

学位論文内容要旨

氏名： 尾山 実砂

題目：抑制性増強による慢性疼痛緩解メカニズムの薬理学的研究

背景・目的：

「急性痛」は、生体に危険信号を伝える役割として重要であるが、「慢性痛」は不眠や鬱症状を併発することがあり、患者の QOL を低下させるため積極的治療を要する疾患である。痛み刺激は、末梢の侵害受容器から一次求心性神経を介して脊髄後角へ入力後、上位中枢へ伝達されて痛みとして認識される。また、脊髄後角は末梢からの入力の他、脳幹からは下行性疼痛抑制系の投射、さらに脊髄固有の興奮性あるいは抑制性介在神経が存在する (Fig. 1)。よって、脊髄後角で痛みシグナルを制御することは鎮痛を得る上で重要である。神経障害性疼痛など慢性疼痛の病態では、末梢性感作の他、興奮性伝達の増強や抑制性入力の減弱(脱抑制)などの中枢性感作が引き起こされ、脊髄後角で興奮性入力が増強された状態が持続する。このため、脊髄後角において、抑制性入力を増強して興奮性入力と抑制性入力のバランスを是正することは新規鎮痛薬開発の重要な戦略となり得る。

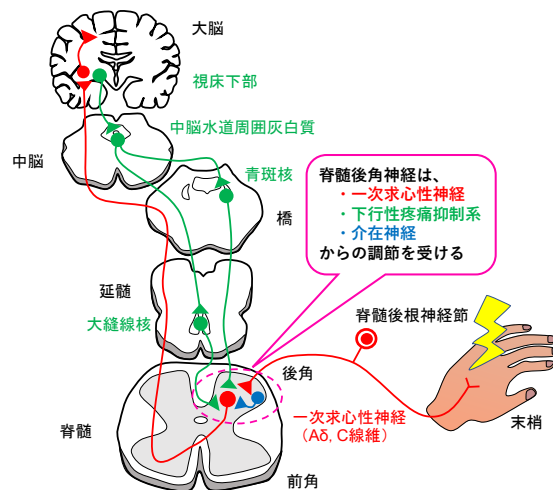


Fig. 1 脊髄後角における痛み調節機構

本研究では、「抑制性の増強による鎮痛作用獲得」をテーマとして、3つのターゲット分子が関わる鎮痛メカニズム解明に取り組んだ。まず、抑制性神経伝達物質の glycine や GABA の再取り込みを担う glycine transporter (GlyT) や GABA transporter (GAT) に焦点を当てた。GlyT や GAT の阻害薬は動物モデルで鎮痛作用を示すことが報告されているが、脊髄後角におけるシナプスレベルでの鎮痛作用は未解明であったため、電気生理学的に解析を行なった。さらに、神経障害性疼痛治療薬の第一選択薬である電位依存性 Ca^{2+} チャンネル $\alpha_2\delta$ サブユニットリガンドのガバペンチノイドにも着目した。Gabapentin や pregabalin などのガバペンチノイドは、一次求心性神経終末からの神経伝達物質の遊離抑制作用の他、ノルアドレナリン性下行性疼痛抑制系の活性化による

鎮痛作用を示す。2019 年 4 月に発売された新規ガバペンチノイドである mirogabalin besylate (以下、mirogabalin)の鎮痛作用機序にも $\alpha_2\delta$ サブユニットとノルアドレナリン性下行性疼痛抑制系が関与するかを行動薬理的に解析した。

方法：

<電気生理学実験>

標本作製

5-7 週齢の ddY 系雄性マウスの脊髄を麻酔下に取り出し、腰髄 L4-L6 の後根を付けた横断スライス(厚さ 450 μm)もしくは後根を除去したスライス(厚さ 300 μm)を作製した。1 時間のインキュベーション後、whole-cell 記録に用いた。

