

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08876

研究課題名(和文)慢性疼痛に対する選択的Nav1.9阻害薬開発を目指したNav1.9の抑制機序解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanisms of Nav1.9 inhibition aimed at development of selective Nav1.9 inhibitor for chronic pain

研究代表者

堀下 貴文(Horishita, Takafumi)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40369070

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬としての選択的Nav1.9阻害薬の開発に貢献するために、Nav1.9の抑制機序を分子レベルで解明する実験計画を立てたが、その機能的発現が困難であった。そこで、その他のサブユニットに対する新たな鎮痛薬となりうる薬物の影響解析を行った。その結果、向精神薬であるクロルプロマジン、鎮咳薬であるカルベタペンテン及びベンゾナテートが、神経系に発現する電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニットNav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8機能を濃度依存性に抑制することを発見した。これらの結果は、これら薬物が新たな鎮痛薬となり得る可能性を示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症性疼痛や神経障害性疼痛を成因とする慢性疼痛は治療困難な例が多く、有効な鎮痛薬を開発すべく慢性疼痛の病態について研究が進められてきたが、未だ開発には至っていない。電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav)は慢性疼痛発生機序に重要な役割を持つことが示されており、向精神薬クロルプロマジンや鎮咳薬カルベタペンテン、ベンゾナテートが神経系に発現するNavサブユニット機能を抑制するという今回の発見は、これら薬物が難治性慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬になり得る可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)： We planned the experiments that will elucidate the mechanisms underlying Nav1.9 inhibition to contribute development of selective Nav1.9 inhibitor for refractory chronic pain, however, we failed to express Nav1.9 in *Xenopus* oocytes for analysis. Therefore, we investigated the effects of some drugs that can be novel analgesics on the other sodium channel alpha subunits, using electrophysiological technique. We found that psychotropic drug, chlorpromazine, antitussive drug, carbetapentane and benzonatate inhibit the function of sodium channel alpha subunits that express in neuronal tissue including Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8, dose-dependently. These results would indicate the possibility that these drugs will be novel analgesics for refractory chronic pain.

研究分野：麻酔科学、ペインクリニック

キーワード：慢性疼痛 電位依存性ナトリウムチャンネル 新たな鎮痛薬開発

1. 研究開始当初の背景

(1) 炎症性疼痛や神経障害性疼痛を成因とする慢性疼痛は治療困難な例が多く、有効な鎮痛薬を開発すべく慢性疼痛の病態について研究が進められてきた。慢性疼痛発生機序に関わる多くの分子が報告されており、これらをターゲットにした鎮痛薬の開発が行われてきたが、その複雑な病態のため、難治症例に対する有効な鎮痛薬は未だ存在せず、新たな鎮痛薬の開発が強く望まれている。

(2) 電位依存性ナトリウムチャネル(Na_v)サブユニット、 $Na_v1.9$ も慢性疼痛発生機序に重要な役割を持つことが示されているが、これに対する選択的阻害薬は未だ開発されていない。 $Na_v1.9$ の抑制機序を分子レベルで解明することは、慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬としての選択的 $Na_v1.9$ 阻害薬を開発する上で、重要な鍵になると考えられる。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、未だ治療困難な例が多く、痛みを苦しむ多くの患者が存在する慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬としての選択的 $Na_v1.9$ 阻害薬の開発に貢献するために、 $Na_v1.9$ の抑制機序を分子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

$Na_v\alpha$ サブユニット間におけるアミノ酸配列の違いを利用し、電気生理学的手法、分子生物学的手法、及び行動薬理学的手法を用いて、 $Na_v1.9$ の抑制機序を分子レベルで解明することを目的として研究計画を立てた。

(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 $Na_v1.9$ に対する鎮痛薬の影響解析

$Na_v1.9$ のcRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にチャネルを発現させ、脱分極性ナトリウムカレントに対するこれら薬物の影響をVoltage-Clamp法によって電気生理学的に解析し、その他のサブユニットに対する影響との違いを明らかにする。

(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)と分子生物学的手法を用いた遺伝子変異型 $Na_v1.9$ に対する鎮痛薬の影響解析と、 $Na_v1.9$ のみを選択的に阻害するために重要な部位の同定

(1)で得られた鎮痛薬の $Na_v1.9$ に対する影響とその他のサブユニットへの影響の違いと、 $Na_v1.9$ とその他のサブユニット間のアミノ酸配列の低い相同性を利用し、 $Na_v1.9$ のみを選択的に阻害するために重要と想定される複数の部位を同定し、これらの部位をポイントミューテーションさせて $Na_v1.9$ の遺伝子変異型cRNAを作成する。

