

平成30年6月11日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10567

研究課題名(和文)冷感アロディニアに対する新たな鎮痛薬開発を目指したTRPM8受容体抑制機序の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms underlying inhibition of TRPM8 receptor aimed at development of novel analgesics to treat cold allodynia

研究代表者

堀下 貴文 (HORISHITA, Takafumi)

産業医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40369070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：難治性の神経障害性疼痛の症状の一つである冷感アロディニアに対する新たな鎮痛薬として、TRPM8受容体をターゲットにした薬物開発に貢献するため、神経障害性疼痛に対する鎮痛薬として使用されているデュロキセチンを含むいくつかの抗うつ薬のTRPM8受容体に対する影響を電気生理学的に解析した。抗うつ薬は濃度依存性にTRPM8受容体機能を可逆阻害的に抑制し、これらの抑制効果はPKCを介さないものであった。また、TRPA1に対するガバペンチンの影響解析も行い、一部PLCを介してガバペンチンがTRPA1機能を増強させることを発見した。これらの結果はTRPM8受容体機能抑制機序を解明する鍵になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of antidepressants such as duloxetine that have been used for patients with neuropathic pain, using electrophysiological technique, in order to contribute the development of medications targeting TRPM8 receptor as a novel analgesic for cold allodynia, one of symptoms of refractory neuropathic pain. We found that these antidepressants inhibit the function of TRPM8 receptor dose-dependently and reversibly, and that the inhibitory effects were independent of PKC. Moreover, we studied the effect of gabapentin on TRPA1 receptor, and found that gabapentin enhances the function of TRPA1 through PLC partially. These results would help to clarify the mechanisms underlying inhibition of TRPM8 receptor function.

研究分野：麻酔科学

キーワード：冷感アロディニア 神経障害性疼痛 温度感受性受容体 TRPM8受容体 TRPA1受容体 抗うつ薬 新たな鎮痛薬開発

1. 研究開始当初の背景

(1) 冷感アロディニアは、未だ病態解明されていない難治性の神経障害性疼痛の症状の一つであり、現存する鎮痛薬では治療困難な場合が多く、新たな鎮痛薬開発が望まれている。

(2) 近年、温度感受性受容体の一つである TRPM8 受容体が冷感アロディニアの病態形成に深く関与することが示唆されているが、TRPM8 受容体の調節機構については不明な点が多く、これをターゲットにした鎮痛薬開発には至っていない。従って、TRPM8 受容体調節機構を分子レベルで解明することは、冷感アロディニアの病態解明及び新たな鎮痛薬開発の重要な鍵になると考えられる。

2. 研究の目的

冷感アロディニアに対する有効な鎮痛薬開発に貢献するために、TRPM8 受容体機能抑制機序を分子レベルで解明し、これによる冷感アロディニア抑制機序を解明することを目的として、研究計画を立てた。

3. 研究の方法

(1) TRPM8 と TRPA1 受容体の cRNA によるキメラ型 cRNA の作成

申請者はこれまでに、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた電気生理学の実験によって、抗うつ薬であるデュロキセチンが TRPM8 受容体機能を抑制し、TRPA1 受容体には影響を及ぼさないことを確認してきた。そこで、抗うつ薬による TRPM8 受容体の抑制作用を分子レベルで解明するために、TRPM8 と TRPA1 受容体の cRNA による複数のキメラ型 cRNA を作成する。

(2) 電気生理学的手法 (アフリカツメガエル卵母細胞発現系) を用いたキメラ型 TRP 受容体に対する抗うつ薬の影響解析と作用部位の同定

(1) によって作成したキメラ型 cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、TRPM8 と TRPA1 によるキメラ型 TRP 受容体を細胞膜表面に発現させ、これに対するデュロキセチンを含む抗うつ薬の影響を電気生理学的に解析し、これまでに我々が確認してきた野生型 TRPM8 受容体に対する影響と比較することにより、これら抗うつ薬の TRPM8 受容体機能抑制に関わる作用部位を同定する。

(3) 神経障害性疼痛モデルマウスに対する抗うつ薬塗布による冷感アロディニア抑制効果の解析 (in vivo での行動薬理学による作用解析 I)

