

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06710

研究課題名(和文)カンナビノイド受容体とT型Caチャンネルを標的とする過敏性腸症候群の新規治療戦略

研究課題名(英文) New therapeutic strategies for irritable bowel syndrome targeting cannabinoid receptors and T-type calcium channels

研究代表者

坪田 真帆 (Tsubota, Maho)

近畿大学・薬学部・講師

研究者番号：90510123

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ButyrateおよびTNBS誘起関連痛覚過敏および結腸過敏にCav3.2 T型カルシウムチャンネルが重要な役割を持つことが明らかになった。一方、CB1およびCB2受容体刺激薬は本モデルにおいて明確な効果を示さなかった。そこで既存医薬品の中でT型カルシウムチャンネル阻害活性を有する抗不整脈薬や抗狭心症薬 bepridilや定型抗精神病薬pimozideの有効性を検討したところ、強い結腸痛抑制効果が認められた。したがって、bepridilやpimozideをリード化合物としたよりT型カルシウムチャンネルに選択性の高い薬物の開発は、過敏性腸症候群の新たな治療戦略となりうるということが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過敏性腸症候群は、腹痛や便通異常が長期間持続することで患者のQOLは著しく損なわれる。現在、IBSの治療には主に対症療法が用いられているが、発症メカニズムに基づくより有効な治療薬の開発が望まれている。本研究課題では、新たな過敏性腸症候群の痛みの治療戦略として既存医薬品の中でT型カルシウムチャンネル阻害活性を有する抗不整脈薬bepridilや定型抗精神病薬pimozideの有効性を調べた。今後これらの薬物をリード化合物としてよりT型カルシウムチャンネルに選択性の高い薬物を開発することで過敏性腸症候群の新たな治療戦略が構築できると考える。

研究成果の概要(英文)：The present study demonstrates that Cav3.2 T-type Ca<sup>2+</sup> channels play an important role in butyrate and TNBS-induced colonic pain. On the other hands, CB1 or CB2 receptor agonist did not show a clear effect in these models. We also clarified that, among existing drug, bepridil, an antiarrhythmic drug and antianginal drug, and pimozide, a typical antipsychotic drug, markedly reversed colonic pain. Therefore, our findings support that the development of a more selective drug for T-type Ca<sup>2+</sup> channel using bepridil or pimozide as a lead compound could be a new therapeutic strategy for irritable bowel syndrome.

研究分野：薬理学

キーワード：過敏性腸症候群 T型カルシウム

## 1. 研究開始当初の背景

T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルは中枢および末梢神経系において神経興奮を制御し、てんかんや痛みの病態に関与するほか、心血管障害やがんにも関与することが示唆されている。T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネルの3つのサブタイプ ( $\text{Ca}_v3.1 \sim 3.3$ )のうち、 $\text{Ca}_v3.2$ は侵害受容ニューロンに豊富に発現しており、神経障害性疼痛や結腸痛、膵臓痛、膀胱を含む臓器痛などの痛みの情報伝達において重要な役割を担うことが我々のグループを含む複数の研究者により証明されている。一方、カンナビノイド受容体は、Gタンパク共役7回膜貫通型受容体で、中枢神経系に多く発現する  $\text{CB}_1$ および免疫細胞に多く発現する  $\text{CB}_2$ の2つのサブタイプが存在する。 $\text{CB}_1$ および  $\text{CB}_2$ 受容体刺激薬は、それぞれ神経伝達の抑制制御および炎症性サイトカインの遊離抑制により神経障害性疼痛、炎症性疼痛や結腸痛に抑制作用を示すことが知られているが、鎮静、記憶障害や薬物依存などの副作用があるため日本国内での使用は規制されている。

近年、新たな痛みの治療薬として T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬の開発に関する研究が精力的に行われ、その中でいくつかの T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬が T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害活性のみならずカンナビノイド受容体刺激作用を有することが明らかになった<sup>5,6</sup>。我々のグループは、ビールホップの成分として知られる 6-prenylnaringenin (6-PNG) が T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害活性を有することを  $\text{Cav}3.2$ を強制発現した HEK293細胞を用いて電気生理学的に証明し、さらに、 $\text{CB}_1$ 受容体刺激作用を併せ持つことを神経前駆様 NG108-15細胞を用いた神経突起伸長を指標として明らかにしている(図1)。現在、6-PNGによる  $\text{CB}_2$ 受容体刺激作用の有無を  $\text{CB}_2$ 受容体強制発現系を用いて検討を行っている。また、興味深いことに、カンナビノイド受容体刺激作用を持つ T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬は、強い鎮痛作用を示すが鎮静作用を生じないことが報告されている。これらのことから、我々は 6-PNGが副作用が少なく強い鎮痛作用もつ新たな治療薬になりうる可能性を考えている。

