

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 1 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791436

研究課題名（和文） ATP 感受性 K チャネルを標的とした神経因性疼痛治療への試み

研究課題名（英文） Evaluation of the analgesic effect to the neuropathic pain targeting ATP-sensitive potassium channels

研究代表者

河野 崇 (KAWANO TAKASHI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：40380076

研究成果の概要（和文）：神経因性疼痛の詳細な発生機序は未解明であるが、一次知覚ニューロンの電気的興奮性亢進を中心とした可塑的機能変化は重要な要因と考えられている。本研究課題では、ATP 感受性 K^+ (K_{ATP}) チャネルが一次知覚ニューロンに発現するかどうか、さらにその電気生理学的特徴を明らかとし、神経因性疼痛治療に対する標的となるかどうかを検討することを目的とした。その結果、神経因性疼痛モデルラットでは、 K_{ATP} チャネル活性が低下していることを明らかとした。このことは K_{ATP} チャネルが神経因性疼痛の病態機序に関連していることを示唆している。また、 K_{ATP} チャネル活性を制御する内因性因子として神経ステロイドの可能性を検討し、神経ステロイドの一つであるアロプレグナロンが神経因性疼痛の病態機序に関与することを明らかとした。

研究成果の概要（英文）：Although detailed mechanisms of neuropathic pain remained unclear, altered sensory function contributes to the pathogenesis of neuropathic pain via hyperexcitability in injured axons. Here, we investigated the analgesic effect to the neuropathic pain targeting ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels. Our results indicated that reduced K_{ATP} currents may be a factor in generating neuropathic pain through increased excitability. In addition, we examined the possibility of neurosteroid as the endogenous factor which can modulate K_{ATP} channel activity. Our results demonstrated that allopregnanolone, one of the neurosteroid, contributed to the pathogenesis of neuropathic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：Kイオンチャネル、神経因性疼痛、後根神経節、神経ステロイド

1. 研究開始当初の背景
 外傷、手術、悪性腫瘍、感染症等様々な原因による神経障害は、しばしば難治性の神経因性疼痛を引き起こす。慢性化する過

剰な痛みは患者のQOLを低下させ、その原因疾患の治療に対しても悪影響を及ぼすため、その予防や治療は麻酔科医が担う大きな役割のひとつといえる。これらの痛みの詳細な発生機序は未解明であるが、一次知覚ニューロンの電氣的興奮性亢進を中心とした可塑的機能変化は重要な要因と考えられている。

ATP感受性Kイオン(K_{ATP})チャネルは細胞の代謝状態と細胞膜の興奮性を関連させる内向き整流性 K^+ チャネルであり、インスリン分泌促進薬および循環器疾患治療薬の標的として注目されている。 K_{ATP} チャネルは、チャネルのポアを形成するKir6.2とスルホニル尿素受容体(SUR)からなる異種八量体である。SURは薬剤の受容体として機能し、大きくSUR1(膵臓 β 細胞型)とSUR2(心血管系型)に分類され、それぞれに特異的な薬物感受性をKir6.2に与える。

K_{ATP} チャネルの薬理的抑制は、神経の細胞膜を脱分極させることにより神経を興奮させ、逆に神経興奮時における K_{ATP} チャネルの開口は、膜電位を静止状態(過分極)に維持し、発火頻度も減少させると考えられる。さらに、膜電位の過分極化は、電位依存性 Ca^{2+} チャネルを閉口(不活性化)させ、グルタミン酸などの神経興奮性伝達物質の放出を抑制すると考えられる。また、最終的なEnd-effectorは不明であるが、神経系の K_{ATP} チャネルの薬理的活性化は虚血・低酸素などの代謝性ストレスから神経細胞を保護する働きがある。これらの K_{ATP} チャネルの機能的役割は、痛覚伝導や神経因性疼痛の病態機序に関与する可能性がある。