Whole-cell patch-clamp 法

近赤外微分干渉顕微鏡で視認下、膠様質の細胞から whole-cell 電流を膜電位を -70 mV に固定して記録した(Fig. 2A)。Glycine 性抑制性シナプス後電流(inhibitory postsynaptic currents; IPSCs)は、灌流する人工脳脊髄液に non-NMDA 型グルタミン酸受容体阻害薬 CNQX (10 μM)と GABA_A 受容体阻害薬 bicuculline (10 μM)を加えた条件下に、また、GABA 性 IPSCs は、CNQX (10 μM)と strychnine 感受性 glycine 受容体阻害薬 strychnine (0.5 μM)存在下にそれぞれ記録した。記録細胞の近傍を 0.1 Hz で電気刺激して、刺激誘発性の興奮性シナプス後電流(evoked excitatory postsynaptic currents; eEPSCs)あるいは evoked IPSCs (eIPSCs)を得た(Fig. 2B)。一方、微小の抑制性もしくは興奮性シナプス後電流(miniature IPSCs; mIPSCs もしくは miniature

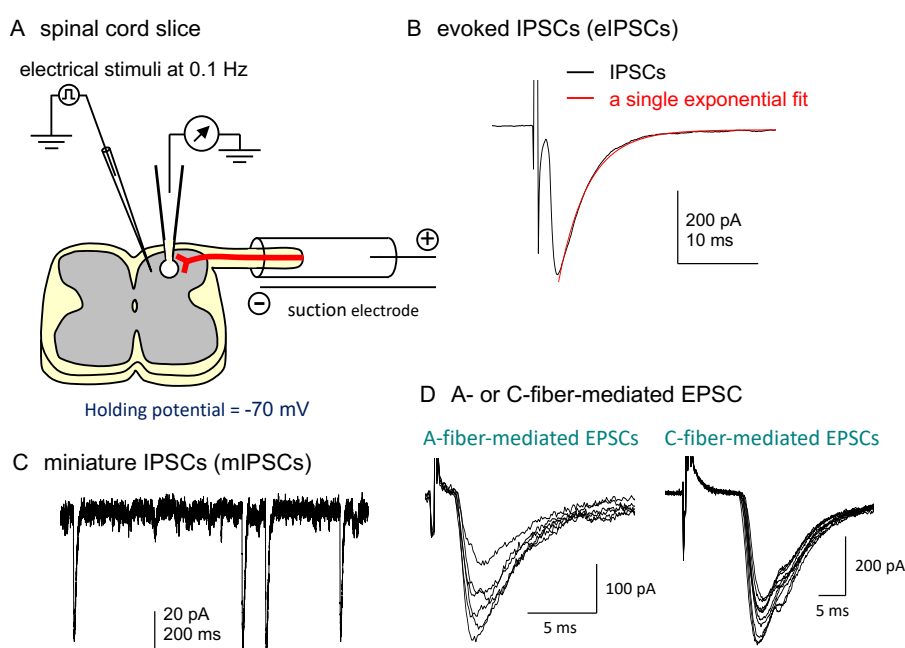


Fig. 2 脊髄後角膠様質神経細胞からのシナプス電流記録

EPSCs; mEPSCs)は、Na⁺チャネル阻害薬 tetrodotoxin (TTX, 0.5 μ M)存在下に記録した(Fig. 2C)。IPSCs を記録した際は、電流減衰過程を一次指数関数で近似して時定数 τ を求めた。さらに、後根付き脊髄スライスの後根を 0.1Hz で電気刺激して、単シナプス性の A δ -線維由来の A-fiber-mediated EPSCs もしくは C-線維由来の C-fiber-mediated EPSCs を誘発した(Fig. 2D)。

<行動実験>

神経障害性疼痛モデルの作製方法(Partial sciatic nerve ligation; PSNL)

4-5 週齢の ddY 系雄性マウスを麻酔後、露出させた坐骨神経を 1/2~1/3 部分結紮した。術後 6-8 日後に行動実験に用いた。

疼痛評価試験

①熱痛覚過敏の評価

後肢足底に下から赤外線熱刺激を与えた時にマウスが逃避行動を示すまでの時間(paw withdrawal latencies, PWLs)を測定した。傷害後に PWL が 5 秒未満を示すものを行動実験に用いた。

②機械的アロディニアの評価

強度の異なる von Frey filaments をマウスの足底に下から垂直に当て、疼痛閾値を測定した。50%反応閾値が 0.1 g 未満を示したものを機械的アロディニアが起きている状態とした。

結果・考察：

研究 1. 脊髄後角における glycine transporter (GlyT)阻害薬が glycine 性シナプス伝達 IPSCs に与える影響の電気生理学的解析