過敏性腸症候群は、明確な基質的病変を伴わず、便秘または下痢と、腹痛や腹部不快感が慢性的に繰り返される疾患で、便通異常の改善とともに痛みのケアが重要となっている。最近、ブチル酸をラット結腸内に反復投与することにより誘起される過敏性腸症候群モデルの結腸痛の発現に  $\text{Ca}_v3.2$ が関与する可能性が報告された。我々は、マウスにおいてブチル酸誘起過敏性腸症候群モデルの作製に成功し、本モデルにおける結腸痛が T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬やアンチセンス法による  $\text{Ca}_v3.2$ のノックダウンにより抑制されることを明らかにしている。そこで本研究では、過敏性腸症候群 (IBS) マウスモデルにおける結腸痛に対する T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害薬と  $\text{CB}_1$ または  $\text{CB}_2$ 受容体刺激薬の単独および併用投与による効果を解析した。

## 2. 研究の目的

過敏性腸症候群は、腹痛や便通異常が長期間持続することで患者の QOL は著しく損なわれる。現在、IBS の治療には主に対症療法が用いられているが、発症メカニズムに基づくより有効な治療薬の開発が望まれている。本研究課題では、新たな過敏性腸症候群の痛みの治療戦略として T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害作用とカンナビノイド受容体刺激作用を併せ持つ薬物を証明したい。さらに、抗不整脈薬や抗狭心症薬として使用されている bepridil や定型抗精神病薬である pimozide が T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害活性を有することが知られていることから、T型  $\text{Ca}^{2+}$ チャネル阻害活性を有する既存薬品の臓器痛に対する有効性についても検討した。

## 3. 研究の方法

### 1) ブチル酸誘起 IBS モデルマウスの作製および結腸痛の評価

マウス結腸内にブチル酸を反復投与し、IBS モデルを作製する。結腸痛は、下腹部への von Frey filament 刺激に対する痛覚過敏やアロディニアの検出、結腸伸展刺激に対する侵害受容行動の測定により評価する。

### 2) TNBS 誘起結腸痛モデルマウスの作製および結腸痛あるいは結腸過敏の評価

イソフルラン麻酔下でマウスに TNBS 2mg/mouse を 50  $\mu\text{L}$  の用量で結腸内投与した。腹部関連痛覚過敏および伸展刺激に伴う結腸過敏は TNBS 結腸内投与 6日後に、上記の方法と同様に評価した。

## 4. 研究成果

### 1) Butyrate 処置 ddY マウスにおける下腹部関連痛覚過敏および結腸過敏に対する T型カルシウムチャネル阻害薬の影響

ddY マウスに butyrate を反復結腸内投与すると、腹部関連痛覚過敏および結腸伸展刺激に対する結腸過敏が認められ、これらは、選択的 Tチャネル阻害薬である TTA-A2 あるいはホップ由来の Tチャネル阻害薬である 6-PNG によって有意に抑制された。

### 2) C57BL/6 マウスにおける butyrate 誘起腹部関連痛覚過敏および結腸過敏に対する $\text{Cav}3.2$ 遺

伝子欠損の影響

Butyrate 誘起結腸痛への Cav3.2 遺伝子欠損の影響を検討するため、C57BL/6 背景の野生型および Cav3.2 KO マウスを用いて実験を行った。butyrate を野生型 C57BL/6 マウスの結腸内に投与すると、関連痛覚過敏および伸展刺激による結腸過敏が認められ、これらは T チャンネル阻害薬である、TTA-A2 1 mg/kg の腹腔内投与によって抑制された (Fig. 1)。さらに、野生型 C57BL/6 マウスで認められた butyrate 誘起腹部関連痛覚過敏および結腸伸展刺激に伴う知覚過敏は、Cav3.2 KO マウスではほぼ完全に消失していた (Fig. 1)。

