

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09382

研究課題名(和文) 脊髄後根神経節細胞における電位依存性ナトリウムチャネルの麻酔機序に果たす機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of voltage-gated sodium channel in anesthesia mechanism using dorsal root ganglion cells

研究代表者

南 浩一郎 (MINAMI, KOUICHIRO)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：70279347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではNav1.7とオピオイド受容体(OR)への麻酔薬・鎮痛薬の作用を培養脊髄後根神経節細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析した。今研究期間では予備的な結果は得られたものの、直接的なNav1.7とORの作用の関連は完全な解析には至らなかった。しかし、カルバクロールのNavに対する作用を明らかにし、さらに局所麻酔薬の作用機序の1つである一過性受容体電位パニロイド受容体サブタイプ3(TRPV3)チャネルに対する局所麻酔薬の非競合的阻害効果を明らかにした。局所麻酔薬が濃度依存的にTRPV3チャネルからの2APB活性化電流を阻害した。本結果は局所麻酔薬の作用機序の一つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではNav1.7とオピオイド受容体(OR)への麻酔薬・鎮痛薬の作用を培養脊髄後根神経節細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析した。本研究は電位依存性ナトリウムチャネルの鎮痛機序への関与の一部を明らかにするものであり、社会的な意義があると考えられる。また、今回一過性受容体電位パニロイド受容体サブタイプ3(TRPV3)チャネルに対する局所麻酔薬の非競合的阻害効果を明らかにした。本結果は局所麻酔薬の作用機序の一つと考えられ、今後の研究の発展に繋がると考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, the effects of anesthetics and analgesics on Nav1.7 and opioid receptors (OR) were analyzed in cultured dorsal root ganglion cells and African turkey oocytes expression system. Although preliminary results were obtained during this study period, the direct relationship between Nav1.7 and the action of OR was not completely analyzed. However, we revealed a non-competitive inhibitory effect of local anesthetics on the transient receptor potential vanilloid receptor subtype 3 (TRPV3) channel, which is one of the mechanisms of action of local anesthetics. Local anesthetics inhibited the 2APB activation current from the TRPV3 channel in a concentration-dependent manner. These inhibitions were not mediated by the intracellular signaling cascade. This result was considered to be one of the mechanisms of action of local anesthetics.

研究分野：麻酔科学

キーワード：局所麻酔薬 Nav1.7 オピオイド受容体(OR) パニロイド受容体サブタイプ3 麻酔薬 鎮痛薬 カルバクロール

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

麻酔・鎮痛薬の薬理機序は未だに解決されておらず、解明のための新たな研究が求められている。麻酔薬や鎮痛薬の薬理機序には GABAA 受容体やニコチン性アセチルコリン受容体などのイオンチャネルへの作用が古くから研究されてきたが (Nature 1998, 392:390-7) 現在ではそれだけでは説明できないことが明らかになり、麻酔薬や鎮痛薬のメカニズムは未だ不明な点が多い。最近のヒューマングゲノムの解析が進み、生体内リガンドが見つかっていない多くの GPCR が数多く存在することが明らかになっている。これらの GPCR は神経系に発現しており、麻酔薬・鎮痛薬の作用機序に関係していることが予想され、麻酔・鎮痛機序解明に重要である。我々は、今まで様々な Gq 結合型 GPCR だけでなく、Gs 蛋白結合、Gi 蛋白結合 GPCR に対する作用を解析する技術を確立し、数多くの GPCR に対する麻酔薬、鎮痛薬の影響を報告してきた。(総説参照 Minami K, et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2015 388:999-1007. Minami K & Uezono Y. J Anesth. 2013;27:284-292. Minami K, et al. J Pharmacol Sci. 2007 103:253-60. Minami K, Uezono Y. Curr Pharm Des. 2006;12:1931-1937.)

