

平成 27 年 5 月 21 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791979

研究課題名(和文) ミクログリアのイオンチャンネルを基盤とした慢性疼痛の新規評価法とその応用による創薬

研究課題名(英文) Novel role of microglial BK channels on chronic pain

研究代表者

林 良憲 (Hayashi, Yoshinori)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：80582717

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)：オピオイドの頻用によって生じる疼痛過敏がミクログリアに発現するBKチャンネルに起因する事が明らかとなった。これらのBKチャンネルの活性化は μ 受容体を介したアラキドン酸合成が促進される事で引き起こされており、直接チャンネルを開口していた。BKチャンネルの役割を解析した結果、疼痛に重要とされるP2X4受容体の膜輸送への関与が認められた。更にミクログリアでBKチャンネルの欠損した動物ではオピオイドの頻用により生じる疼痛過敏は認められなかった。これらの知見によりBKチャンネル阻害剤のオピオイドの補助薬としての開発の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have found that BK channels in the spinal microglia contribute to the initiation of neuropathic pain. In the present study, we have examined a possible involvement of microglial BK channels in opioid-induced hyperalgesia (MIH), because some evidence suggests the involvement of microglia in this event. Repeated morphine administration gradually enhanced pain sensitivity. At the same time, repeated morphine administration activated BK channels in microglia, but not in neuron, by generation of arachidonic acid and its metabolites through μ receptors. MIH was significantly suppressed by BK channel inhibitor. The development of hyperalgesia was accelerated by intrathecal administration of morphine-primed wild-type, but not BK channel-deficient, microglia. Furthermore, the activation of BK channels promoted P2X4 receptor trafficking to the cell surface of microglia. These results indicate that BK channels in the spinal microglia also play an important role in the development of MIH.

研究分野：神経薬理学

キーワード：ミクログリア BKチャンネル モルヒネ 痛覚過敏

1. 研究開始当初の背景

「警告系」としての痛みは、本来生体の危険回避に不可欠なものである一方で、痛みの原因が除去されたにも関わらず、慢性的に持続する痛みが存在する。神経障害性疼痛がその代表例であるが、モルヒネのような既存の鎮痛薬が奏功せず、根本的な治療薬が確立されていない事から 2000 万人以上の患者が疼痛に苦しんでいる。口腔領域においても、慢性疼痛は非常に深刻な問題を有している。食事などの単純な日常生活にさえ支障をきたす事から、重篤な摂食障害の一因となっている。更には精神的にも多大な影響をもたらすため、生活の質を著しく低下させている。そのため、口腔から発信する全身のヘルスケアマネージメントの観点から、『痛みの除去』は社会的に緊急を要する課題と考えられる。

2. 研究の目的

慢性疼痛において、中枢の免疫担当細胞であるミクログリアが脊髄の痛み伝達に極めて重要な役割を果たす事が明らかになっているものの、どのようにしてミクログリアに異常が生じるのか、また異常をきたしたミクログリアがどのように神経伝達に影響し、慢性疼痛を惹起するのか詳細なメカニズムは不明な点が多い。そこで本研究ではミクログリアにおけるどのような異常が慢性疼痛をもたらすのかそのメカニズムに関して明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

これまで、我々は病態動物におけるミクログリアの機能をダイレクトに観察できる測定系を確立してきた。本技術により病態時におけるミクログリアでは Ca^{2+} 活性化型 K^+ チャンネル (BK チャンネル) の機能が著しく亢進していること、更に、これらの抑制により強力な鎮痛効果が得られることを発見

してきた。本技術を用いてミクログリアを活性化させる物質のスクリーニングを行った。

疼痛の測定は von Frey フィラメントによる機械刺激および Hotplate による侵害熱刺激により行った。

4. 研究成果

BK チャンネルを指標にミクログリアの活性化物質をスクリーニングしたところ、予想に反して、強力な鎮痛薬であるモルヒネが非常にミクログリアの BK チャンネルを活性化させることが明らかとなった。モルヒネは連続使用により疼痛過敏を惹起させることが臨床的にも報告されている。モルヒネのような強力な鎮痛薬が奏功しない難治性疼痛の解明の一端となる可能性があることからモルヒネによる痛み発症メカニズムを検討した。

BK チャンネルは神経系にも非常に多く発現しているため、神経における BK チャンネルの機能を解析したが、モルヒネ投与により変化は認められなかった。行動学的にモルヒネ疼痛過敏を解析したところ、BK チャンネル阻害剤の脊髄腔内投与により疼痛過敏の改善が認められ、一方で BK チャンネル活性化剤により疼痛過敏の増悪が認められた。

ミクログリア BK チャンネルの特異性を解析するため、初代培養ミクログリアを作成し、モルヒネで刺激後に正常動物の脊髄腔内へと移植した。モルヒネ刺激ミクログリア移植群ではモルヒネ疼痛過敏の形成促進が見られた一方で、BK チャンネル阻害剤存在下でモルヒネ刺激したミクログリアを移植した群ではモルヒネ疼痛過敏の形成促進は消失した。また、BK チャンネル欠損ミクログリアをモルヒネ刺激し脊髄腔内へと移植した群でも疼痛過敏の形成促進は消失した。