作成した遺伝子変異型 $Na_v1.9$ のcRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にチャネルを発現させ、脱分極性ナトリウムカレントに対する鎮痛薬の影響をVoltage-Clamp法によって電気生理学的に解析する。野生型 $Na_v1.9$ に対する抑制作用と比較することによって、 $Na_v1.9$ における鎮痛薬の作用部位を同定する。

(3) $Na_v1.9$ 遺伝子変異マウスと慢性疼痛モデルマウスによる鎮痛効果の解析

(1)(2)で同定された作用部位の遺伝子変異マウスを作成する。さらに、野生型マウスと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する。

作成した野生型マウスと遺伝子変異マウスの慢性疼痛モデルマウスに対する鎮痛薬の効果を行動薬理的に解析する。これにより、分子生物学的・電気生理学的に同定された $Na_v1.9$ の選択的阻害に重要な部位が、鎮痛に関与しているかどうかの確認ができる。

(1)～(3)の結果により、 $Na_v1.9$ を選択的に阻害するために重要な構造の同定と、慢性疼痛における $Na_v1.9$ 機能抑制による鎮痛効果の全貌が明らかとなる。

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 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ に対する抗精神薬クロルプロマジンの影響解析

クロルプロマジンによる神経系に発現する5つの Na_v サブユニットの抑制効果

クロルプロマジンは、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ の脱分極性ナトリウムカレントを濃度依存性に抑制した。不活性化状態における IC_{50} 値はそれぞれ、 15.5 ± 1.3 、 28.1 ± 2.3 、 21.0 ± 1.0 、 19.5 ± 2.5 、 $27.3 \pm 3.0 \mu\text{mol/L}$ ($n=6$)であった。サブユニット間における作用の違いはそれほど大きくはなかったが、 $Na_v1.2$ に対する抑制効果が最も強く、 $Na_v1.2$ の IC_{50} 値は、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.8$ と比べて有意に低い値であった ($n=6$, $p < 0.01$)。

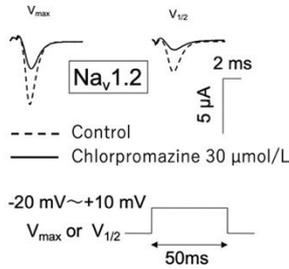


図1 The peak Na⁺ inward currentに対するクロルプロマジンの影響

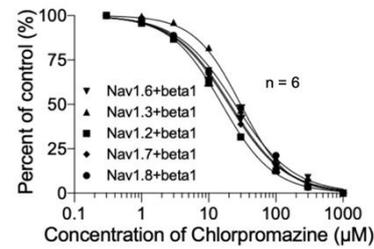
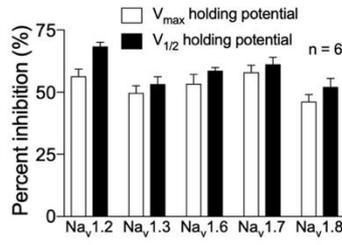


図2 クロルプロマジジンによる抑制効果の濃度反応曲線

ナトリウムチャンネル活性化に対するクロルプロマジジンの影響

クロルプロマジジンは、不活性化状態において、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7における activation curve の midpoint: V_{1/2} を脱分極方向へそれぞれ 4.8、2.5、2.3、1.1mV 有意にシフトさせた (n=6, p < 0.01)。

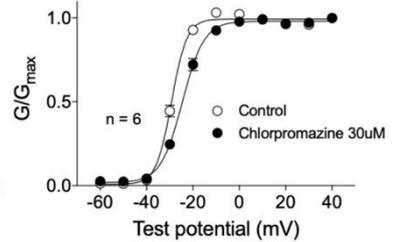
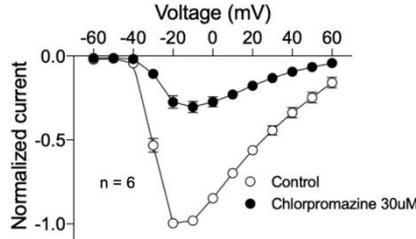


図3 ナトリウムチャンネルの活性化に対するクロルプロマジジンの影響

ナトリウムチャンネル不活性化に対するクロルプロマジジンの影響

クロルプロマジジンは全てのサブユニット、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8において、inactivation curve の midpoint: V_{1/2} を過分極方向はそれぞれ 11.0、7.5、9.4、7.7、5.6mV 有意にシフトさせた (n=6, p < 0.01)。