2. 研究の目的

K_{ATP} チャネルを標的とする薬剤はすでに糖尿病、狭心症、および高血圧の治療薬として広く臨床使用されている。また、DRGを標的とした神経因性疼痛治療法は現時点では存在しないが、Dorsal root ganglion (DRG)に対する選択的薬物投与手技(透視下ブロック療法)は確立している。したがって、本研究によりDRG K_{ATP} チャネルの神経因性疼痛に対する有効性が証明されれば、臨床応用も早期に実現可能と考えられる。本研究課題では、ATP感受性 K^+ (K_{ATP})チャネルが一次知覚ニューロンに発現するかどうか、さらにその電気生理学的特徴を明らかにし、神経因性疼痛治療に対する標的となるかどうかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経因性疼痛モデルラットの作成

1992年にKimとChungによって報告された脊髄神経結紮損傷(spinal nerve ligation, SNL)モデルを基に作成した。

Sprague-Dawley系雄ラット(6週齢)をインフルラン(1.0-2.0%)麻酔下に第5および第6脊髄神経を6-0絹糸で結紮し、そのすぐ遠位側で切断する。

(2) 疼痛行動試験

ラット後肢を22G針で皮膚を貫通しない程度の強さで刺激(Pin刺激)すると、正常(反射的な逃避)あるいは痛覚過敏様行動(連続的に後肢を挙上し、振り回し、そして舐める)の2つの反応のいずれかが生じる。Pin刺激に対して痛覚過敏様行動が20%以上認められた場合、神経因性疼痛モデルラットとして使用する。

(3) 免疫組織染色

正常および神経因性疼痛モデルラットの一次知覚神経の神経節細胞における K_{ATP} チャネルの発現を免疫組織検査で検討した。 K_{ATP} のマーカーとして、抗SUR1, SUR2, Kir6.1, Kir6.2を使用した。正常および神経因性疼痛モデルで K_{ATP} チャネルの発現が変化するかどうかを検討した。

(4) 後根神経節細胞の単離

第5脊髄神経の後根神経節細胞を摘出し、酵素法を用いて細胞体を単離する。カバーガラス上で数時間培養し安定した状態で電気生理学的測定した。また、これまでの我々の報告から大型($A\beta$ 有髄神経に相当)後根神経節($> 40\mu\text{m}$)で測定を行った。

(5) 電気生理学試験

単離した後根神経節細胞はパッチクランプ法のInside-outモードを用いて、チャネル電流を測定した。Inside-outモードは膜の内側から直接薬剤を灌流することが可能で薬物の濃度依存性効果を測定するのに適している。各種薬剤(グリベンクラミド、トルブタミド、ジアゾキシド、ピナジジル、ニコランジル)の濃度依存性効果を測定し、解析ソフトPrism 4.0cで50%効果濃度を求め、正常と神経因性疼痛モデルとの値を比較検討した。 K_{ATP} チャネル電流はパッチ/微小電極増幅器とデータ取得装置により実験データとして記録した。

(6) In vivo疼痛試験

電気生理実験により求めた各種薬物感受性から薬物投与濃度を決定した。選択的な第5脊髄神経後根神経節への薬物投与法は浸透圧ポンプ(Alzet Osmotic Pump)を用いた持続投与(0.5 $\mu\text{l/h}$, 14day capacity)とする。薬物投与システムモデルは過去の報告(Anesthesiology 2006; 105: 146-53)に基づいて行った。後根神経節はその他の神経組織よりも皮膜構造が弱くこのシステムで

選択的に標的の後根神経節へ薬物を浸透させることが可能と考えられる。薬物投与は14日間とし、その間1回/日各種疼痛閾値を測定し、薬剤の鎮痛効果および効果発現時期を検討する。

(7) 神経ステロイドの測定

疼痛評価後（手術後14日）、各群のラット腰部脊髄組織を摘出・ホモジネートし、神経ステロイドの抽出を行った。定量評価はELISA法で行った。神経ステロイドの中でも、GABA作動性であるアロプレグナロンについて検討した。