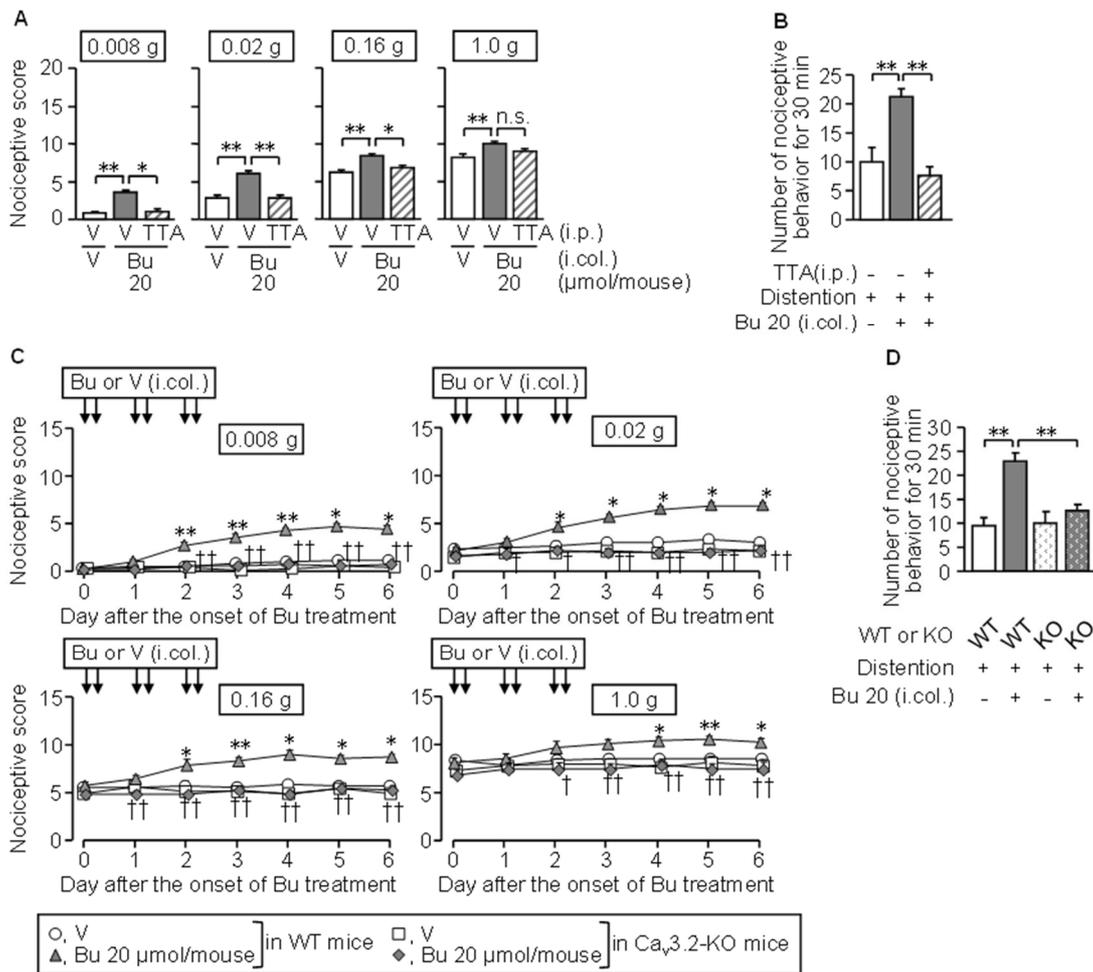


Fig. 1

3) Butyrate 処置 ddY マウスにおける下腹部関連痛覚過敏および結腸過敏に対する CB<sub>1</sub> および CB<sub>2</sub> 受容体刺激薬の影響

CB<sub>1</sub> 受容体刺激薬 ACEA は、butyrate 誘起結腸過敏を強く抑制したが、腹部関連痛覚過敏は影響しなかった。また、CB<sub>2</sub> 受容体刺激薬 AM1241 は、butyrate 誘起腹部関連痛覚過敏および結腸過敏のどちらも抑制しなかった。

4) TNBS 誘起腹部関連痛覚過敏および伸展刺激に伴う結腸過敏に対する T 型カルシウムチャンネル阻害薬の効果

IBD モデルとしてよく用いられる TNBS 処置マウスにおける結腸過敏への T 型カルシウムチャンネルへの関与を検討した。その結果、TNBS 処置 2~6 日後に、下腹部における関連痛覚過敏と、伸展刺激に対する結腸過敏が認められ、これらはすべて T チャンネル阻害薬である TTA-A2 によって有意に抑制された。