GlyT には GlyT1 と GlyT2 の 2 つのサブタイプがあり、GlyT1 はグルタミン酸性興奮性神経終末やアストロサイトに、GlyT2 は glycine 性抑制性神経終末にそれぞれ存在する。GlyT1 及び GlyT2 は、glycine の再取り込みを行うことで、細胞外の glycine 濃度を調節する(Fig. 3)。GlyT 阻害薬の鎮痛作用の脊髄後角におけるシナプスメカニズムを解

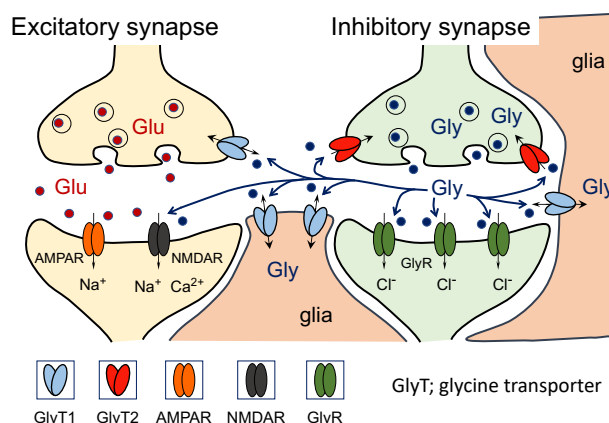


Fig. 3 GlyT を介した glycine の取り込み

明するため、本研究では glycine 性 IPSCs に対して、GlyT1 阻害薬 NFPS と GlyT2 阻害薬 ALX-1393 が与える影響を調べた。

NFPS と ALX-1393 はいずれも mIPSCs の振幅には影響せずに保持電流を大きく変化させ、CsCl を主な成分とする記録電極内液で内向き電流を誘発した(Fig. 4A, B)。この内向き電流は strychnine で消失した。ALX-1393 は、mIPSCs の頻度も増加させた。また、NFPS と ALX-1393 は eIPSCs の振幅には影響せずに時定数を増加、すなわちシナプス電流の減衰過程を延長させた(Fig. 4C, D)。これらの結果から、シナプス性の phasic な glycine 電流(シナプスの前終末から放出された glycine がシナプス後膜の glycine 受容体を活性化させて流れる電流)とシナプス外性を反映する tonic な glycine 電流(持続性保持電流に反映する電流)を増加させることで抑制性の影響を増加させることが GlyT 阻害薬の鎮痛作用に寄与すると考えられる。

さらに、GlyT2 は glycine 性シナプス終末への glycine の供給を担うため、長期間の阻害で glycine 性シナプス伝達が維持されない可能性がある。「長期間に起こり得る glycine 性シナプス伝達」を *in vitro* 実験で模倣するために、glycine 性シナプス伝達を高頻度で誘発した。高頻度刺激後の eIPSCs は、ALX-1393 存在下では大幅に減少したが、NFPS 存在下では減少せずに維持された。すなわち、本結果は、GlyT1 阻害薬は長期使用でも glycine 性シナプス伝達が損なわれないことを強く示唆している