特に、近年は主に疼痛に関与するオピオイド受容体 (OR) に対する麻酔薬、鎮痛薬の作用を解析してきた。当初、麻酔薬は OR を増強するのではないかと予想していたが、実験の結果から麻酔薬は OR を抑制していた (左図参照)。これらの結果は麻酔薬の疼痛機序に大きな疑問を呈したままになっている。(Minami K et al. J Anesth. 2015;29:475-479. Minami K J Pharmacol Sci. 2011;115:421-424. Minami K et al. Pharmacology. 2011;88:127-132. Minami K, et al. J Pharmacol Sci. 2010;112:424-431)

一方、麻酔・鎮痛機序においてイオンチャネルは極めて重要な機能を果たすと考えられている。麻酔薬、鎮痛薬の作用に関しては GABAA 受容体などリガンド依存性イオンチャネルについては研究が進んでいるのに対して、電位依存性ナトリウムチャネル (Nav チャネル) への作用はまだ不明な点が多い。特に、化学伝達物質の神経終末部からの遊離に必要な神経の興奮伝導や神経終末部での Ca²⁺ チャネル開口に関わる Nav チャネルに及ぼす麻酔薬、鎮痛薬の影響は解析が遅れており、近年の我々の研究により、Nav チャネルに対する麻酔薬の影響が少しずつ明らかになったばかりである。(Horishita T et al. J Pharmacol Sci. 2018;137:93-97. Horishita T et al. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2017;390:1255-1270. Horishita T, et al. Anesthesiology. 2014;121:620-31. Okura D, Horishita T, et al. Anesth Analg. 2014;118:554-62. Yokoyama T, Minami K, Sudo Y, Horishita T, et al. J Anesth. 2011;25:609-613.

さらに最近、脊髄後根神経節 (dorsal root ganglion; DRG) 細胞などに存在する Nav1.7 のノックアウトマウスでは、生涯にわたる内因性の痛覚消失が引き起こされ、その原因として μ OR によって媒介される抗侵害受容性オピオイドシグナル伝達の効力が促進され、オピオイドがテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流をより効果的に阻害したためであるという報告がなされ、Nav チャネルとオピオイド受容体の疼痛機序における関係性が注目されている (Sci. Signal. 10, eaah4874 2017)。また、オピオイドは中枢神経系で Nav チャネルを直接抑制する報告もなされている (Haeseler G, et al., Pain. 2006;126:234-44, Leffler A, et al., Anesthesiology. 2012;116:1335-46)。Nav チャネルの機能が OR によりどのように制御されているのか、また、相互作用があればこれが麻酔機序にどのように関係しているかを解明することは麻酔薬、鎮痛薬の疼痛機序解明にとっては非常に興味深い。

我々は、今まで様々な Gq 結合型 GPCR だけでなく、Gs 蛋白結合、Gi 蛋白結合 GPCR に対する作用を解析する技術を確立し、数多くの GPCR に対する麻酔薬、鎮痛薬の影響を報告してきた。

近年は主に疼痛に関与する OR に対する受容体への麻酔薬、鎮痛薬の作用を解析してきた。当初、麻酔薬は μ OR を増強するのではないかと仮説を立てていたが、実験の結果から麻酔薬は μ OR を抑制することが明らかになった。これらの結果は予想と大きく異なり、麻酔薬の疼痛機序に大きな疑問を呈したままになっていた。

また OR と並行して Nav チャネルに対する麻酔薬の影響の解析を続けてきた。Nav1.7 は麻酔薬セボフルランによって抑制されるなど、麻酔薬が Nav チャネルに抑制効果を持つことがわかってきた。しかし、この抑制は大きなものではなく臨床濃度ではわずかしかないのであった。

最近になって、DRG 細胞などに存在する電位依存性ナトリウムチャネル Nav1.7 は、GPCR によって媒介される侵害受容促進性および抗侵害受容性の細胞内シグナル伝達の効力とバランスを調節しており、Nav1.7 が欠損するとそのバランスは抗侵害受容性に傾くため、生涯にわたる内因性の痛覚消失が引き起こされるという報告がなされた (Sci. Signal. 10, eaah4874 2017)。さらにオピオイドは中枢神経系で Nav チャネルを直接抑制する可能性を示唆する報告もなされている (Haeseler G, et al., Pain. 2006;126:234-44, Leffler A, et al., Anesthesiology. 2012;116:1335-46)。これらの報告により Nav チャネルと OR の相互作用は疼痛機序に関係して