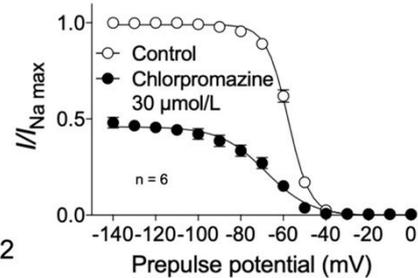
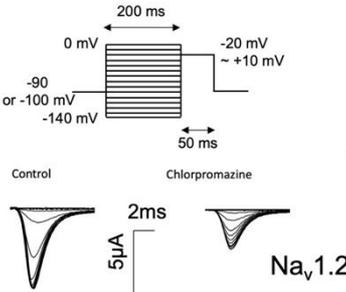


図4 ナトリウムチャンネルの不活性化に対するクロルプロマジジンの影響

使用依存性ブロックについての解析

10Hz で 60回 20ms 脱分極させて発生させたカレントに対するクロルプロマジジンの影響を調べたところ、クロルプロマジジンは全てのサブユニットにおいて、ナトリウムカレントの plateau を有意に抑制し、クロルプロマジジンの使用依存性効果が証明された。

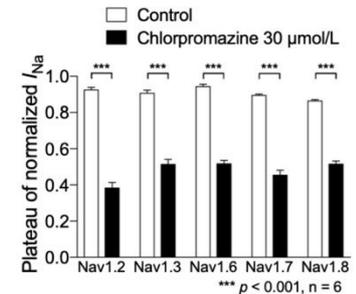
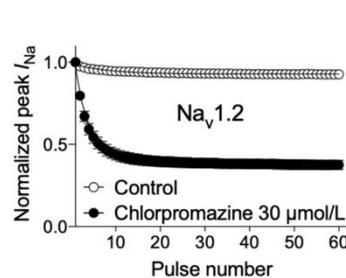


図5 使用依存性ブロックに関する解析

～の結果より、クロルプロマジジンは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8機能を濃度依存性に抑制し、Nav1.2に対する効果が最も強いことが示された。その抑制機序の解析によって、クロルプロマジジンは、Nav1.8以外のサブユニットに対してチャンネルの活性化を抑制し、全てのサブユニットに対して不活性化を促進すること、さらに、その抑制効果には使用依存性効果があることが認められた。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8 に対する鎮咳薬、カルベタペンテンの影響解析

カルベタペンテンによる神経系に発現する5つのNav サブユニットの抑制効果

カルベタペンテンは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8の脱分極性ナトリウムカレントを濃度依存性に抑制し、不活性化状態における IC₅₀ 値はそれぞれ、19.7 ± 1.9、27.4 ± 3.3、22.0 ± 1.4、23.3 ± 0.9、44.9 ± 3.8 μmol/L (n=6) であった。

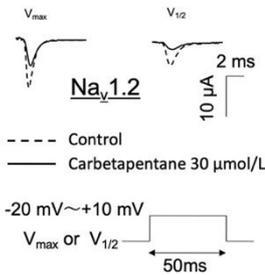


図6 The peak Na⁺ inward currentに対するカルベタペンテンの影響

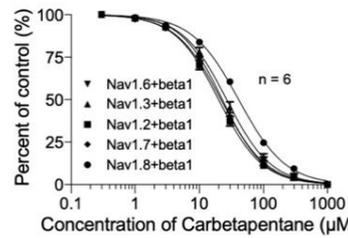
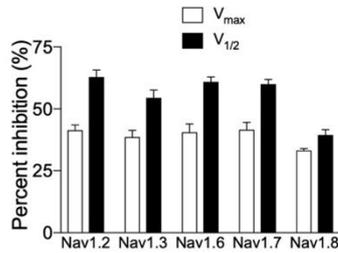


図7 カルベタペンテンによる抑制効果の濃度反応曲線

ナトリウムチャンネル活性化に対するカルベタペンテンの影響

カルベタペンテンは、不活性化状態において、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**における**activation curve**の**midpoint: V_{1/2}**を脱分極方向へそれぞれ**3.1**、**2.8**、**4.0**、**1.1**、**3.8mV**有意にシフトさせた ($n=6$, $p < 0.05$)。