神経障害性疼痛モデルマウスと抗うつ薬塗布剤を作成し、神経障害性疼痛モデルマウスの冷感アロディニアに対する抗うつ薬塗布の抑制効果を解析する。

(4) 遺伝子変異マウスに対する抗うつ薬塗布による冷感アロディニア抑制効果の解析 (in vivo での行動薬理学による作用解析 II)

(2) で得られた抗うつ薬による TRPM8 受容体機能抑制に関わる作用部位の遺伝子変異マウスを作成し、さらにこれを用いて神経障害性疼痛モデルマウスを作成し、抗うつ薬塗布による冷感アロディニア抑制効果を解析する。野生型モデルマウスとの効果を比較することにより、TRPM8 受容体機能抑制に関する抗うつ薬の作用部位とアロディニア抑制効果との関連性が明らかとなる。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた TRPM8 受容体に対するデュロキセチンを含む抗うつ薬の影響解析

申請者はこれまでに、抗うつ薬であるデュロキセチンが TRPM8 受容体機能を抑制することを確認してきた。そこで、TRPM8 受容体の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し細胞膜表面に受容体を発現させ、Voltage-clamp 法による電気生理学的手法を用いて、SNRI であるデュロキセチン以外の抗うつ薬である三環系抗うつ薬 (アミトリプチリン、イミプラミン、ノルトリプチリン、デシプラミン)、四環系抗うつ薬 (ミアンセリン)、SSRI (パロキセチン) (それぞれ 10 μ M) のメンソール 100 μ M による -60mV からの誘発性電流に対する影響を調べた。その結果、ミアンセリンとパロキセチンはデュロキセチン同様に強い抑制効果を示したが、全ての三環系抗うつ薬は比較的弱い抑制効果であった。