いることを示唆している。

実際、生体で Nav チャンネルの機能が麻酔薬、鎮痛薬によりどのように制御されているのか、Nav チャンネルの機能が OR によりどのように制御されているのか、また Nav チャンネルと OR の相互作用があればこれが麻酔機序にどのように関係しているかを解明することは、アフリカツメガエル卵母細胞発現系での In vitro 再構築系での結果の答えに結びつくと思われ、麻酔薬、鎮痛薬の疼痛機序解明にとって必然と考えられた。そこで今回、Nav1.7、 μ OR が存在する痛みの経路として重要な DRG とアフリカツメガエル卵母細胞発現系において Nav チャンネルと OR の麻酔機序、疼痛機序における関係性を解明することを計画した。

2. 研究の目的

概要) 麻酔・鎮痛薬の薬理機序は未だに解明されていない。イオンチャンネルは麻酔・鎮痛機序において極めて重要な役割を果たすが、電位依存性 Na⁺チャンネル (Nav チャンネル) への麻酔薬、鎮痛薬の作用は十分に知られていない。最近、Nav チャンネル 1.7 (Nav1.7) が欠損すると μ オピオイド受容体 (μ OR) によって媒介される抗侵害受容性オピオイドシグナル伝達の効力が促進され、オピオイドはテトロドトキシン抵抗性ナトリウム電流を阻害したという報告がなされ、Nav チャンネルと μ OR の疼痛機序における関係性が注目されている。Nav チャンネルが麻酔薬で影響されるのか、また μ OR と相互作用があるのか、またこの相互作用が麻酔機序にどのように関係しているかを解明することは非常に興味深い。本研究では Nav1.7 と μ OR への麻酔薬・鎮痛薬の作用を培養脊髄後根神経節細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析する。さらに、一過性受容体電位パニロイド受容体サブタイプ 3 (TRPV3) チャンネルに対する麻酔薬、鎮痛薬の影響も明らかにしそのメカニズムを解明する。

(2) 本研究の目的

今回のプロジェクトでは我々は Nav チャンネルが麻酔、鎮痛薬のターゲットになっているのか、Nav チャンネルと OR との関係はどうなっているのか、またその細胞内メカニズムはどうなっているのか、麻酔薬は Nav チャンネルと OR とのクロストークにどのように働いているのかを解析し麻酔機序に果たす役割を解明することを目的としている。そのために、痛み刺激が脊髄後角へと伝達される経路であり疼痛機序に関与し、Nav1.7 と μ OR が発現している DRG 細胞と内部のメカニズムが解析可能なアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて電気生理学的解析を行い、上記目的を達成する。また、同時にアフリカツメガエル卵母細胞発現系に TRPV3 を発現させ、麻酔薬、鎮痛薬の影響も確認した。

3. 研究の方法

SD 系雄性ラット培養 DRG 細胞を実験に使用する。培養 DRG 細胞を灌流させた小水槽内で保持し、室温下でホールセル記録を行い、Nav チャンネルに対する麻酔薬、鎮痛薬の影響を検討した。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて Nav1.7 に対しての麻酔薬の作用を解析した。さらにアフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いて Nav1.7 に対しての DAMGO の直接作用を解析する。Nav1.7 を発現させたアフリカツメガエル卵母細胞を DAMGO で刺激して Nav1.7 の電位変化に対する Na⁺電流を観察した。また、アフリカツメガエル卵母細胞発現系に TRPV3 を発現させて、同様に麻酔薬、鎮痛薬の影響も解析した。