4. 研究成果

(1) K_{ATP} チャンネルの分布

ラット後根神経節に対して免疫組織染色法を行い、DRGの細胞膜上にはSUR1, SUR2, およびKir6.2が発現することを示した。また、これらのサブユニットは、大型（直径40 μm ）でNF200陽性の有髄神経、つまりA β 線維に相当する神経に優位に発現していた。さらに、 K_{ATP} チャンネルの発現は、細胞膜上だけでなく、核膜と軸索にも同様に認められた。軸索の K_{ATP} チャンネルの発現パターンはジョウロ型で点状に存在し、電子顕微鏡を用いた検討ではSchmidt-Lanterman切痕（SLI）に一致した部位に選択的に発現していることが示されていた。SLIは末梢神経の髄鞘にみられる斜めの切れ込み様構造で、髄鞘を形成している細胞膜の間にSchwann細胞の細胞質が帯状に残ったものと考えられている。SLIの生理的役割は明らかとされておらず、SLIに発現する K_{ATP} チャンネルがどのような生理的機能を有するか現時点では分からない。しかし、細胞膜に存在する K_{ATP} チャンネルは、膜電位を規定し神経の興奮性を制御することにより疼痛機序に関与すると考えられる。

(2) K_{ATP} チャンネルの電気生理学的特徴

K_{ATP} チャンネル電流特性は、細胞内ATP濃度（ $[\text{ATP}]_i$ ）に対する感受性と薬理的性質により特徴づけられる。単離脊髄後角神経節細胞に対してパッチクランプ法を用いて細胞膜の K_{ATP} チャンネル活性を解析すると、Cell-attached法で膜電位非依存性に単一チャンネルコンダクタンスが約70pS前後（Kir6.2の特性と一致）の自発的 K^+ チャンネル電流が記録され、これらは K_{ATP} チャンネルの特異的拮抗薬であるGlibenclamide（1 μM ）で抑制された。Inside-out法では、種々の濃度のATPに対して濃度依存性に抑制されるATP感受性の K^+ チャンネル電流（50%抑制濃度：15-25 μM ）が記録された。さらにこの電流は、SUR1選択性KCOのDiazoxideで活性化されるが、SUR2選択性 K_{ATP} チャンネル開口薬のPinacidilに対しては感受性が低かった。つ

まり、脊髄後角神経節細胞にはSUR1とSUR2の両者が存在するが、薬理活性があるのはSUR1であることが示された。

(3) 疼痛モデルでの発現変化

SNLラットでは、正常ラットと比較して一次感覚神経のSUR1サブユニットの発現が有意に減少した。その減少の程度は発現する部位により異なり、軸索（SLI）が最も大きく、次いで細胞膜、核膜の順であった。しかし、 K_{ATP} チャンネルの構成サブユニット（SUR1/Kir6.2）は、部位に関係なく変化はなかった。また、電子顕微鏡での解析では、SLIの切痕間隙の幅が、SNLラットで有意に狭小化することが示された。 K_{ATP} チャンネルの発現低下とSLIの構造的変化が関連するのか、そしてこれらの変化がどのように神経因性疼痛の病態機序に関与するのか、今後さらなる検討が必要である。

(4) 疼痛モデルでの電気生理学的変化

SNL手術後（10-14日）、足底に対してピン刺激（23Gスパイナル針）を加えると痛覚過敏行動（後肢を挙げたままホールドする、振り回す、舐める）を起こすラット（刺激回数に対して20%以上：SNL responder）と起こさないラット（20%未満：SNL non-responder）に分類できる。SNL non-responderは、SNL手術後約20-30%のラットで認められた。パッチクランプのCell-attached法で記録される脊髄後角神経節細胞における K_{ATP} チャンネルの自発的開口に関して、正常DRGと比較してSNL non-responderでは開口率に変化は認めないが、SNL responderでは有意に低下していた。また、脊髄後角神経節細胞における K_{ATP} チャンネルの開口率は、ピン刺激に対する痛覚過敏行動の発生頻度と強い逆相関が認められた。これらの結果から、SNL後の K_{ATP} チャンネル活性の低下は、神経因性疼痛モデルラットの痛覚過敏に関与すると考えられる。

