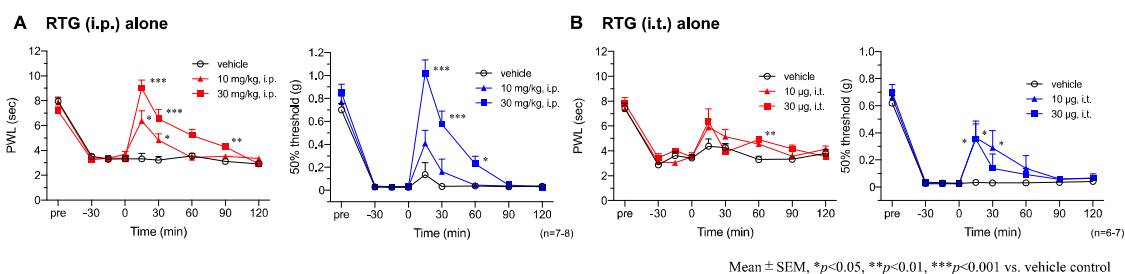


図 1. PSNL モデルマウスにおける retigabine の鎮痛効果

Retigabine を腹腔内投与(A)あるいは脊髄髄腔内投与(B)した時の plantar test (左)及び von Frey test (右)の結果。retigabine; RTG.

Retigabine の鎮痛効果に対する KCNQ チャネル遮断薬 XE-991 の拮抗作用

腹腔内あるいは脊髄髄腔内投与した retigabine が鎮痛効果を示したことから、KCNQ チャネル遮断薬 XE-991 と組み合わせることで、retigabine の鎮痛作用が KCNQ チャネルを介するものかどうかを確認した。XE-991 (5, 10 mg/kg) を腹腔内投与あるいは XE-991 (5, 10 μg) を脊髄髄腔内投与した 15 分後に retigabine (30 mg/kg) を腹腔内投与すると、retigabine の鎮痛効果は用量依存的に拮抗された(図 2 A, B)。同様に、XE-991 (5, 10 μg) を脊髄髄腔内投与した 15 分後に retigabine (30 μg) を脊髄髄腔内投与すると、retigabine の鎮痛効果は消失した(図 2 C)。よって、retigabine は KCNQ チャネルを開口することで鎮痛効果を示し、脊髄は重要な作用点であることが明らかとなった。