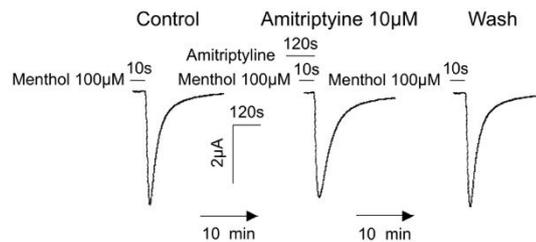


図1 TRPM8に対するアミトリプチリンの影響

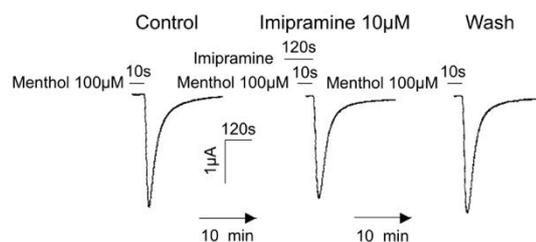


図2 TRPM8に対するイミプラミンの影響

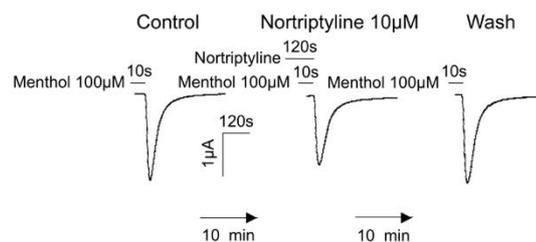


図3 TRPM8に対するノルトリプチリンの影響

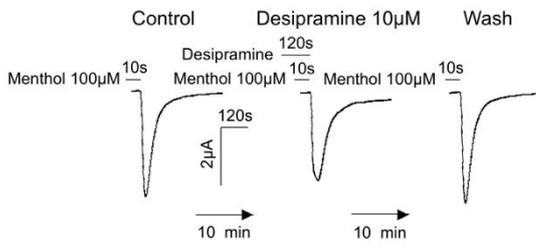


図4 TRPM8に対するデシプラミンの影響

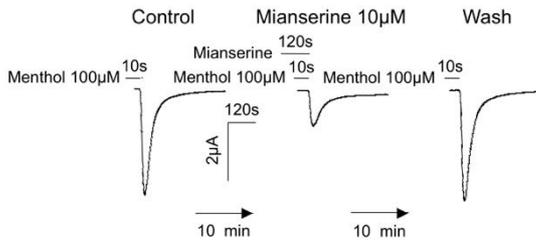


図5 TRPM8に対するミアンセリンの影響

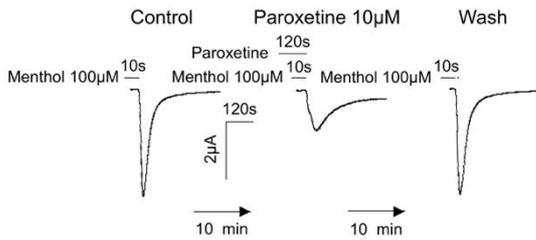


図6 TRPM8に対するパロキセチンの影響

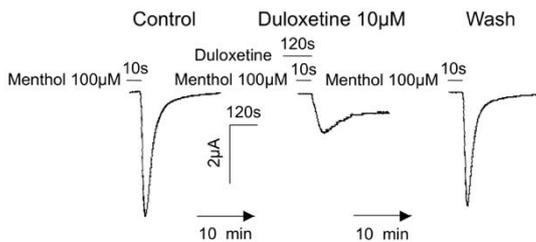


図7 TRPM8に対するデュロキセチンの影響

(2) TRPM8 受容体に対する種々の抗うつ薬の抑制効果の濃度反応曲線

メンソール 100µM による誘発性電流に対する種々の濃度の抗うつ薬の効果を調べた。その結果、全ての抗うつ薬は、TRPM8 受容体のメンソール誘発性電流を濃度依存性に抑制した。アミトリプチリン、イミプラミン、ノルトリプチリン、デシプラミン、ミアンセリン、パロキセチン、デュロキセチンの IC₅₀ 値はそれぞれ、99.4 ± 5.1、64.5 ± 4.8、30.4 ± 3.1、31.6 ± 3.0、6.7 ± 4.2、8.0 ± 1.7、7.3 ± 2.0 µM であり、比較的抑制効果の弱い三環系抗うつ薬と、効果の強いデュロキセチン、パロキセチン、ミアンセリンの二つのグループに別れた。

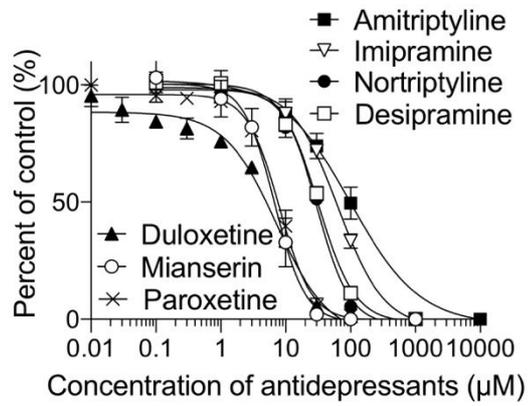


図8 TRPM8に対する抗うつ薬の濃度反応曲線

(3) TRPM8 受容体に対するデュロキセチン、パロキセチン、ミアンセリンの抑制機序に関する解析

抗うつ薬のうち、TRPM8 受容体に対して抑制効果の強かったデュロキセチン、パロキセチン、ミアンセリンの抑制機序について検討するために、0.01-5mM のメンソール濃度反応曲線に対するこれら抗うつ薬 10µM の抑制効果を解析した。デュロキセチンは最大反応量 E_{max} を $80.6 \pm 3.1\%$ に減少させ、デュロキセチンの非存在下、存在下における slope factor と EC_{50} はそれぞれ、 1.5 ± 0.2 と $0.56 \pm 0.04mM$ 、 1.7 ± 0.1 と $0.73 \pm 0.04mM$ であり、slope factor に有意差はなかったが、デュロキセチンによって EC_{50} が有意に増加した。また、パロキセチンも最大反応量 E_{max} を $71.5 \pm 2.0\%$ に減少させ、パロキセチンの非存在下、存在下における slope factor と EC_{50} はそれぞれ、 1.6 ± 0.2 と $0.61 \pm 0.05mM$ 、 2.1 ± 0.4 と $0.73 \pm 0.05mM$ であり、slope factor に有意差はなかったが、パロキセチンによって EC_{50} が有意に増加した。さらに、ミアンセリンも最大反応量 E_{max} を $82.2 \pm 4.0\%$ に減少させ、ミアンセリンの非存在下、存在下における slope factor と EC_{50} はそれぞれ、 1.3 ± 0.2 と $0.55 \pm 0.04mM$ 、 1.8 ± 0.2 と $0.65 \pm 0.03mM$ であり、slope factor に有意差はなかったが、ミアンセリンによって EC_{50} が有意に増加した。これらの結果より、3 つの抗うつ薬の阻害形式はいずれも可逆阻害であることが示された。