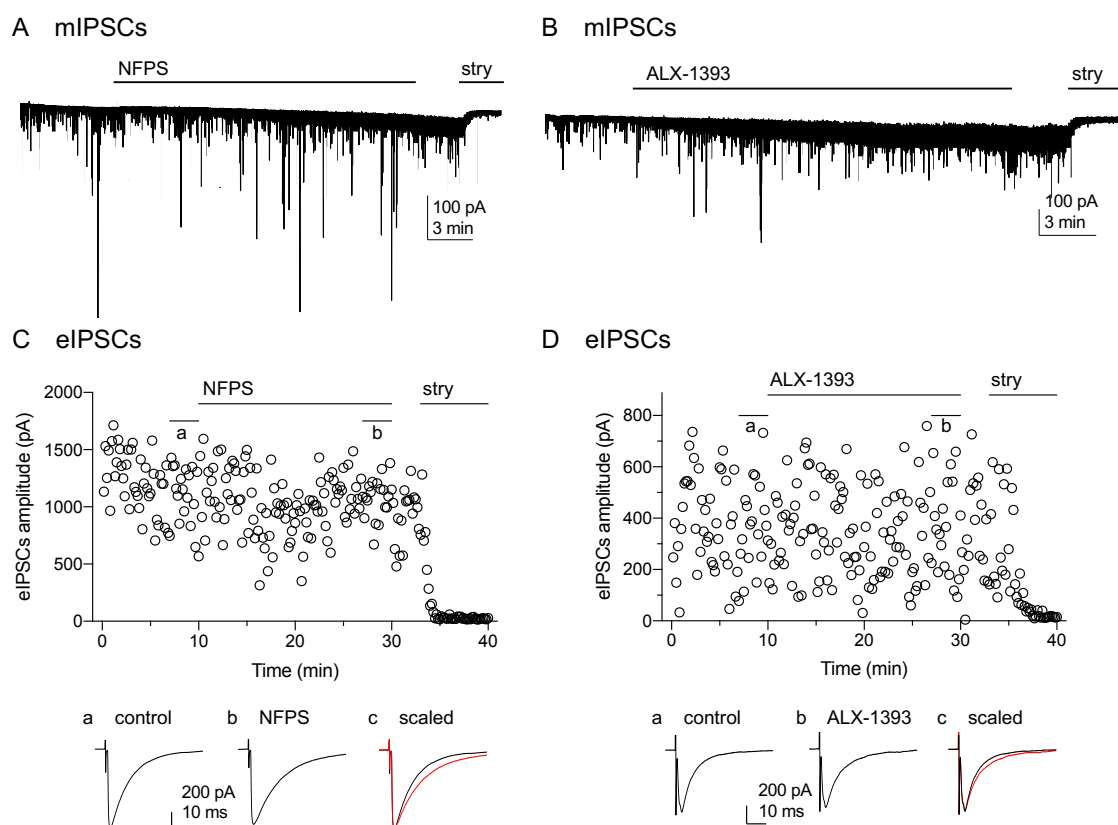


Fig. 4 GlyT 阻害薬の mIPSCs 及び eIPSCs に対する作用

研究 2. GABA transporter (GAT)阻害薬の鎮痛作用メカニズムの電気生理学的及び行動薬理学的解析

GAT の 4 つのサブタイプの内、脊髄内に局在する GAT1 と GAT3 に着目した。GAT1 は GABA 性神経終末とアストロサイト、GAT3 はアストロサイトにそれぞれ存在し、細胞外の GABA の濃度調節を担う(Fig. 5)。GAT 阻害薬が疼痛モデル動物で鎮痛作用を示すことは報告されていたが、シナプスレベルの鎮痛作用メカニズムは未解明であった。

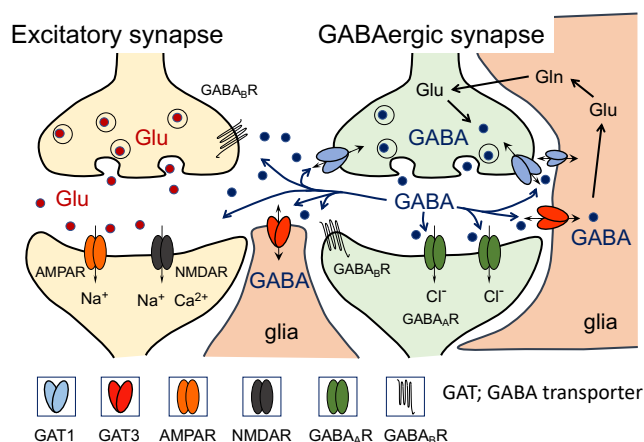


Fig. 5 GAT を介した GABA の取り込み

まず、GAT 阻害薬が脊髄後角神経の GABA 性抑制性シナプス伝達に与える影響を検討した。その結果、GAT1 阻害薬 NNC-711 及び GAT3 阻害薬 SNAP-5114 は、GABA 性 mIPSCs の振幅を増加させず、むしろ頻度を減少させた。また、NNC-711 は mIPSCs と eIPSCs の振幅も抑制した。次に、興奮性シナプス伝達に与える影響について検討した。すると、NNC-711 は、mEPSCs の頻度を大きく抑制し、これは GABA_A 受容体アンタゴニストの bicuculline では変化しなかったが GABA_B 受容体アンタゴニストの CGP55845 により完全に拮抗された(Fig. 6)。一方、SNAP-5114 は mEPSCs に影響を与えなかった。さらに、一次求心性神経終末からの興奮性伝達への影響を検討するため、後根付き脊髄スライス標本を作製して A-fiber-mediated EPSCs もしくは C-fiber-mediated EPSCs に対する NNC-711 及び SNAP-5114 の効果を検討した。NNC-711 は A-fiber-mediated EPSCs には影響せず C-fiber-mediated EPSCs を抑制し(Fig. 7A, B)、SNAP-5114 は A-及び C-fiber-mediated EPSCs の両者を抑制した

