

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月17日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791480

研究課題名（和文） 選択的 Na チャネル阻害薬の開発を目指した、吸入麻酔薬・鎮痛薬の作用機序解析

研究課題名（英文） Analysis of the action mechanisms of volatile anesthetics and analgesics aimed at development of selective sodium channel blocker

研究代表者

堀下 貴文（HORISHITA TAKAFUMI）

産業医科大学・医学部・講師

研究者番号：40369070

研究成果の概要（和文）：難治性疼痛に対する新たな鎮痛薬の開発に貢献するため、電位依存性ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_v$ ) に対する鎮痛薬の影響を、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に調べた。その結果、鎮痛作用のあるいくつかのニューロステロイドや、内因性カンナビノイドが、種々の  $\text{Na}_v\alpha$  サブユニット機能を抑制することを確認し、これら薬物の鎮痛作用機序の一つである可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of analgesics on voltage-gated sodium channels electrophysiologically using *Xenopus* oocyte expression system to contribute the development of new analgesics for intractable pain. We demonstrated that some neurosteroids and endocannabinoid having analgesic action inhibited some  $\text{Na}_v\alpha$  subunits functions, suggesting that this effect is one of the action mechanisms of these analgesics.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,300,00	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、麻酔・蘇生学

キーワード：疼痛管理学

## 1. 研究開始当初の背景

癌性疼痛・神経因性疼痛などは、有効な鎮痛薬・疼痛管理が存在せず、痛みに苦しみ多くの患者のため、新たな鎮痛薬の開発が望まれている。電位依存性ナトリウムチャネル ( $\text{Na}_v$ ) の特定のサブユニットは疼痛機序に関連していることが注目されているが、吸入麻酔薬や鎮痛薬のサブユニット選択性効果が示唆されている。従って、鎮痛薬のサブユニット選択性を利用し、鎮痛薬の  $\text{Na}_v$  に対する作用を

分子レベルで解明していくことは、新たな鎮痛薬となる可能性のある選択的 Na チャネル阻害薬の開発に重要な鍵となると考えられる。

## 2. 研究の目的

疼痛機序に関与する Na チャネルサブユニットに対する吸入麻酔薬・鎮痛薬の鎮痛作用としての作用部位あるいは結合部位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。

### 3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた9種の $\alpha$ サブユニットへの吸入麻酔薬・鎮痛薬の影響解析

現在までにクローニングされている内の9種の $\alpha$ サブユニット( $Na_v1.1-1.9$ )のcRNAをアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、チャネルを発現させ、脱分極によるナトリウムカレントに対する吸入麻酔薬・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。

(2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた遺伝子変異株による吸入麻酔薬・鎮痛薬の作用部位の同定

(1)によって得られた結果から、サブユニット間での感受性・作用機序の違いを比較・検討し、特にDRGに発現している $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ 、 $Na_v1.9$ に対する吸入麻酔薬・鎮痛薬の作用部位として重要な部位を同定し、ポイントミューテーションによって $Na_v$ の遺伝子変異株cRNAを作成する。それに対する吸入麻酔薬・鎮痛薬の影響を電気生理学的に解析し、DRGに発現するサブユニットに対する作用部位、作用機序を再構築系の実験にて解明する。

### 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て、 $Na_v1.2$ に対するニューロステロイド、プレグネノロン (PREG)、プレグネノロン硫酸塩 (PS)、デヒドロエピアンドロステロン (DHEA)、デヒドロエピアンドロステロン硫酸塩 (DHEAS)、アルファキサロン (ALP) の影響を調べた。最大カレントの得られる保持電位 $-90mV$  ( $V_{max}$ )と約半分のカレントの得られる保持電位 $-50 \sim -60mV$  ( $V_{1/2}$ )から $-20mV$ に脱分極させ、得られたカレントに対する薬物の影響を調べたところ、 $100\mu mol/L$ の濃度のPS、DHEAS、DHEA、ALPは、 $V_{max}$ と $V_{1/2}$ において、ナトリウムカレントをそれぞれ、 $26 \pm 3$ と $59 \pm 3\%$ 、 $26 \pm 3$ と $40 \pm 4\%$ 、 $31 \pm 3$ と $50 \pm 2\%$ 、 $17 \pm 2$ と $30 \pm 3\%$ 抑制した(図1)。