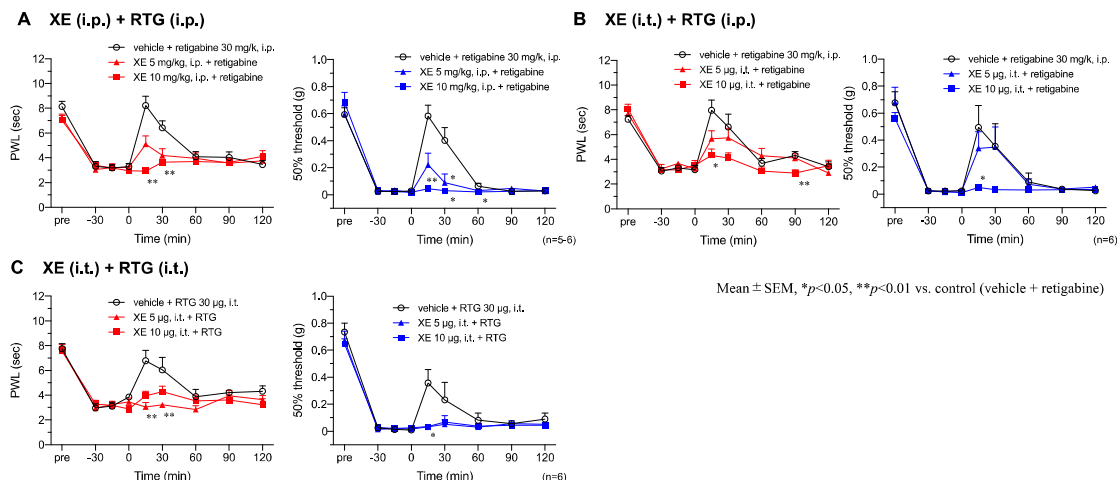


図 2. PSNL モデルマウスにおける retigabine の鎮痛効果に対する XE-991 の拮抗作用

XE-991 を腹腔内投与(A)あるいは脊髄髄腔内(B)後に retigabine を腹腔内投与した時の plantar

test (左)及び von Frey test(右)の結果。(C) XE-991 及び retigabine を脊髄髄腔内投与した時の plantar test (左)及び von Frey test (右)の結果。retigabine; RTG, XE-991; XE.

(2) Retigabine の鎮痛メカニズムの電気生理学的解析。

一次求心性神経由来の興奮性神経伝達に対する retigabine の作用

行動実験の結果より、retigabine は脊髄を作用点に持つことから、脊髄における鎮痛メカニズムを詳細に解析するために、神経障害性疼痛モデルマウスから作製した脊髄スライスを用いて電気生理学的実験を行った。すると、灌流適用した retigabine (50 μ M)は C-fiber-mediated EPSCs には影響を及ぼさなかったが、A-fiber-mediated EPSCs を強く抑制した(図 3)。

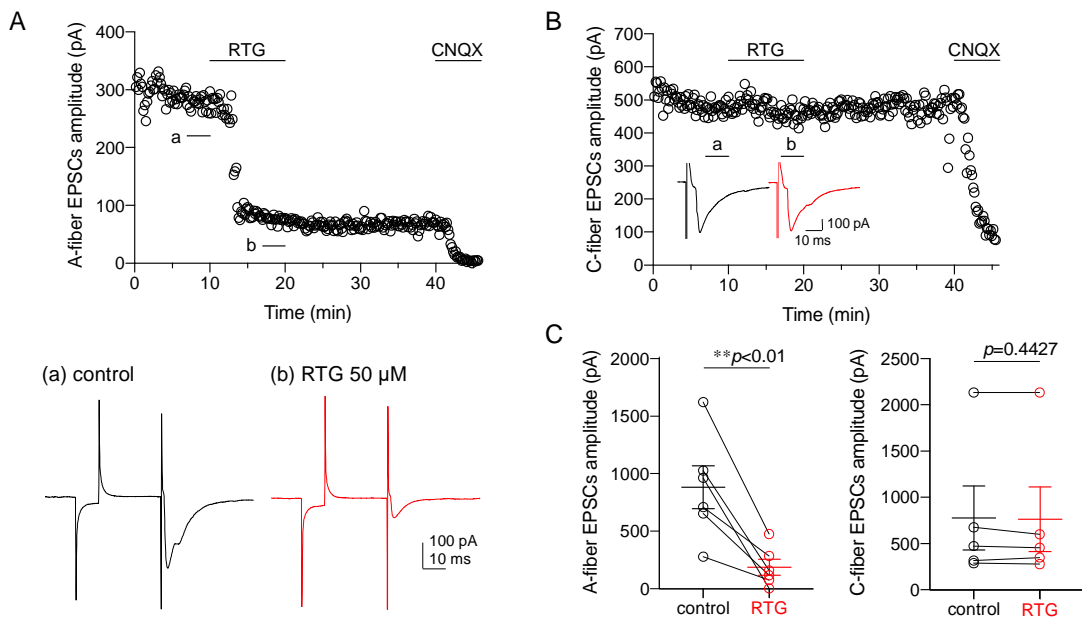


図 3. A- or C-fiber-mediated EPSCs に対する retigabine の作用
A-fiber-mediated EPSCs に対する retigabine の作用例(A)と、C-fiber-mediated EPSCs に対する retigabine の作用例(B)。また、各タイムコースグラフ中の control (retigabine 適用前, a)と retigabine 適用後(b)の平均波形を示している。(C) 全例における A-fiber-mediated EPSCs あるいは C-fiber-mediated EPSCs の振幅。retigabine; RTG.