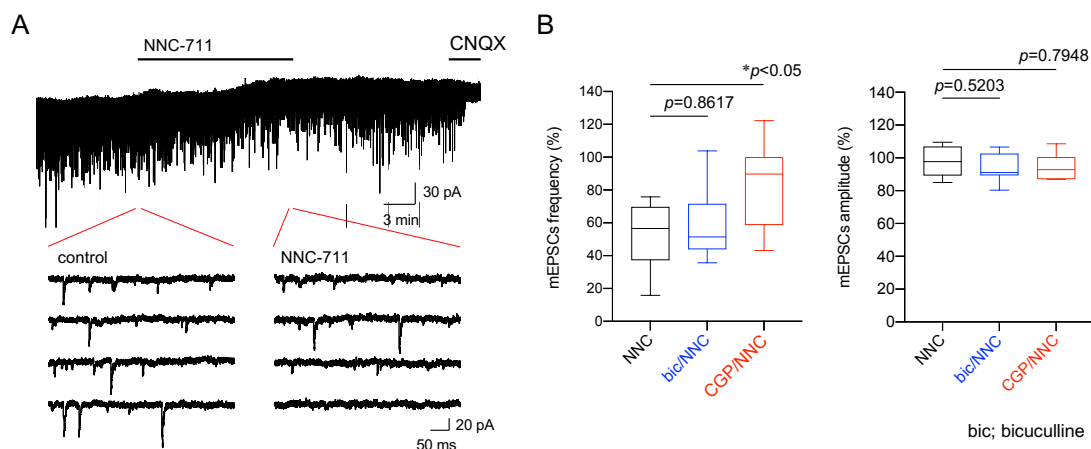


Fig. 6 NNC-711 の mEPSCs に対する GABA_B 受容体を介した作用

(Fig. 7C, D)。これらの抑制作用は、CGP55845 存在下では見られなかった。よって、GAT1 と GAT3 いずれを阻害しても GABA 性の抑制性神経伝達を増強するのではなく、GAT 阻害により増加した内在性の GABA が興奮性神経終末の GABA_B 受容体へ作用することでグルタミン酸の放出を抑制して興奮性伝達を抑制することが GAT 阻害の鎮痛作用へ寄与していることが強く示唆された。その上、GAT1 阻害では興奮性介在神経由来の興奮性伝達を抑制し、GAT3 阻害では一次求心性神経由来の興奮性伝達を抑制するという同じ GAT 阻害薬でも阻害するアイソフォームにより異なるメカニズムを有することが判明した。