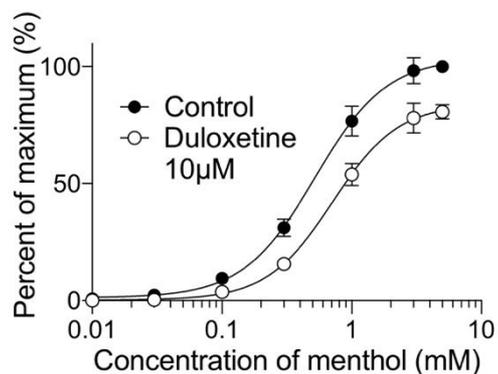


図9 TRPM8におけるmenthol濃度反応曲線に対するデュロキセチンの影響

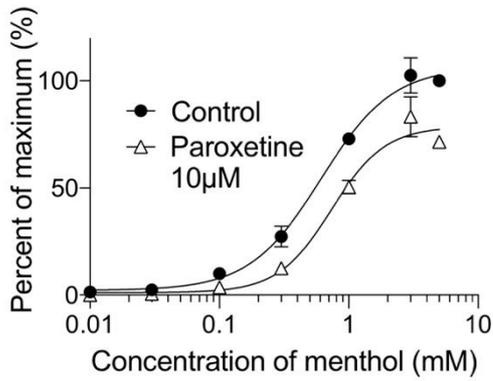


図10 TRPM8におけるmenthol濃度反応曲線に対するパロキセチンの影響

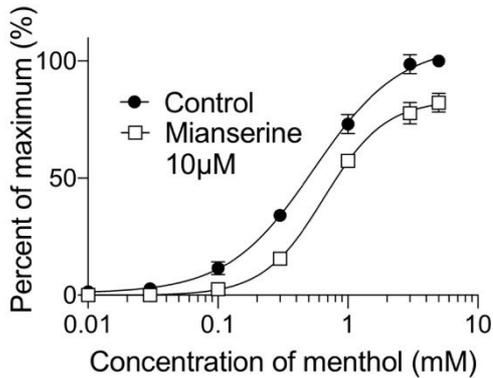


図11 TRPM8におけるmenthol濃度反応曲線に対するミアンセリンの影響

(4) デュロキセチンによる TRPM8 受容体抑制作用に対するリン酸化経路の関与についての検討

TRPM8 受容体活性化の調節機構については不明な点が多いが、リン酸化経路におけるプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化によって、TRPM8 受容体機能が抑制されることがこれまでに報告されている。そこで、デュロキセチンの抑制機序に対する PKC の関与を検討するため、PKC 刺激薬である phorbol 12,13-dibutyrate (PDBu) と PKC 阻害薬である GF109203X を用いて実験を行った。PDBu (10µM) は、TRPM8 受容体におけるメンソール誘発性電流を $30.5 \pm 8.7\%$ に有意に抑制したが、GF109203X の存在下ではその抑制効果は $76.0 \pm 7.1\%$ へと有意に減弱し、PKC の活性化が TRPM8 受容体機能の抑制に関与していることが確認できた。

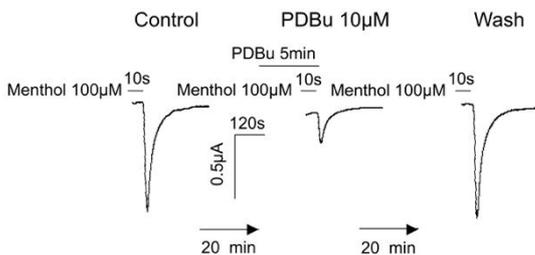


図12 TRPM8に対するPDBuの影響

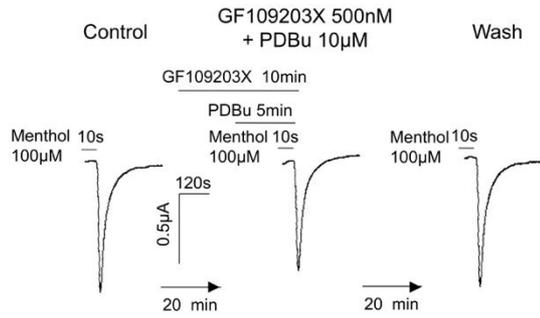


図13 GF109203X存在下におけるTRPM8に対するPDBuの影響

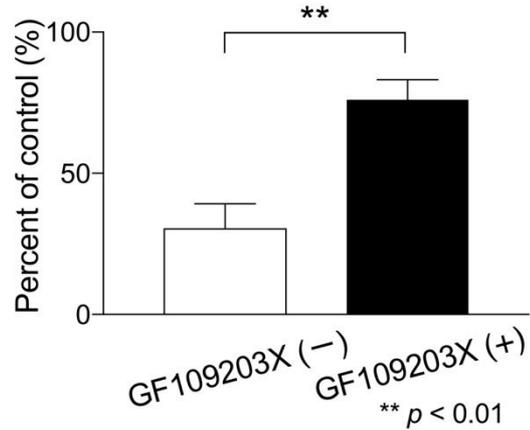


図14 PDBuによるTRPM8抑制効果に対するGF109203Xの影響

さらに、GF109203X の存在下におけるデュロキセチンによる TRPM8 受容体抑制効果を調べたところ、デュロキセチンの抑制効果は GF109203X の存在下においても非存在下同様に認められたため、デュロキセチンの抑制機序には PKC 活性化は関与しないことが示された。

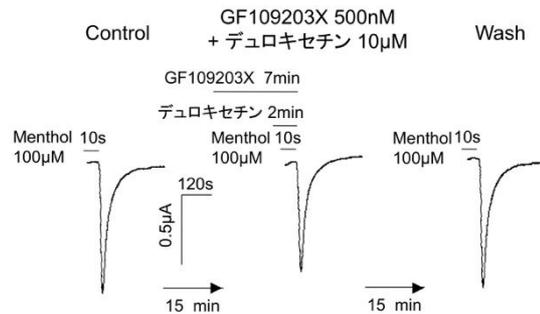


図15 GF109203X存在下におけるTRPM8に対するデュロキセチンの影響

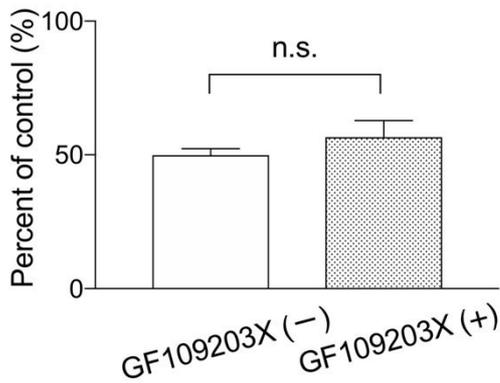


図16 デュロキセチンによるTRPM8抑制効果に対するGF109203Xの影響

(5) TRPA1 受容体に対する抗痙攣薬ガバペンチンの影響解析

現在までに我々は、抗うつ薬が TRPA1 受容体機能には影響を与えないことを確認してきた。一方、抗痙攣薬ガバペンチンは、抗うつ薬同様に難治性障害性疼痛患者に使用され、効果を発揮する場合がある。また、TRPA1 受容体も神経障害性疼痛を形成する分子としての可能性が示唆されている。そこで、ガバペンチンの TRPM8 受容体及び TRPA1 受容体に対する影響解析を行った。ガバペンチンは、臨床濃度 (10 μ M、30 μ M) において TRPM8 受容体には影響を与えなかったが、TRPA1 受容体におけるカルバクロール誘発性電流を、10 μ M、30 μ M においてそれぞれ 200 \pm 25、205 \pm 42% に有意に増強させた。

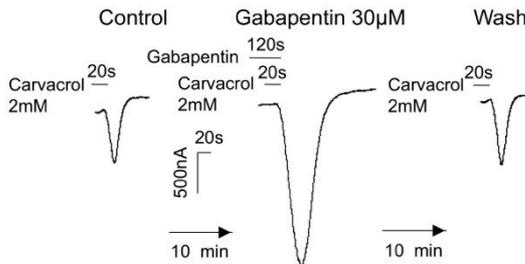


図17 TRPA1に対するガバペンチンの影響

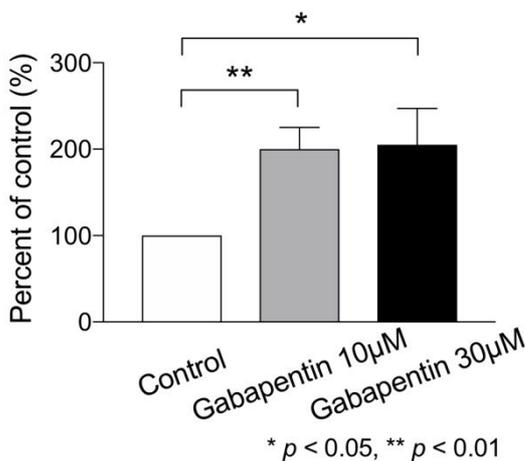


図18 TRPA1に対するガバペンチンの増強作用

(6) ガバペンチンによる TRPA1 受容体機能増強作用に対する phospholipase C (PLC) の関与についての検討

TRPA1 受容体は、様々な細胞内情報伝達によって、その活性化が調節されることが報告されている。そこで、ガバペンチンによる TRPA1 受容体機能増強作用に対する PLC の関与について検討を行った。PLC 刺激薬 (m-3M3FBS) は、カルバクロール誘発性電流を 120 \pm 6% 有意に増強し、PLC の活性化によって TRPA1 機能が増強されることが示された。そこで、PLC 阻害薬 (U-73122) の存在下におけるガバペンチンの増強作用を解析したところ、有意な差ではなかったが、U-73122 の非存在下と比較してガバペンチンによる増強作用が減弱される傾向が認められた (215 \pm 33 vs 163 \pm 19%)。従って、ガバペンチンによる TRPA1 機能増強作用の機序として、PLC 活性化が一部含まれる可能性が示唆された。

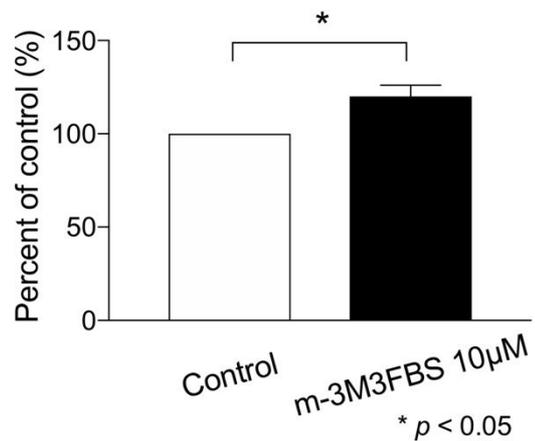


図19 TRPA1に対するm-3M3FBSの増強作用

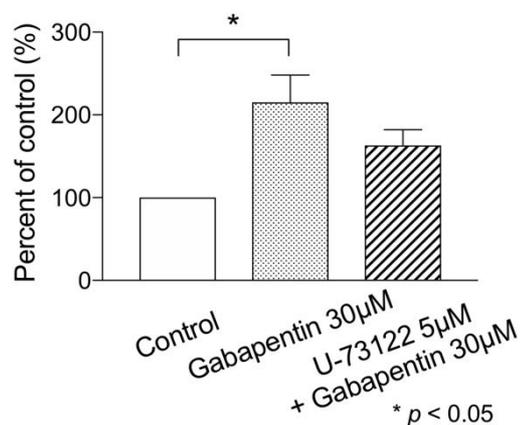


図20 ガバペンチンによるTRPA1増強作用に対するU-73122の影響

(7) ガバペンチンによる TRPA1 受容体機能増強作用に対する protein kinase A (PKA) の関与についての検討

さらに、ガバペンチンによる TRPA1 受容体機能増強作用に対する PKA の関与について検討を行った。PKA 刺激薬 (forskolin) は、カルバクロール誘発性電流を $152 \pm 9\%$ 有意に増強し、PKA の活性化によって TRPA1 機能が増強されることが示された。そこで、PKA 阻害薬 (KT5720) の存在下におけるガバペンチンの増強作用を解析したところ、非存在下と比べて変化は認められなかった (157 ± 6 vs $157 \pm 9\%$)。従って、ガバペンチンによる TRPA1 機能増強作用の機序に、PKA 活性化は含まれないことが示された。

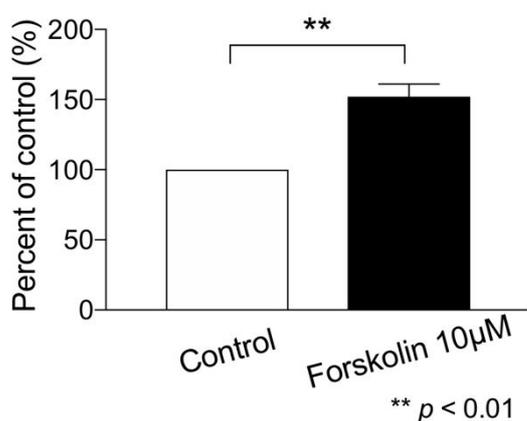


図21 TRPA1に対するForskolinの増強作用

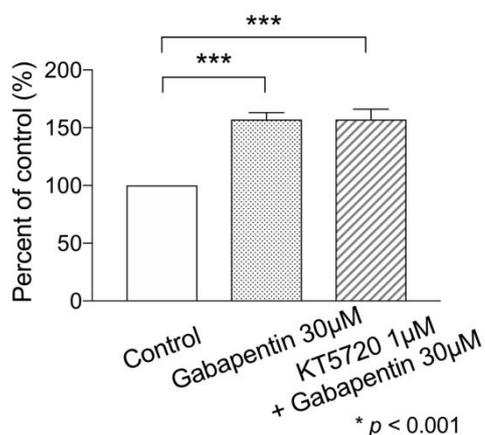


図22 ガバペンチンによるTRPA1増強作用に対するKT5720の影響

TRPA1 受容体も神経障害性疼痛を形成する重要な分子であることが示唆されており、これら鎮痛薬の TRPA1 に対する作用機序を明らかにしていくことは、新たな鎮痛薬開発へつなげる鍵になると考えられる。

5. 主な発表文等

(研究代表者、究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表](計2件)

発表者名：Reiko Horishita, Takafumi Horishita, Dan Okura, Tomoko Minami, Yuichi Ogata, Takashi Kawasaki
 発表標題：Lidocaine inhibits 2APB-activated currents of TRPV3 channels expressed in *Xenopus* oocytes.
 学会名：Anesthesiology 2017 annual meeting
 発表年月日：2017年10月24日
 発表場所：ボストン(米国)

発表者名：土山玲子、堀下貴文、大倉暖、南智子、佐多竹良
 発表標題：温度感受性 TRP チャンネルサブファミリー、TRPA1 に対するガバペンチンの影響
 学会名：日本麻酔科学会第62会学術集会
 発表年月日：2015年5月29日
 発表場所：神戸国際会議場(兵庫県中央区)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀下 貴文 (HORISHITA, Takafumi)
 産業医科大学・医学部・准教授
 研究者番号：40369070

(2) 研究分担者

佐多 竹良 (SATA, Takeyoshi)
 産業医科大学・医学部・名誉教授
 研究者番号：60128030

(3) 連携研究者

大倉 暖 (OKURA, Dan)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：00596710

堀下 玲子 (HORISHITA, Reiko)
 産業医科大学・医学部・助教
 研究者番号：40746658