5) TNBS 処置マウスの結腸痛および伸展刺激に伴う結腸過敏に対する bepridil および pimoizide の効果

TNBS 誘起下腹部関連痛覚過敏および結腸過敏は、bepridil および pimoizide により抑制された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsui Kazuki, Tsubota Maho, Fukushi Saaya, Koike Nene, Masuda Hiroshi, Kasanami Yoshihito, Miyazaki Takaya, Sekiguchi Fumiko, Ohkubo Tsuyako, Yoshida Shigeru, Mukai Yutaro, Oita Akira, Takada Mitsutaka, Kawabata Atsufumi	4. 巻 140
2. 論文標題 Genetic deletion of Cav3.2 T-type calcium channels abolishes H2S-dependent somatic and visceral pain signaling in C57BL/6 mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 310 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.07.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubota Maho, Kawabata Atsufumi	4. 巻 154
2. 論文標題 Regulation of Cav3.2-mediated pain signals by hydrogen sulfide	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Folia Pharmacologica Japonica	6. 最初と最後の頁 128 ~ 132
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1254/fpj.154.128	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsubota Maho, Matsui Kazuki, Nakano Maki, Kajitani Rie, Ishii Yuko, Tomochika Ken, Nishikawa Yuta, Fukushi Saaya, Yamagata Ayumu, Sekiguchi Fumiko, Okada Takuya, Toyooka Naoki, Kawabata Atsufumi	4. 巻 887
2. 論文標題 Essential role of Cav3.2 T-type calcium channels in butyrate-induced colonic pain and nociceptor hypersensitivity in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 European Journal of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 173576 ~ 173576
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ejphar.2020.173576	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsui Kazuki, Mukai Yutaro, Sakakura Kota, Wada Kyoichi, Nakamura Tsutomu, Kawabata Atsufumi, Terakawa Nobue, Hayakawa Naoki, Kusano Kengo, Hosomi Kouichi, Yokoyama Satoshi, Takada Mitsutaka	4. 巻 59
2. 論文標題 Relationship between serum bepridil concentration and corrected QT interval	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int. Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 63 ~ 70
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5414/CP203843	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 東本紅瑠美、上野山桐子、西川裕之、関口富美子、坪田真帆、岡田卓哉、豊岡尚樹、川畑篤史
2. 発表標題 中分子ヘパリニルフェニルアラニンのRAGE阻害活性とマウスにおけるoxaliplatin誘発性末梢神経障害およびbutyrate誘起結腸痛に対する抑制作用
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山縣歩夢、松井和樹、坪田真帆、川畑篤史
2. 発表標題 生体内においてトロンピン・トロンボモジュリン系は内臓痛を抑制的に制御している
3. 学会等名 第69回日本薬学会関西支部総会・大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sekiguchi, F., Kasanami, Y., Onishi, R., Tsubota, M., Miyazaki, T., Hiramoto, S., Okazaki, K., Nguyen, H.D., Okada, T., Toyooka, N., Yoshida, S., Ohkubo, T., Kawabata, A.
2. 発表標題 6-Prenylnarigenin and its derivative, KTt45, are mixed T-type Ca <sup>2+</sup> channel inhibitors/CB <sub>2</sub> receptor agonists: antinociceptive activity in neuropathic and visceral pain models.
3. 学会等名 11th Congress of the European Pain Federation EFIC (2019 Pain in Europe XI), (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsui, K., Fukushi, S., Koike, N., Yamagata, A., Tsubota, M., Mukai, Y., Oita, A., Takada, M., Kawabata, A.
2. 発表標題 Critical role of Cav3.2 T-type calcium channels in H <sub>2</sub> S-dependent somatic and visceral pain signaling in mice.
3. 学会等名 11th Congress of the European Pain Federation EFIC (2019 Pain in Europe XI), (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪田真帆、川畑篤史.
2. 発表標題 硫化水素によるCav3.2を介する疼痛シグナルの調節.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 笠波嘉人、大西伶佳、木野貴博、関口富美子、坪田真帆、宮崎貴也、平本志於里、岡崎杏子、Nguyen Huy Du、岡田卓哉、豊岡尚樹、吉田繁、大久保つや子、川畑篤史.
2. 発表標題 T型カルシウムチャネル、カンナビノイド受容体および難治性疼痛に及ぼすホップ成分6-prenylnaringeninとその誘導体Kt45の効果.
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪田真帆、川畑篤史
2. 発表標題 硫化水素によるCav3.2を介する疼痛シグナルの調節
3. 学会等名 第92回日本薬理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坪田真帆、川畑篤史
2. 発表標題 内臓痛発現における硫化水素および過硫化物の役割
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsui, K., Nakano, M., Tomochika, K., Tsubota, M., Kawabata, A
2. 発表標題 Pharmacological blockade and genetic deletion of Cav3.2 T-type Ca <sup>2+</sup> channels abolish butyrate-induced colonic hypersensitivity in mice
3. 学会等名 17th World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tsubota, M., Matsui, K., Nakano, M. Tomochika, K., Sekiguchi, F., Kawabata, A
2. 発表標題 Role of Cav3.2 T-type calcium channels in the butyrate-induced colonic hypersensitivity in the mouse, a model for irritable bowel syndrome
3. 学会等名 10th International Symposium on Cell/Tissue Injury and Cytoprotection/Organoprotection. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 坪田真帆、松井和樹、中野真希、友近拳、関口富美子、川畑篤史
2. 発表標題 T型Ca <sup>2+</sup> チャネル阻害活性を有するホップ成分6-prenylnaringeninは結腸痛を抑制する
3. 学会等名 第133回日本薬理学会近畿部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山縣歩夢、松井和樹、坪田真帆、西堀正洋、川畑篤史 .
2. 発表標題 トロンピン阻害薬はHMGB1が関与する結腸痛と膀胱痛を増悪させる：内蔵痛制御における内因性トロンボモジュリン/トロンピン系の役割 .
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------