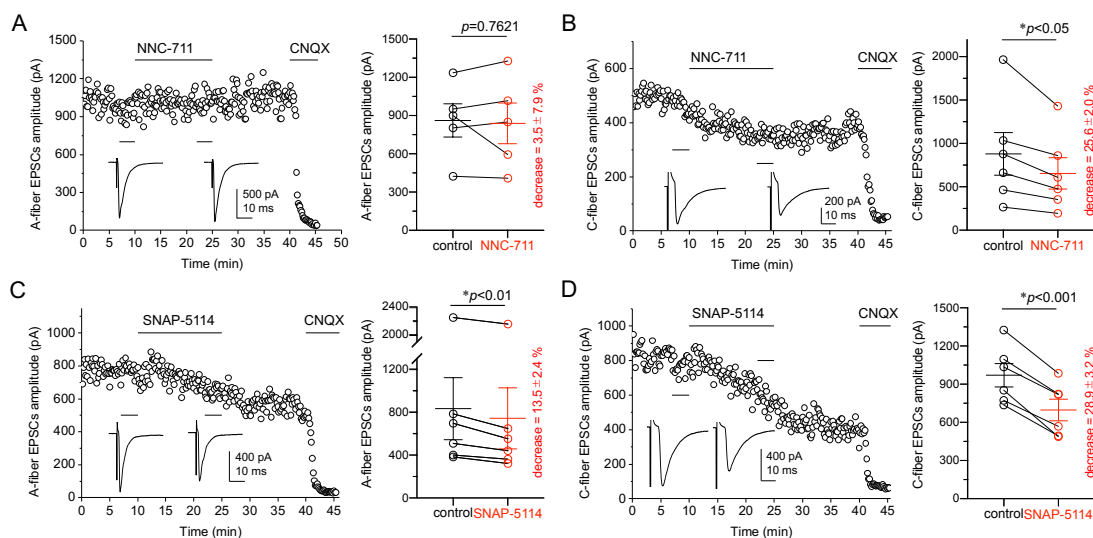


Fig. 7 一次求心性神経由来の単シナプス性興奮性伝達に対する GAT 阻害薬の作用

本研究では、PSNL モデルを用いた行動実験も実施し、脊髄髄腔内に投与した NNC-711 及び SNAP-5114 が抗アロディニア効果を示し、これらは CGP55845 の前投与により消失することが明らかになった(Fig. 8)。すなわち、電気生理学実験で得られたシナプスメカニズムを行動実験にフィードバックして実証した。

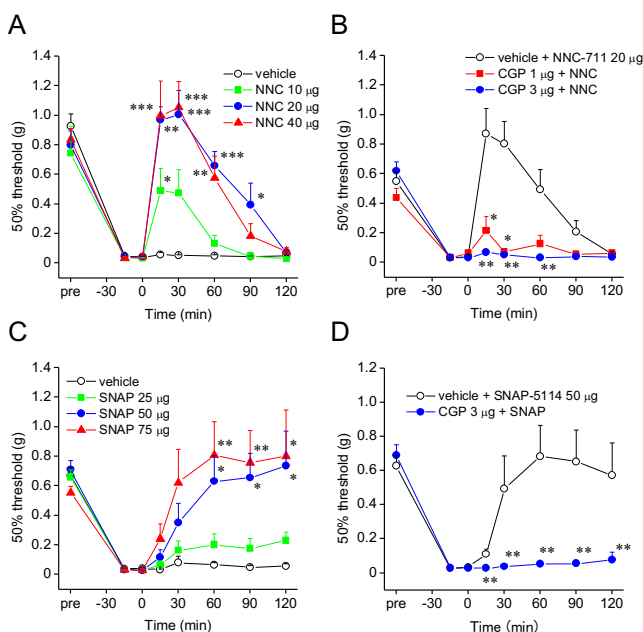


Fig. 8 PSLNモデルにおける GAT 阻害薬の GABA_B 受容体を介した抗アロディニア効果

研究 3. Mirogabalin の鎮痛メカニズムの行動薬理的解析

Mirogabalin は、日本で開発された末梢神経障害性疼痛治療薬であり、国内では 2019 年 4 月に承認販売された新規ガバペンチノイドである。ガバペンチノイドの作用点である $\alpha_2\delta$ サブユニットのうち、 $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットが鎮痛作用へ寄与し、 $\alpha_2\delta$ -2 サブユニットは傾眠や鎮静作用など副作用へ関与する。Mirogabalin は、従来のガバペンチノイドと比較して $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットへの親和性が高く、解離半減期も長いことから、より強い鎮痛作用を有すると考えられている。

PSNL モデルマウスに腹腔内、脳室内、あるいは脊髄髄腔内投与した mirogabalin は、用量依存的な熱痛覚過敏緩解作用と抗アロディニア効果を示した。また、アドレナリン α_2 受容体阻害薬の yohimbine を脊髄髄腔内投与した後に、mirogabalin を腹腔内あるいは脳室内に投与すると、鎮痛作用が減弱または消失した (Fig. 9)。さらに、

mirogabalin が示す上位中枢を介する鎮痛作用に $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットへの結合が関与するのかどうかを、 $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットの 217 番目のアルギニンをアラニンに置換することでガバペンチノイドの結合能を欠いた R217A 変異マウスを用いて検討を行なった。R217A 変異マウスでは全身投与した gabapentin や pregabalin は抗アロディニア効果を示さないことが報告されている。R217A 変異マウスに PSNL 処置をすることで神経障害性疼痛を誘発したマウスに pregabalin や mirogabalin を脳室内投与すると、WT マウスでは見られた鎮痛効果を示さなかった (Fig. 10)。よって、mirogabalin の鎮痛作用にはノルアドレナリン性下行性疼痛抑制作用が重要であり、 $\alpha_2\delta$ -1 サブユニットへの結合が必須であることが示された。