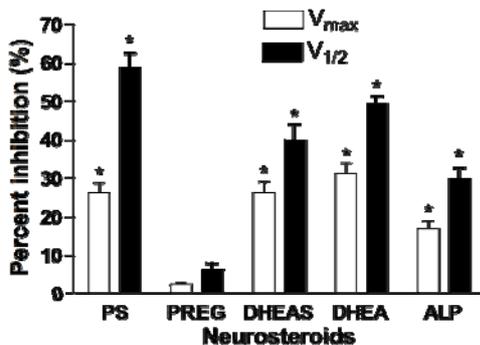


図1  $Na_v1.2$ に対するニューロステロイドの影響

(2) さらに、ニューロステロイドの中で最も強い鎮痛作用を持つプレグナノロン硫酸塩 (PAS) とアロプレグナノロン硫酸塩 (APAS) の $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ に対する影響を調べた。 $100\mu mol/L$ の濃度のPASは $V_{max}$  ( $-90mV$  or  $-100mV$ ) と $V_{1/2}$ において、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ のカレントをそれぞれ、 $31 \pm 5$ と $54 \pm 4\%$ 、 $10 \pm 1$ と $71 \pm 1\%$ 、 $6 \pm 0.4$ と $48 \pm 2\%$ 抑制し、 $Na_v1.8$ のカレントを $39 \pm 6$ と $0.1 \pm 1\%$ 増強した(図2)。また、 $100\mu mol/L$ の濃度のAPASは $V_{max}$  ( $-90mV$  or  $-100mV$ ) と $V_{1/2}$ において、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ のカレントをそれぞれ、 $56 \pm 4$ と $71 \pm 2\%$ 、 $-15 \pm 6$ と $71 \pm 2\%$ 、 $-14 \pm 1$ と $48 \pm 3\%$ 抑制し、 $Na_v1.8$ のカレントを $177 \pm 15$ と $129 \pm 41\%$ 増強した(図3)。( \*  $p < 0.05$ )

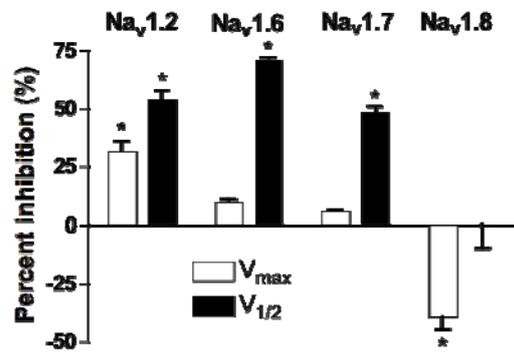


図2 4種の $\alpha$ サブユニットに対するPASの影響

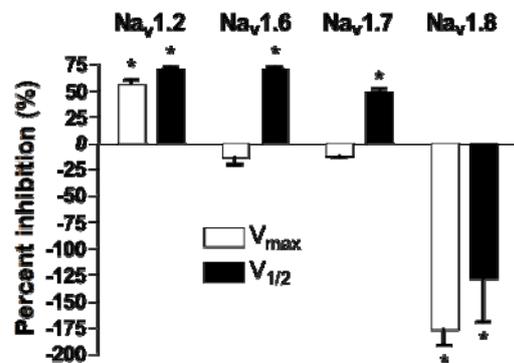


図3 4種の $\alpha$ サブユニットに対するAPASの影響

(3) 次に、抑制効果の認められた $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ に対するPAS、APASの $V_{1/2}$ における濃度反応曲線を作成した。PASの抑制において、濃度反応曲線における $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ の $IC_{50}$ はそれぞれ $82 \pm 5 \mu mol/L$ 、 $54 \pm 4 \mu mol/L$ 、 $111 \pm 5 \mu mol/L$ であった。また、APASの抑制において、濃度反応曲線における $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ の $IC_{50}$ はそれぞれ $15 \pm 1 \mu mol/L$ 、 $37 \pm 3 \mu mol/L$ 、 $151 \pm 8 \mu mol/L$ であり(図4、図5)、APASの $Na_v1.2$ に対する影響が最も強い抑制効果を示した。