Retigabine の一次求心性 A 線維由来の興奮性神経伝達抑制効果に対する XE-991 の作用

より、retigabine が A-fiber-mediated EPSCs を強く抑制することが明らかとなったが、この抑制効果が KCNQ チャネルの開閉によるものかを調べるために、XE-991 (10 μ M)の存在下に retigabine (50 μ M)を灌流適用した。すると、retigabine の単独適用時に見られた A-fiber-mediated EPSCs の抑制作用は現れなかった(図 4)。よって、retigabine は KCNQ チャネルを開閉することで A-fiber-mediated EPSCs を抑制していることが明確となった。

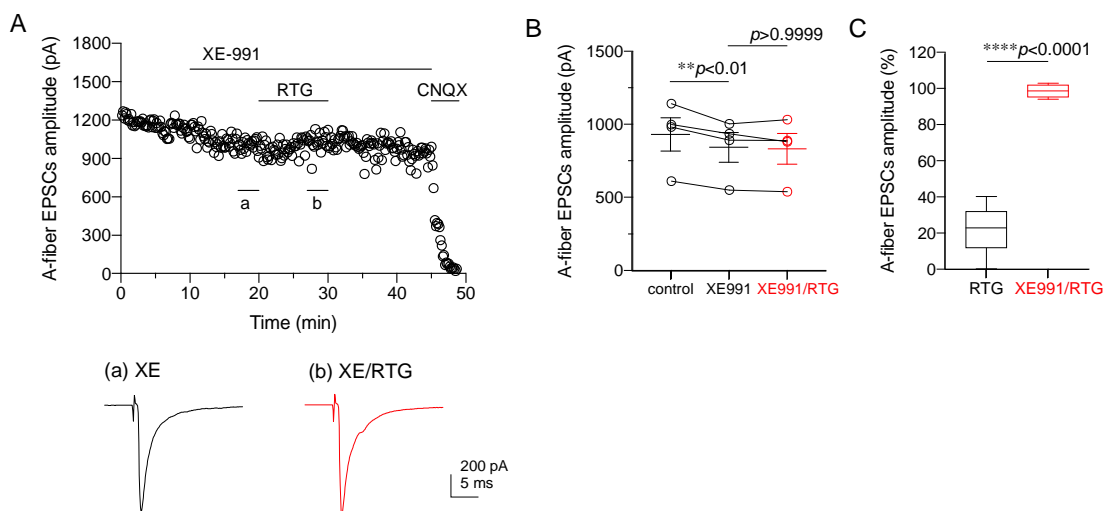


図 4. A-fiber-mediated EPSCs に対する XE-991 存在下での retigabine の作用
A-fiber-mediated EPSCs に対して、XE-991 を灌流適用した後に retigabine を灌流適用した際の作用例(A)。また、各タイムコースグラフ中の XE-991 適用後 (retigabine 適用前, a)と retigabine 適用後(b)の平均波形を示している。(B)全例における A-fiber-mediated EPSCs の振幅。(C) Retigabine 適用前を 100%とした時の retigabine 適用時と XE-991 存在下 retigabine 適

用時の振幅を百分率で示した。retigabine; RTG, XE-991; XE.