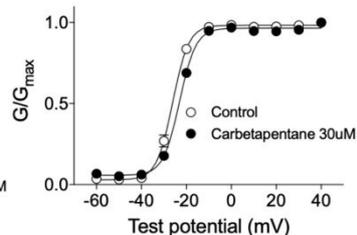
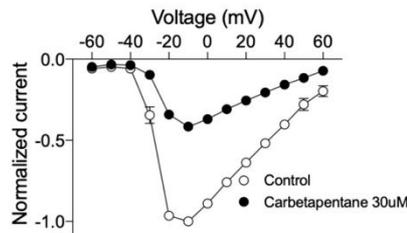


図8 ナトリウムチャンネルの活性化に対するカルベタペンテンの影響

ナトリウムチャンネル不活性化に対するカルベタペンテンの影響

カルベタペンテンは全てのサブユニット、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**において、**inactivation curve**の**midpoint: V_{1/2}**を過分極方向へそれぞれ**10.6**、**8.7**、**5.5**、**8.8**、**5.9mV**有意にシフトさせた ($n=6$, $p < 0.01$)。

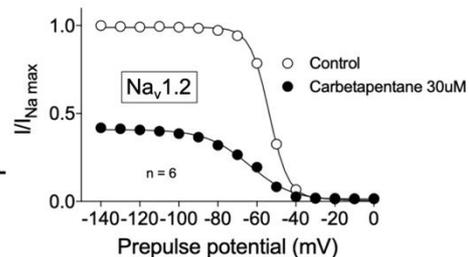
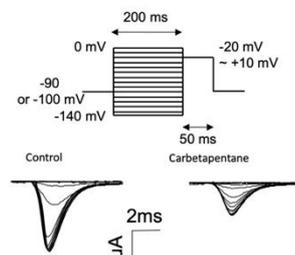


図9 ナトリウムチャンネルの不活性化に対するカルベタペンテンの影響

使用依存性ブロックについての解析

10Hzで**60回20ms**脱分極させて発生させたカレントに対するカルベタペンテンの影響を調べたところ、カルベタペンテンは全てのサブユニットにおいて、ナトリウムカレントの**plateau**を有意に抑制し、カルベタペンテンの使用依存性効果が証明された。

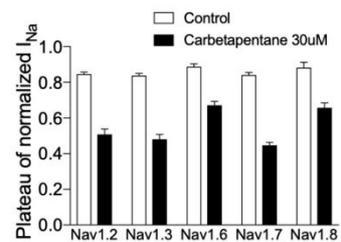
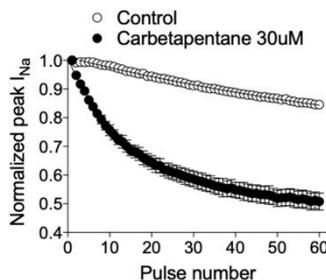


図10 使用依存性ブロックに関する解析

～の結果より、カルベタペンテンは、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**機能を濃度依存性に抑制することが示された。その抑制機序に関する解析によって、カルベタペンテンは、全てのサブユニットに対してチャンネルの活性化を抑制し、不活性化を促進すること、さらに、その抑制効果には使用依存性効果があることが認められた。

(2) アフリカ卵母細胞発現系を用いた Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, Nav1.8 に対する非麻薬性鎮咳薬、ベンゾナテートの影響解析

ベンゾナテートによる神経系に発現する5つのNav サブユニットの抑制効果

ベンゾナテートは、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**の脱分極性ナトリウムカレントを濃度依存性に抑制し、不活性化状態における**IC₅₀**値はそれぞれ、**7.6 ± 0.6**、**18.7 ± 1.9**、**8.0 ± 0.6**、**9.0 ± 1.4**、**23.3 ± 3.1 μmol/L** ($n=6$)であった。また、**Nav1.2**、**Nav1.6**、**Nav1.7**への作用は、**Nav1.3**、**Nav1.8**への作用と比較して有意に強い効果であった ($p < 0.05$)。

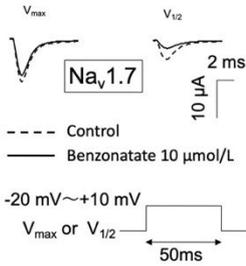


図11 The peak Na⁺ inward currentに対するベンゾナテートの影響

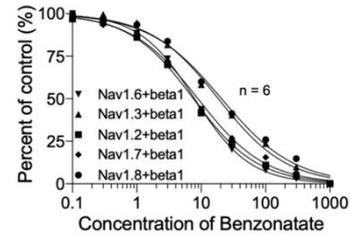
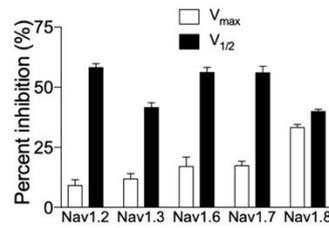