4. 研究成果

本研究では Nav1.7 とオピオイド受容体 (OR) への麻酔薬・鎮痛薬の作用を培養脊髄後根神経節細胞とアフリカツメガエル卵母細胞発現系で解析した。まず、モノテルペン誘導体のカルバクロールが Nav を抑制することを確認することができた。(Horishita T et al J Pharmacol Sci. 2020 142:140-147.) しかし、今研究期間では予備的な結果は得られたものの、直接的な Nav1.7 と OR の作用の関連は証明することはできなかった。これらの原因として、コロナ感染症拡大により、実験の施設の制限等も加わり時間的な制限の影響が大きかった。しかし、局所麻酔薬の作用機序の 1 つである一過性受容体電位パニロイド受容体サブタイプ 3 (TRPV3) チャンネルに対する局所麻酔薬の効果を証明できた。(Horishita R, et al., Anesth Analg.132:1756-1767) 局所麻酔薬リドカイン、メピバカイン、ロピバカインが濃度依存的に TRPV3 チャンネルからの 2APB 活性化電流を阻害した。逆に、これらは高濃度で直接電流を誘発した。リドカインによる TRPV3 の阻害形式は非競合的で、細胞内シグナル伝達カスケードを介してなかった。2APB によって誘発される TRPV3 電流は、細胞外 N-(2,6-ジメチルフェニルカルバモイルメチル) トリエチルアンモニウムプロミド (QX-314) によって減少したが、細胞内 QX-314 やベンゾカインによっては減少しなかった。また、QX-314 は、TRPV3 と Na チャンネルを共発現している卵母細胞の検査に活性化された TRPV3 チャンネルに影響することが示唆された。これらより局所麻酔薬が、荷電形態とチャンネル細孔との細胞外相互作用によって、TRPV3 チャンネル機能を阻害する可能性があることをしめした。局所麻酔薬は薬理的に適切な濃度で TRPV3 の 2APB 誘発電流を抑制しました。これらの効果は、帯電した麻酔薬と TRPV3 チャンネルの細孔との間の細胞外相互作用を介して行われており、局所麻酔薬の作用機序を解明することにつながるということが伺われた。今後も、Nav1.7 と OR の作用の関連を調べるために研究を継続する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Horishita Takafumi, Ogata Yuichi, Horishita Reiko, Fukui Ryo, Moriwaki Kuniaki, Ueno Susumu, Yanagihara Nobuyuki, Uezono Yasuhito, Sudo Yuka, Minami Kouichiro	4. 巻 142
2. 論文標題 Carvacrol inhibits the neuronal voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.3, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in Xenopus oocytes with different potencies	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 140 ~ 147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2019.12.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyano Kanako, Shiraishi Seiji, Minami Koichiro, Sudo Yuka, Suzuki Masami, Yokoyama Toru, Terawaki Kiyoshi, Nonaka Miki, Murata Hiroaki, Higami Yoshikazu, Uezono Yasuhito	4. 巻 20
2. 論文標題 Cisplatin Enhances the Activity of Human Transient Receptor Potential Ankyrin 1 through the Cyclic AMP-Protein Kinase A-A-Kinase Anchoring Protein (AKAP) Pathways	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3271 ~ 3271
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20133271	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Horishita R, Ogata Y, Fukui R, Yamazaki R, Moriwaki K, Ueno S, Yanagihara N, Uezono Y, Yokoyama Y, Minami K, Horishita T.	4. 巻 132
2. 論文標題 Local Anesthetics Inhibit Transient Receptor Potential Vanilloid Subtype 3 Channel Function in Xenopus Oocytes.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesth Analg	6. 最初と最後の頁 1756-1767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1213/ANE.0000000000005546.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔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 福井遼, 緒方裕一, 森脇邦明, 堀下玲子, 堀下貴文
2. 発表標題 止痢薬ロペラミドは温度感受性TRPチャネルファミリー, TRPM8機能を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第67回学術集会
4. 発表年 2020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
研究 分担 者	堀下 貴文 (Horishita Takafumi) (40369070)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

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
---------	---------