Retigabine の mEPSCs に対する影響

次いで、mEPSCs に対する retigabine の効果を検討したところ、mEPSCs の振幅及び頻度は変化しなかった(図 5)。

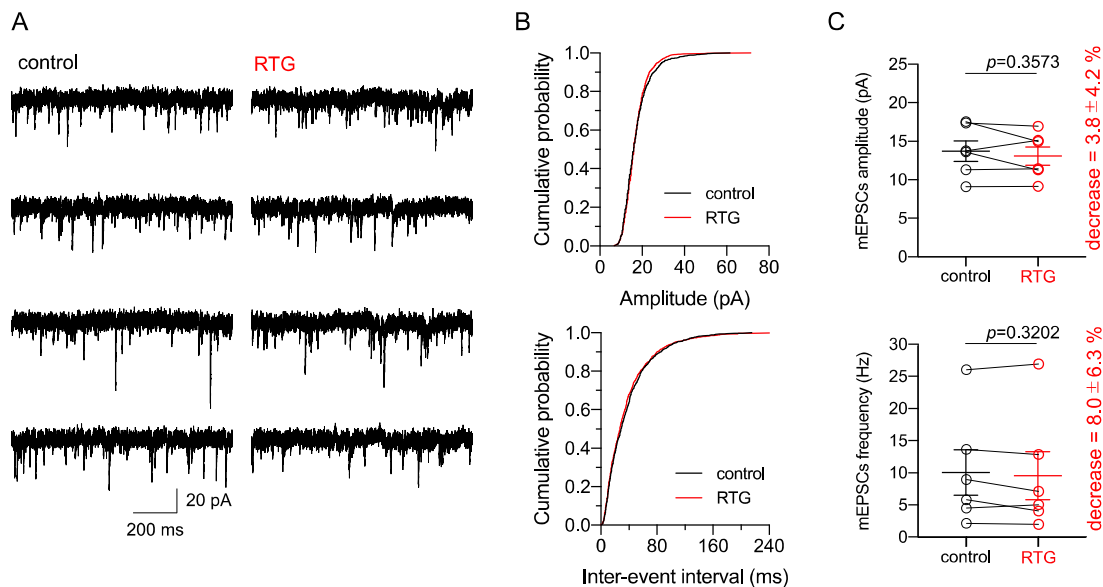


図 5. mEPSCs に対する retigabine の作用

mEPSCs に対して retigabine を灌流適用した時の作用例(A)。また、この時の control (retigabine 適用前)と retigabine 適用後の累積確率(B)。(C)全例における retigabine 適用前後の mEPSCs の振幅と頻度。retigabine; RTG.

(4) Retigabine の脊髄スライスに対する膜電位変化の記録

予備検討の段階で、一次求心性神経刺激後の脊髄後角の膜電位変化を記録したところ、naïve マウスよりも PSNL モデルマウスの脊髄後角において膜電位の脱分極レベルが増大する結果が得られていた。そこで、PSNL モデルマウスより作製した後根付き脊髄スライスで retigabine の作用を検討した。しかし、一次求心性神経刺激後の膜電位の脱分極レベルが、薬物非存在下よりも retigabine (50 μM)存在下において増大し、XE-991 (10 μM)存在下では減少した。この膜電位感受性色素を用いた光学測定では、電気刺激後の細胞膜の変化を相対的に記録するため、絶対的な膜電位を記録することはできない。このため、神経細胞に対する retigabine による過分極作用あるいは XE-991 による脱分極作用がマスクされてしまった可能性があると考え、電気生理実験でのより詳細な鎮痛メカニズム解明に努めた。

(5) 総括

本研究では、KCNQ チャンネル開口による鎮痛メカニズムの解明を目指し、KCNQ チャンネル開口薬の retigabine 及び KCNQ チャンネル遮断薬の XE-991 を用いて行動薬理的及び電気生理学的手法を駆使して検討した。行動実験より、retigabine が KCNQ チャンネルの開口により鎮痛効果を示し、その作用点として脊髄が重要であることが示唆された。この脊髄における retigabine の作用を電気生理学的に解析したところ、一次求心性 A 線維由来の興奮性神経伝達を大きく抑制することが明らかとなり、これが鎮痛作用へ寄与していることが明らかとなった。

また、我々の別の研究課題において retigabine が急性搔痒モデルマウスの痒み行動を抑制し、XE-991 を前投与してさらに retigabine を投与した時ではさらに痒みが抑制されていた (2019 年~2021 年基盤研究 C: 研究課題番号 19K07104、研究代表者: 田辺光男)。従って、retigabine の鎮痒作用は KCNQ チャンネル開口に依存しないが、KCNQ チャンネル開口により鎮痛作用を示すと考えられる。

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