(5) 神経ステロイド

脳および脊髄のアロプレグナロン濃度は対照群と比較してSNL群有意に増加した。しかし、脊髄アロプレグナロン濃度の増加は、痛覚過敏様反応が強いほど少なかった（ $R^2 = 0.68$, slope = -0.18; $p < 0.0001$ ）。一方、脳アロプレグナロン濃度は痛覚過敏反応との相関性は認めなかった（ $R^2 = 0.06$, slope = 0.08; $p = 0.81$ ）。血清中のアロプレグナロン濃度はSNL手術により有意な変化は認められなかった（ $R^2 = 0.01$, slope = -0.005; $p = 0.84$ ）。これらの結果は、脊髄で産生されるアロプレグナロンが痛覚過敏様行動に関連することが示唆している。さらに、アロプレグナロンのくも膜下投与によ

り濃度依存性の抗痛覚過敏効果が認められた。神経障害後の脊髄アロプレグナノロンの分泌不全は神経障害性疼痛の病態機序に関与すると考えられた。さらに、外因性アロプレグナノロンの脊髄くも膜下腔内投与は神経障害性疼痛モデル動物の痛覚過敏行動を抑制する可能性が示唆された。現時点でアロプレグナノロンがどのような機序で鎮痛作用を発揮するかは不明であり、 K_{ATP} チャンネルとの関連も明らかとはなっていない。今後、アロプレグナノロンと K_{ATP} チャンネル活性変化が関連するかどうか検討する必要がある。

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4件)

- ① Kawano T, Functional roles of ATP-sensitive potassium channel as related to anesthesia, *Journal of anesthesia*, (査読無)、26、2012、152-155
- ② Kawano T, et al. (計6名中の1番目)、The involvement of the neurosteroid allopregnanolone in the antihyperalgesic effect of paroxetine in a rat model of neuropathic pain, *Neuroreport*, (査読有)、22、2012、984-988
- ③ Kawano T, Tanaka K, *et al.* (計8名中の1番目)、Effects of ketamine on nicorandil induced ATP-sensitive potassium channel activity in cell line derived from rat aortic smooth muscle, *J Med Invest*, (査読有)、57、2011、237-244
- ④ Tanaka K, Kawano T, *et al.* (計8名中の1番目)、Differential effects of propofol and isoflurane on glucose utilization and insulin secretion, *Life Sci*, (査読有)、88、2011、96-103

[学会発表] (計2件)

- ① 河野 崇、JA シンポジウム：ATP感受性Kチャンネル制御の電気生理学的解析、日本麻酔科学会第58回学術集会、2011年5月19日、神戸ポートピアホテル (兵庫県)
- ② 河野 崇、招請講演9：痛覚過敏の行動学的・電気生理学的検討、日本臨床麻酔科学会第30回大会、2010年11月6日、徳島グランヴィリオホテル (徳島県)

[図書] (計2件)

- ① Kawano T, In Tech, Patch Clamp Technique: Chapter 4, Single-Channel Properties and Pharmacological

Characteristics of K_{ATP} Channels in Primary Afferent Neurons、2012、73 - 90

- ② 河野 崇、大下 修造、技術情報協会、慢性疼痛における薬剤選定と治療薬開発、第3部 第1章 有望な鎮痛カスケードの開発動向 第17節 K^+ チャンネルオプナー、2010、383-393

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河野 崇 (KAWANO TAKASHI)

高知大学・教育研究部医療学系・講師

研究者番号：40380076