図12 ベンゾナテートによる抑制効果の濃度反応曲線

ナトリウムチャンネル活性化に対するベンゾナテートの影響

ベンゾナテートは、不活性化状態において、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**における **activation curve** の **midpoint** : **V_{1/2}**を脱分極方向へそれぞれ **5.2**、**2.5**、**5.5**、**2.2**、**0.5mV** 有意にシフトさせた (**n=6**、**p < 0.05**)

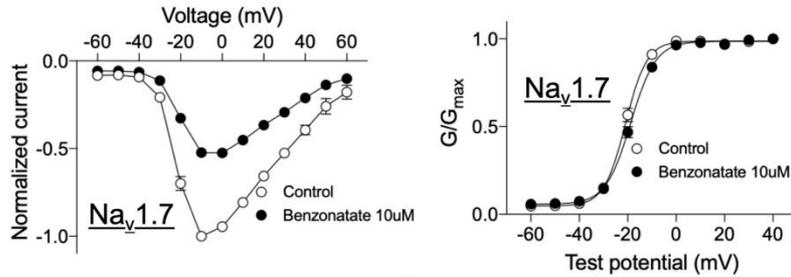


図13 ナトリウムチャンネルの活性化に対するベンゾナテートの影響

ナトリウムチャンネル不活性化に対するベンゾナテートの影響

ベンゾナテートは全てのサブユニット、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**において、**inactivation curve** の **midpoint** : **V_{1/2}**を過分極方向はそれぞれ **8.0**、**8.0**、**9.0**、**9.1**、**12.0mV** 有意にシフトさせた (**n=6**、**p < 0.01**)

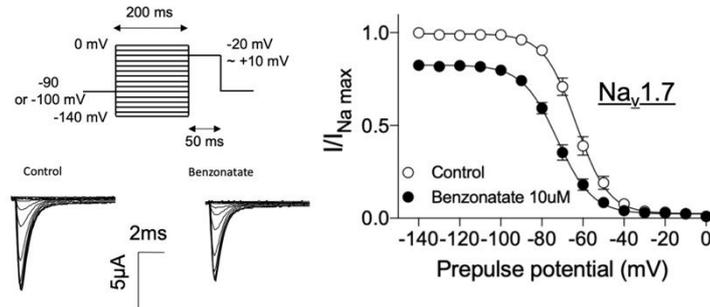


図14 ナトリウムチャンネルの不活性化に対するベンゾナテートの影響

使用依存性ブロックについての解析

10Hz で **60回 20ms** 脱分極させて発生させたカレントに対するベンゾナテートの影響を調べたところ、全てのサブユニットに対して、ベンゾナテートの使用依存性効果は認められなかった。

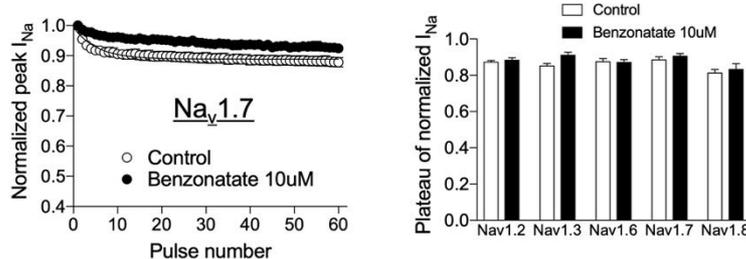


図15 使用依存性ブロックに関する解析

～の結果より、ベンゾナテートは、**Nav1.2**、**Nav1.3**、**Nav1.6**、**Nav1.7**、**Nav1.8**機能を濃度依存性に抑制したが、**Nav1.3**、**Nav1.8**に対する作用と比較して、**Nav1.2**、**Nav1.6**、**Nav1.7**に対する作用の方が強い作用であることが示された。その抑制機序の関する解析によって、ベンゾナテートは、全てのサブユニットに対してチャンネルの活性化を抑制し、不活性化を促進することが示されたが、その抑制効果には使用依存性効果は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 堀下貴文、堀下玲子、南智子、緒方裕一、川崎貴士
2. 発表標題 クロルプロマジンは電位依存性ナトリウムチャンネル サブユニット、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8機能を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第66回学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------