モルヒネによるミクログリア BK チャンネル活性化メカニズムを解析したところ、 μ 受容体を介した PLA2 の活性化により生じるアラ

キドン酸およびその代謝産物が直接 BK チャネルに結合し、チャネルの開口を促していた。また、PLA2 阻害剤の脊髄腔内投与によりモルヒネ疼痛過敏は有意に抑制された。更に、モルヒネにより増強される一次知覚神経から脊髄後角第 1 層神経への入力も PLA2 阻害剤あるいは BK チャネル阻害剤により改善が認められた。

疼痛時においてミクログリア P2X4 受容体の重要性が提唱されている。そこで BK チャネルとの相関を検討した。モルヒネによりミクログリアで P2X4 受容体を介した電流応答が顕著に増加する一方で BK チャネル阻害剤によりこれらの反応は有意に抑制された。更に細胞膜表面に発現する P2X4 受容体のタンパク量を測定したところモルヒネ処置により増加する P2X4 受容体は BK チャネル存在下で有意に抑制され、電流応答と同様の結果となった。

以上の結果より、ミクログリア BK チャネルが鎮痛薬開発の優れたターゲットになる可能性が示唆された。

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 12 件)

- (1) Liu X, Wu Z, Hayashi Y, Nakanishi H. Age-Dependent Neuroinflammatory Responses and Deficits in Long-Term Potentiation in the Hippocampus During Systemic Inflammation. *Neuroscience*. 2012:133-142.
- (2) Sun L, Wu Z, Hayashi Y, Peters C, Tsuda M, Inoue K, Nakanishi H. Microglial Cathepsin B Contributes to the Initiation of Peripheral Inflammation Induced Chronic Pain. *Journal of Neuroscience*. 2012:11330-11342.
- (3) Hayashi Y, Nakanishi H. BK+ Channels Contributes to the Cellular Activation of Microglia: A big Channel

in Small Glia. In: *Glial Cells: Embrionic Development, Types/Functions and Role in Disease* (Eds: Kaur C & Eng Ang L) Nova Science Publisher Inc., New York, pp. 167-176, 2013.

- (4) Wu Z, Sun L, Hashioka S, Yu S, Schwab C, Okada R, Hayashi Y, McGeer PL, Nakanishi H. Differential pathways for the interleukin-1beta production activated by chromogranin A and amyloid-beta in microglia. *Neurobiology of Aging*. 2013:2715-2725.
- (5) Takayama F, Wu Z, Ma HM, Okada R, Hayashi Y, Nakanishi H. Possible involvement of aiPLA2 in the phosphatidylserine-containing liposomes induced production of PGE2 and PGD2 in microglia *Journal of Neuroimmunology*. 2013: 121-124.
- (6) Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Takayama F, Okada R, Wu Z, Ohdo S, Nakanishi H. Diurnal spatial reorganization of Microglial Processes through the rhythmic expression of P2Y12 receptors. *Journal of Neurological Disorders*. 1:121, 2013 doi: 10.4172/2329-6895.1000120
- (7) Hayashi Y, Koyanagi S, Kusunose N, Okada R, Wu Z, Tozaki-Saitoh H, Ukai K, Kohsaka S, Inoue K, Ohdo S, Nakanishi H. The intrinsic microglial molecular clock controls synaptic strength via the circadian expression of cathepsin S. *Scientific Reports* 1: 2, 2013
- (8) 林 良憲, 中西 博 NMDA レセプターとミクログリア: ミクログリアのシナプス可塑性ならびにシナプス再編への関与 特集: NMDA レセプター神経疾患の分子病態を探る 日本神経精神薬理学雑誌 33: 211-216, 2013

(9) 林 良憲、中西 博 見えてきた
ミクログリア突起の動きと働きー注
目されるミクログリアのシナプス再
編における役割 日薬理誌 142:
231-235, 2013

(10) Hayashi Y, Wu Z, Nakanishi H. A
Possible Link between Microglial
Process Dysfunction and
Neuropsychiatric Disorders. *Journal of
Neurological Disorder & Stroke*. 2(3):
1060 (2014)

(11) Zhang X¹, Wu Z¹, Hayashi Y¹,
Okada R, Nakanishi H. (¹: co-first
author) Peripheral Role of Cathepsin S in
Th1 Cell-Dependent Transition of Nerve
Injury-Induced Acute Pain to a Chronic
Pain State. *Journal of
Neuroscience*. 2014:3013-3022.

(12) Hayashi Y*, Koga Y, Zhang X,
Peters C, Yanagawa Y, Wu Z,
Yokoyama T, Nakanishi H*. (*: co-
correspondence) Autophagy in
superficial spinal dorsal horn accelerates
the cathepsin B-dependent morphine
antinociceptive tolerance.
Neuroscience. 2014:384-394.