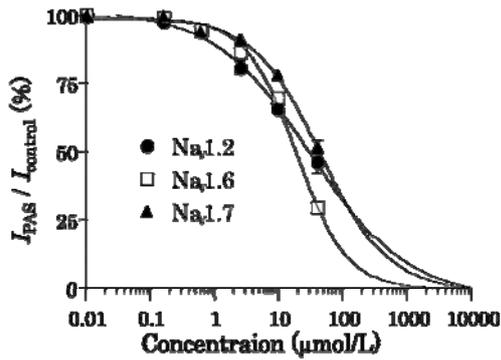


図4 Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7におけるPASの濃度反応曲線

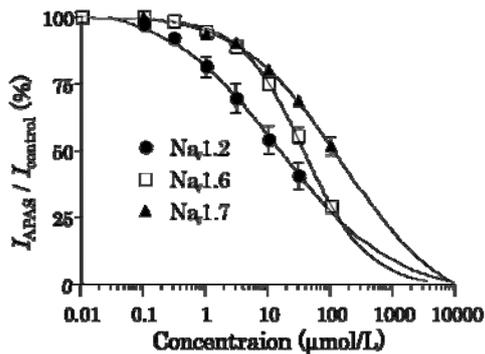


図5 Na<sub>v</sub>1.2, Na<sub>v</sub>1.6, Na<sub>v</sub>1.7におけるAPASの濃度反応曲線

(4) さらに、抑制のメカニズムを解析するために、チャンネルのgatingにおける不活性化に対するPS、APASの影響を調べた。-140mVから0mVまで10mVおきに200msのプレパルスを与え、その後-20mV~-10mVまで50ms脱分極させ、この脱分極性カレントに対するPS、APASの影響を調べた。図6、図7に示したようにNa<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7において、PAS、APASは inactivation curveを過分極方向へシフトさせた。PASによるmidpoint ( $V_{1/2}$ )のシフトは、Na<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7において、それぞれ4mV、9mV、7mVであり、APASによるシフトは、Na<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7において、それぞれ7mV、9mV、7mVであり、全て有意なシフトであった ( $p < 0.05$ )。

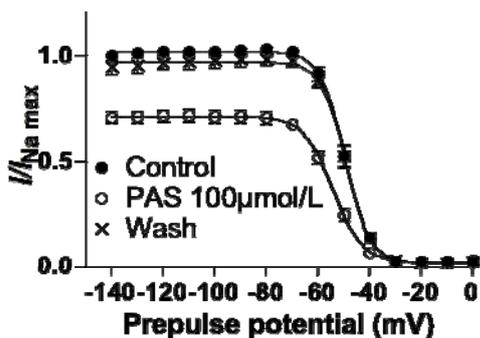


図6 Na<sub>v</sub>1.2の不活性化に対するPASの影響

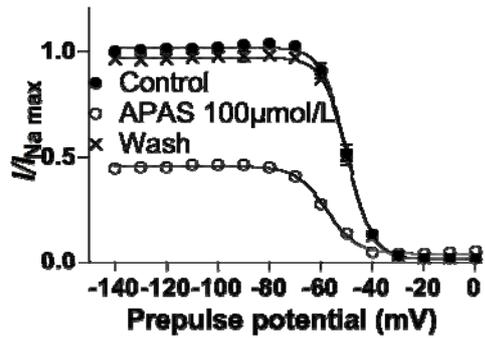


図7 Na<sub>v</sub>1.2の不活性化に対するAPASの影響

従って、チャンネルgatingの不活性化を促進させることが、PAS、APASのナトリウムチャンネル機能の抑制のメカニズムの一つであることが示された。

(1) ~ (4)の結果より、ナトリウムチャンネル機能の抑制がニューロステロイドの生体内での作用機序の一つである可能性が示された。また、PAS、APASがNa<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7に対しては抑制作用を示し、Na<sub>v</sub>1.8に対しては増強作用を示すことは、ニューロステロイドの疼痛機序を考慮・模索する上で重要な発見であり、今後さらなる研究が求められる。