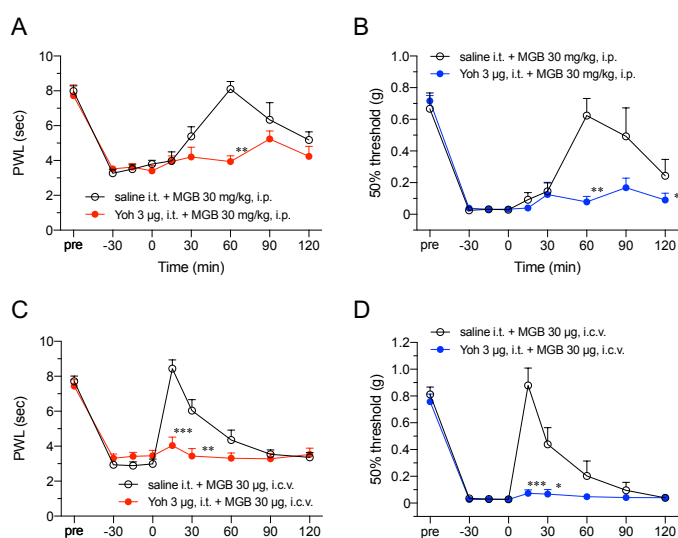


Fig. 9 Mirogabalin のノルアドレナリン性下行性疼痛抑制系の活性化による鎮痛効果

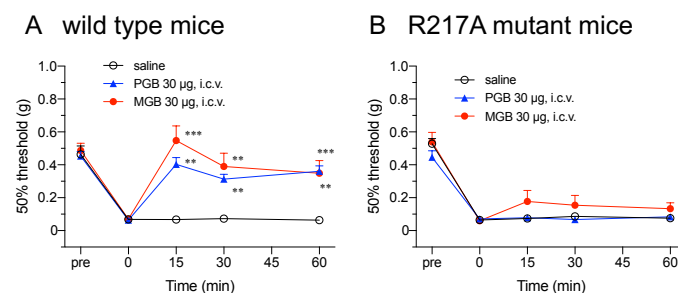


Fig. 10 Mirogabalin は $\alpha_2\delta$ サブユニットへ結合して鎮痛作用を示す

総括：

本研究では、GlyT 阻害薬では glycine の増加による glycine 性神経伝達の増強、GAT 阻害薬では GABA の増加による興奮性伝達の抑制、mirogabalin では上位中枢に作用して下行性抑制性の増強、という脊髄後角における「抑制性の増強」というアプローチでもターゲット分子によりそれぞれ異なるメカニズムが鎮痛作用に寄与することを詳細に明らかにした。今回の研究成果が新規鎮痛薬開発に繋がり、有効な治療法を持たない難治性疼痛患者にとって新たな選択肢が増えることを切望する。

論文目録：

- (1) Oyama M, Kuraoka S, Watanabe S, Iwai T, Tanabe M. Electrophysiological evidence of increased glycine receptor-mediated phasic and tonic inhibition by blockade of glycine transporters in spinal superficial dorsal horn neurons of adult mice. J Pharmacol Sci, 133:162-167 (2017). 【IF=3.337】
- (2) Oyama M, Watanabe S, Iwai T, Tanabe M. Distinct synaptic mechanisms underlying the analgesic effects of GABA transporter subtypes 1 and 3 inhibitors in the spinal dorsal horn. Pain (2021) doi: 10.1097/j.pain.0000000000002338. Epub ahead of print. PMID: 33990107. 【IF=6.961】
- (3) Oyama M, Watanabe S, Iwai T, Tanabe M. Mirogabalin activates the descending noradrenergic system by binding to the $\alpha 2\delta$ -1 subunit of voltage-gated Ca^{2+} channels to generate analgesic effects. J Pharmacol Sci, 146:33-39 (2021). 【IF=3.337】