〔学会発表〕(計 18 件)

(1) Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi,
Naoki Kusunose, Shigehiro Ohdo, Hiroshi
Nakanishi. Active Regulation of Synaptic
Strength by the Circadian Rhythmicity through
the Microglial P2Y Receptor. Prine2012
2012/05/31-06/02 (福岡)

(2) 中西 博, 林 良憲, NMDA レセプター
とミクログリア, CINP・NP2012 合同年
会, シンポジウム: NMDA レセプター
神経疾患の分子病態を探る, 2012/10/20
(宇都宮)

(3) 林 良憲, 武 洲、中西 博 ミクログ
リア時計遺伝子による神経活動の調節の解

明 第 54 回 歯科基礎医学学会 学術大会
2012/09/14-16 (郡山)

(4) Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi,
Naoki Kusunose, Zhou Wu, Kazuhide Inoue,
Shigehiro Ohdo, Hiroshi Nakanishi. Microglial
circadian rhythmicity control synaptic activity
through daily oscillation of P2Y12 receptor
and cathepsin S expression. The 55 th annual
meeting of the Japanese Society for
Neurochemistry 2012/9/30~10/2 (神戸)

(5) 林 良憲、中西 博 新規鎮痛標的分子
としてのミクログリア Ca²⁺活性型 K⁺チャ
ネルの特性 生理学研究所研究会『痛み研究
の新たな展開』2012/12/13-14 (岡崎)

(6) Xinwen Zhang, Yoshinori Hayashi, Zhou
Wu, Ryo Okada, Hiroshi Nakanishi. Cathepsin
S-mediated monocyte/macrophage infiltration
in the spinal cord exacerbate chronic pain. 第
86 回日本薬理学会年会 2013/03/21~23 (福
岡)

(7) Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi.
Regulation of microglia-synapse interactions
and synaptic strength by microglial circadian
clock. 第 86 回日本薬理学会年会
2013/03/21~23 シンポジウム(シナプス再
編におけるグリア細胞の役割: グリア研究
の新潮流)(福岡)

(8) 林 良憲、岡田 亮、武 洲、中西 博
ミクログリアにおけるカテプシン S の発現
リズムによるシナプス強度の調節 第 55 回
歯科基礎医学会学術大会 2013/09/20-22
(岡山)

(9) 林 良憲、小柳 悟、楠瀬直喜、岡田
亮、武 洲、斉藤秀俊、大戸茂弘、高坂新
一、井上和秀、中西 博 ミクログリア内在
性分子時計はカテプシン S 発現リズムを介
して大脳皮質ニューロンのシナプス活動を
調節する 第 18 回グリア研究会 2013 年 10
月 26 日(仙台)

(10) Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi.

Novel analgesic mechanism of S-ketamine on the neuropathic pain through the microglial Ca²⁺-activated K⁺ channel. Neuroscience 2013 2013/11/9-13 (San Diego)

(11) 林 良憲 ミクログリア内在性分子時計による大脳皮質ニューロンのシナプス活動の調節機構 第4回福岡薬理生理研究会 2013/12/12 (福岡)

(12) Yoshinori Hayashi, Satoru Koyanagi, Naoki Kusunose, Ryo Okada, Zhou Wu, Hidetoshi Tozaki-Saitoh, Shinichi Kohsaka, Kazuhide Inoue, Shigehiro Ohdo, Hiroshi Nakanishi. Regulation of synaptic strength are controlled by circadian rhythm of cathepsin S expression in the microglia. 第87回日本薬理学会年会 2014/03/19-21 (仙台)

(13) 林 良憲 BK チャネルを介した疼痛制御機構の解明 第56回歯科基礎医学会学術大会 2014/09/25-27 (福岡)

(14) 高山扶美子、林 良憲、武 洲、中西博 ミクログリアの2種類の突起の日内変化に関する形態学的ならびに生体イメージング解析 第56回歯科基礎医学会学術大会 2014/09/25-27 (福岡)

(15) 林 良憲、中西 博 ミクログリアBKチャネルを介したモルヒネ鎮痛耐性及び痛覚過敏メカニズム解明 第67回日本薬理学会西南部会 2014/11/23 (北九州)

(16) 林 良憲、中西 博 ミクログリアBKチャネルを介したモルヒネ鎮痛耐性及び痛覚過敏メカニズム解明 第19回グリア研究会 2014/12/06 (東京)

(17) 林 良憲、中西 博 ミクログリアBKチャネルを介したモルヒネ鎮痛耐性及び痛覚過敏メカニズム解明 生理学研究所 研究会 「痛みと痛覚情動連関の神経機構」 2014/12/10-11 (岡崎)

(18) Yoshinori Hayashi, Hiroshi Nakanishi. A big channel in small glia as a promising molecular target for the treatment of

opioid-induced hyperalgesia. 第120回日本解剖学会総会・全国学術集会、第92回日本生理学会大会 合同大会 シンポジウム 「生理学・解剖学の視点から探る脳内環境」

(神戸)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.dent.kyushu-u.ac.jp/koza/koku_jotai_seigyoku/koku_kinou_bunshi/kenkyu_gaiyo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 良憲 (HAYASHI YOSHINORI)

九州大学・大学院歯学研究院・助教

研究者番号: 80582717

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし