

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K20065

研究課題名(和文) 難治性慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬開発を目指したP2X7受容体機能抑制機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanisms underlying inhibition of the function of P2X7 receptor aimed at development of novel analgesics for refractory chronic pain

研究代表者

大倉 暖 (OKURA, Dan)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：00596710

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛を成因とする難治性慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬として、P2X7受容体のみを選択的に阻害する薬物の開発に貢献するため、鎮痛作用を持つニューロステロイド、プレグネロン硫酸塩と、神経傷害性疼痛に対する鎮痛薬として使用されている抗うつ薬、パロキセチンのP2X7受容体に対する影響を電気生理学的に調べた。その結果、これらの薬物が濃度依存性にP2X7受容体機能を抑制し、その抑制機序が非拮抗阻害であることを発見した。これらの結果は、P2X7受容体機能抑制機序を解明するのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of neurosteroid that have analgesic effect, pregnenolone sulfate and antidepressants, paroxetine that have been used for neuropathic pain on the function of P2X7 receptor using electrophysiological technique in order to contribute the development of selective P2X7 inhibitor as a novel analgesic for refractory chronic pain constituted by nociceptive and neuropathic pain. We found that these compounds inhibit the function of P2X7 receptor dose-dependently, and that the inhibitory effect is noncompetitive inhibition. These results would help to clarify the mechanisms underlying inhibition of P2X7 receptor function, and contribute the development of selective P2X7 receptor inhibitor.

研究分野：麻酔科学

キーワード：難治性慢性疼痛 ATP受容体 P2X7受容体 P2X7受容体抑制機構 ニューロステロイド 新たな鎮痛薬開発

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 侵害受容性疼痛や神経障害性疼痛を成  
因とする慢性疼痛は、その病態に対する研究  
が進められてきたが、未だ病態解明にいたっ  
ておらず、現在の鎮痛薬では無効な例も多く、  
新たな鎮痛薬の開発は急務である。近年、ア  
デノシン三リン酸 ( Adenosin  
Triphosphate : ATP ) 受容体が疼痛発現に深  
く関与していることが示されており、中  
でも一次求心性感覚神経や脊髄グリア細胞に発  
現している P2X3、P2X4、P2X7、P2Y12 が  
炎症性疼痛・神経障害性疼痛の発現に重要で  
あることが報告されている。従ってこれら  
をターゲットにした薬物の開発は、難治性慢性  
疼痛に対する新たな鎮痛薬開発につながる  
可能性がある。

(2) 一方、申請者らは、これら ATP 受容  
体のうち、局所麻酔薬リドカインや鎮痛作用  
を持つニューロステロイドが、P2X7 受容体  
機能を選択的に抑制することを発見し、  
P2X7 受容体機能の抑制がこれらの鎮痛機序  
に関与している可能性を示してきた。

## 2. 研究の目的

難治性慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬とし  
て、P2X7 受容体のみをターゲットにした選  
択的阻害薬の開発に貢献するために、P2X7  
受容体抑制機序を分子レベルで解明するこ  
とを計画した。

## 3. 研究の方法

(1) 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 P2X7 と P2X3 受  
容体に対するニューロステロイド (NS) の影  
響解析

申請者らはこれまでに、強い鎮痛作用を持  
つ NS、アロプレグナロン硫酸塩 (APS)  
が P2X7 受容体機能を抑制し、P2X3 受容体  
機能を増強することを、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  
の実験によって確認してきた。そこで、  
その他の鎮痛作用を持つ NS、プレグ  
ナロン、プロゲステロンなどの影響につ  
いても同様に解析し、それらの作用を  
比較検討する。P2X7 は疼痛発現だけ  
でなく、慢性炎症のメカニズムにも深  
く関与することが示されているため、  
抗炎症薬として臨床的に使用されてい  
るデキサメタゾンなどの末梢性のステ  
ロイドについても同様の解析を行う。  
さらに、その阻害形式についても薬理  
学的な検討を行う。

(2) P2X7 と P2X3 受容体の cRNA を用  
いたキメラ型 cRNA の作成

APS による P2X7 受容体の抑制機序・作  
用部位を明らかにすることを目的とし  
て、高濃度 APS によって機能が増強さ  
れる P2X3 受容体と P2X7 受容体によ  
るキメラ型 P2X 受容体に対する APS  
の影響を解析するため、2 つの受容体  
cRNA を用いて複数のキメラ型 cRNA  
を作成する。P2X7 受容体の構造は、

その他の P2X 受容体と同様に、細胞膜 2  
回貫通型のサブユニット 3 分子が 1 つ  
のチャネルを形成した三量体である  
と考えられているが、その他の P2X 受  
容体と比較して長い細胞内 C 末端を  
含むなど、最も長いアミノ酸配列を  
持ち、P2X 受容体の中で特徴的な構  
造を持っている。P2X3 受容体と比  
較すると、P2X3 受容体が 397 のア  
ミノ酸配列を持つのに対して、P2X7  
は 595 のアミノ酸配列を持ち、その  
相同性は 42% である。従って、この  
P2X7 受容体の特徴的な構造が、AP  
による抑制作用に深く関わっていると  
考えられる。先に示した図のように、  
N 末端細胞内領域、2 つの細胞膜貫  
通領域、細胞外領域、C 末端細胞内  
領域を境とした複数のキメラ型 cRNA  
を作成する。

(3) 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 P2X 受容体に対する AP を含  
む NS の影響解析による作用部位の  
同定

で作成したキメラ型 cRNA をアフリカツ  
メガエル卵母細胞に注入し、P2X3 と  
P2X7 のキメラ型 P2X 受容体を発  
現させ、これに対する APS を含む NS  
の影響を電気生理学的に解析し、野  
生型 P2X7 受容体に対する影響と  
比較することにより、これら薬物の  
P2X7 受容体機能抑制に関わる作用  
部位・構造を同定する。

(4) 侵害受容性疼痛・神経障害性疼  
痛モデルマウスに対する APS を含  
む NS の疼痛抑制効果の解析 (in  
vivo での行動薬理学による作用解  
析)

慢性疼痛モデルマウスとして侵害受  
容性モデルマウスと神経障害性疼痛  
モデルマウスを作成し、これらに対  
する APS を含む NS の疼痛抑制効  
果を行動薬理的に解析する。

(5) 遺伝子変異マウスに対する APS  
を含む NS の疼痛抑制効果の解析  
(in vivo での行動薬理学による作  
用解析)

(3) で得られた P2X7 受容体機能抑  
制機序に関わる部位の遺伝子変異マ  
ウスを作成する。さらに遺伝子変異  
マウスを用いて慢性疼痛モデルマウ  
スを作成し、これに対する NS の疼  
痛抑制効果を解析する。

## 4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発  
現を用いた P2X7 受容体に対する種  
々の NS、アロプレグナロン硫酸塩  
(APS)、プレグネロン硫酸塩 (PS)、  
プレグナロン硫酸塩 (PAS)、デヒ  
ドロエピアンドロステロン硫酸塩  
(DHEAS) とステロイド系抗炎症薬  
、デキサメタゾン (DM) の影響解  
析

P2X7 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た。Voltage-  
clamp 法による電気生理学的手法  
により、ATP 1mM によって活性

化された電流に対する鎮痛作用を持つNSであるAPS、PS、PAS、DHEASと、ステロイド系抗炎症薬、DMのP2X7受容体に対する影響を調べた。PAS、DHEAS、デキサメタゾン、P2X7受容体機能に対して弱い抑制作用しか示さなかったが、APSとPSは強い抑制作用を持ち、PSが最も強くP2X7受容体機能を抑制した。

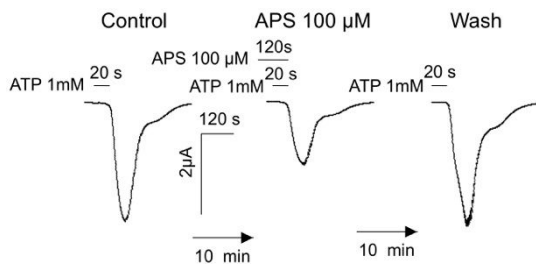


図1 P2X7に対するAPSの影響

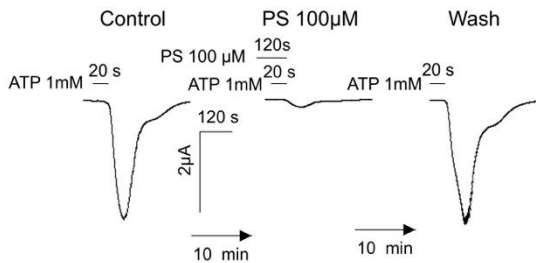


図2 P2X7に対するPSの影響

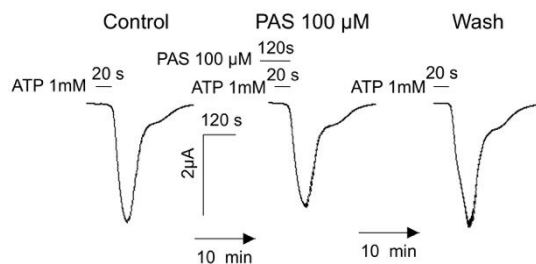


図3 P2X7に対するPASの影響

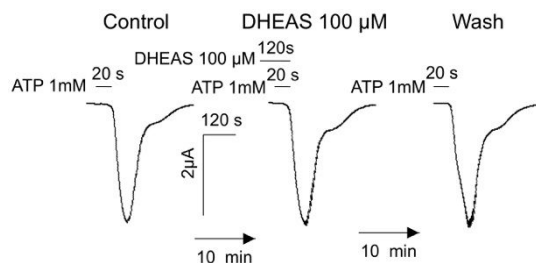


図4 P2X7に対するDHEASの影響

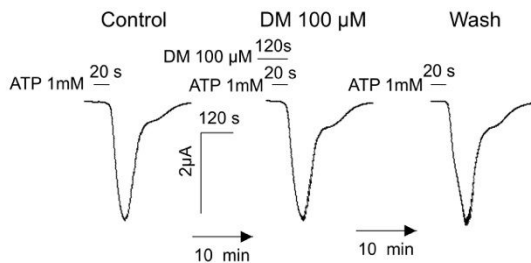


図5 P2X7に対するDMの影響

### (2) P2X7受容体に対する種々のPS、APSの抑制効果の濃度反応曲線

PSとAPSが、P2X7受容体機能を強く抑制することが示されたため、ATP 1mMによる誘発性電流に対する種々の濃度のPS、APSの効果を調べた。その結果、1μM、10μM、30μM、100μMのPSはP2X7のATP誘発性電流を $86.8 \pm 3.2$ 、 $61.8 \pm 8.1$ 、 $40.3 \pm 8.4$ 、 $10.7 \pm 2.4$  %にそれぞれ抑制し、APSもまた $93.1 \pm 2.3$ 、 $76.0 \pm 5.3$ 、 $63.7 \pm 8.1$ 、 $49.7 \pm 8.9$  %にそれぞれ抑制し、濃度依存性の抑制効果を示された。PSの方が、より強い抑制効果を示し、濃度反応曲線の $IC_{50}$ 値は、 $21.4 \pm 4.6 \mu\text{M}$ であった。

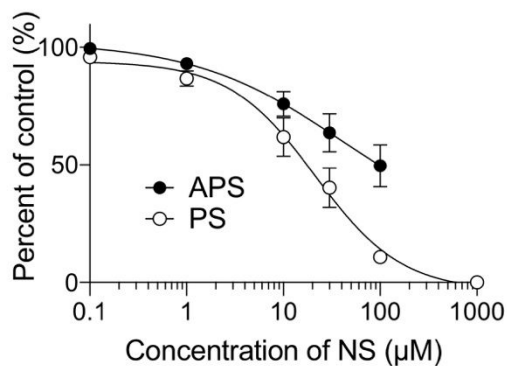


図6 P2X7に対するPS、APSの濃度反応曲線

### (3) P2X7受容体に対するPSの抑制機序に関する解析

NSのうち、P2X7に対して最も強い抑制効果を示したPSの抑制機序について検討するために、0.01-5mMのATP濃度反応曲線に対するPS 30μMの抑制効果を解析した。その結果、PSは最大反応量 $E_{max}$ を $42.5 \pm 7.6$  %減少させ、PSの非存在下、存在下におけるslope factorと $EC_{50}$ はそれぞれ、 $2.3 \pm 0.7$ と $1.1 \pm 0.1\text{mM}$ 、 $2.7 \pm 2.4$ と $1.2 \pm 0.2\text{mM}$ であり、PSはslope factorと $EC_{50}$ を変化させなかった。この結果より、PSによるP2X7受容体機能の抑制は非拮抗阻害であることが示された。

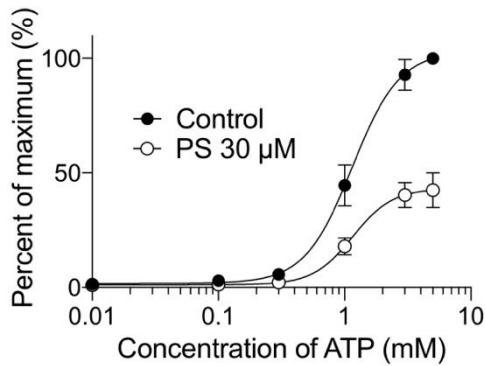


図7 P2X7におけるATP濃度反応曲線に対するPSの影響

(4) P2X7 受容体に対する種々の抗うつ薬の影響解析

いくつかの抗うつ薬は、神経傷害性疼痛に対する有効性が示されているが、その鎮痛機序については不明な点も多い。そこで、種々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）、SNRI（デュロキセチン）、SSRI（パロキセチン）の P2X7 受容体に対する影響を調べたところ、これらの抗うつ薬の中でパロキセチンが ATP 誘発性電流を有意に抑制した。

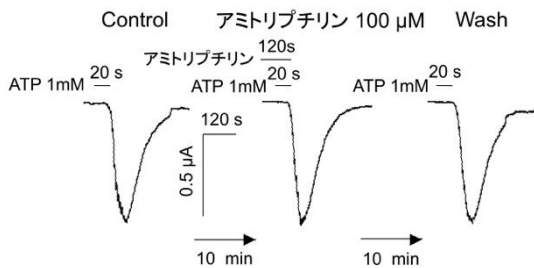


図8 P2X7に対するアミトリプチリンの影響

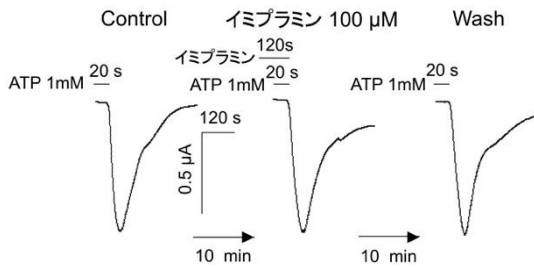


図9 P2X7に対するイミプラミンの影響

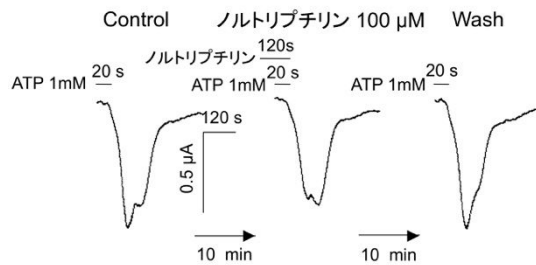


図10 P2X7に対するノルトリプチリンの影響

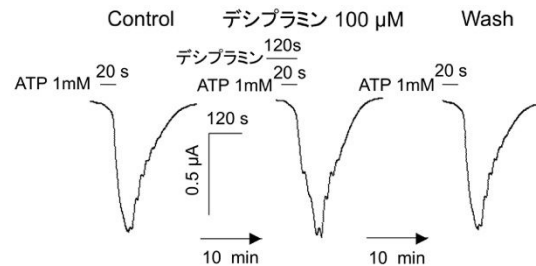


図11 P2X7に対するデシプラミンの影響

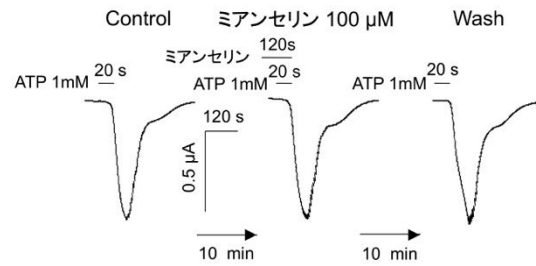


図12 P2X7に対するミアンセリンの影響

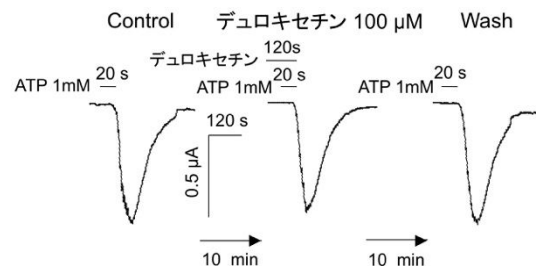


図13 P2X7に対するデュロキセチンの影響

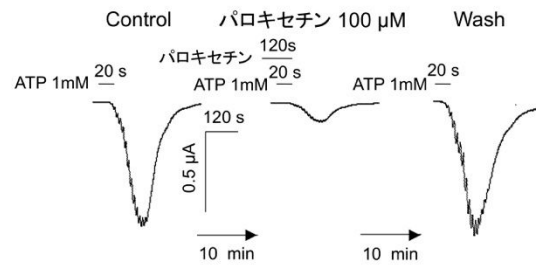


図14 P2X7に対するパロキセチンの影響

(5) P2X7 受容体に対するパロキセチンの抑制効果の濃度反応曲線

パロキセチン 100 $\mu$ M のみが、P2X7 受容体機能を有意に抑制することが示されたため、ATP 1mM による誘発性電流に対する種々の濃度のパロキセチンの効果を調べた。その結果、0.3 $\mu$ M、1 $\mu$ M、3 $\mu$ M、10 $\mu$ M、30 $\mu$ M、100 $\mu$ M のパロキセチンは P2X7 の ATP 誘発性電流を  $84.1 \pm 3.3$ 、 $77.1 \pm 3.3$ 、 $64.7 \pm 7.0$ 、 $53.8 \pm 5.1$ 、 $29.6 \pm 1.7$ 、 $14.7 \pm 1.3$  % にそれぞれ抑制し、濃度依存性の抑制効果が示された。濃度反応曲線の IC<sub>50</sub> 値は、 $8.2 \pm 1.7 \mu$ M であった。

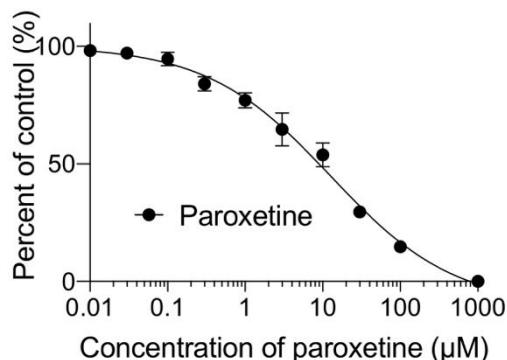


図15 P2X7に対するパロキセチンの濃度反応曲線

(6) P2X7 受容体に対するパロキセチンの抑制機序に関する解析

パロキセチンの抑制機序について検討するために、0.01–10mM の ATP 濃度反応曲線に対するパロキセチン 10 $\mu$ M の抑制効果を解析した。その結果、パロキセチンは最大反応量  $E_{max}$  を  $59.8 \pm 6.4$  % 有意に減少させ、パロキセチンの非存在下、存在下における slope factor と EC<sub>50</sub> はそれぞれ、 $2.3 \pm 0.7$  と  $1.1 \pm 0.1$  mM、 $2.1 \pm 0.3$  と  $1.3 \pm 0.1$  mM であり、パロキセチンは slope factor と EC<sub>50</sub> を変化させなかった。この結果より、パロキセチンによる P2X7 受容体機能の抑制は非拮抗阻害であることが示された。

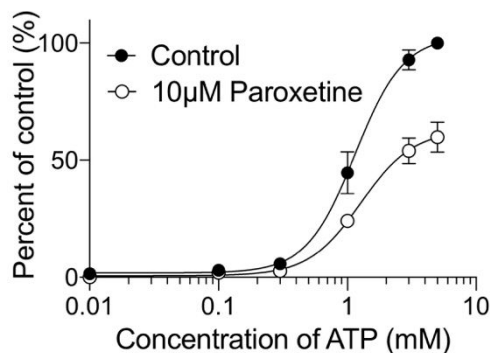


図16 P2X7におけるATP濃度反応曲線に対するパロキセチンの影響

これらパロキセチンの P2X7 受容体に対する抑制作用は、パロキセチンの鎮痛機序の一

つである可能性があり、さらなる解析を進めることで、P2X7 受容体活性化の調節機構を解明する上で重要な手がかりになると考えられる。

## 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1件)

著者名：Dan Okura, Takafumi Horishita, Susumu Ueno, Nobuyuki Yanagihara, Yuka Sudo, Yasuhito Uezono, Tomoko Minami, Takashi Kawasaki, Takeyoshi Sata

論文表題：Lidocaine preferentially inhibits the function of purinergic P2X7 receptors expressed in *Xenopus* oocytes

雑誌名：Anesthesia and Analgesia

査読の有無：査読有り

巻：120

発行年：2015年

ページ：p.597–605

〔学会発表〕(計1件)

発表者名：大倉暖、堀下貴文、土山玲子、南智子、佐多竹良

発表標題：アロプレグナノロン硫酸塩は、ATP 受容体サブタイプ、P2X7 受容体機能を抑制する

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28日

発表場所：神戸ポートピアホテル(兵庫県中央区)

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

大倉 暖 (OKURA, Dan)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：00596710