(5) 強い鎮痛作用を持つ内因性カンナビノイド、アナンダマイドanandamide (AEA)のNa<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7、Na<sub>v</sub>1.8に対する影響を調べた。10μmol/Lの濃度のAEAは $V_{max}$  (-90mV or -100mV)と $V_{1/2}$ において、Na<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7、Na<sub>v</sub>1.8のカレントを、それぞれ7.9±2と39±4%、5.7±1と46±3%、8.5±1と34±2%、20±5と27±2%抑制した (図8)。(\*  $p < 0.05$ )

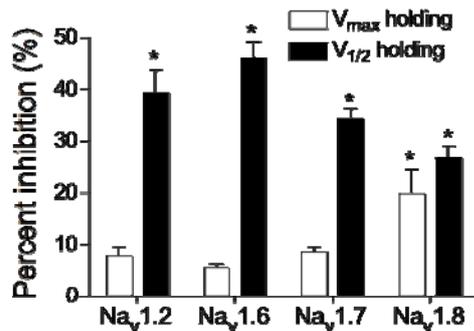


図8 4種のαサブユニットに対するAEAの影響

(6) 次に、Na<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7、Na<sub>v</sub>1.8に対するAEAの $V_{1/2}$ における濃度反応曲線を作成した。図9に示すように、全てのサブユニットにおいて、濃度依存性にナトリウムカレントを抑制し、濃度反応曲線におけるNa<sub>v</sub>1.2、Na<sub>v</sub>1.6、Na<sub>v</sub>1.7、Na<sub>v</sub>1.8のIC<sub>50</sub>はそれぞれ17±3 μmol/L、12±4 μmol/L、27±2 μmol/L、40±4 μmol/Lであった。

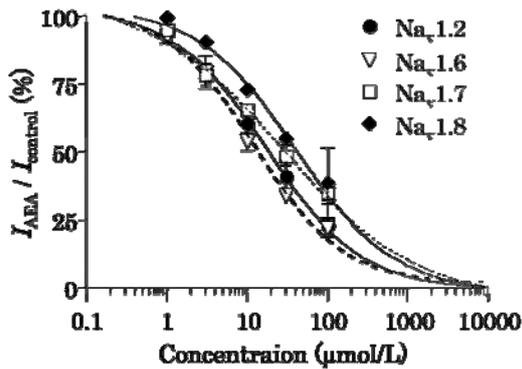


図9 4種の $\alpha$ サブユニットにおけるAEAの濃度反応曲線

(7) さらに、抑制のメカニズムを解析するために、チャンネルのgatingにおける活性化に対するAEAの影響を調べた。 $V_{max}$ または $V_{1/2}$ から60mVまで10mVの間隔で50ms脱分極させて発生させてカレントに対するAEAの影響を調べ、さらにBoltzmannの式より得られたactivation curveのmidpoint ( $V_{1/2}$ )を算出した。AEAは全てのサブユニットにおいて、 $V_{max}$ 、 $V_{1/2}$ ともに $V_{1/2}$ を脱分極方向にシフトさせる傾向にあった(図10、図11)。 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ における $V_{max}$ と $V_{1/2}$ でのシフトは、それぞれ2mVと3mV、2mVと4mV、2mVと2mV、3mVと3mVであった。これにより、全てのサブユニットに対する抑制効果のメカニズムの一つがチャンネルの活性化の抑制であることが示された。

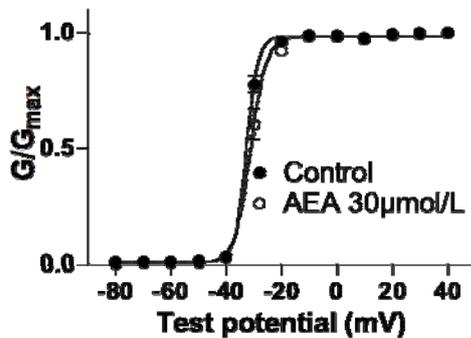


図10  $V_{max}$ における $Na_v1.2$ の活性化に対するAEAの影響

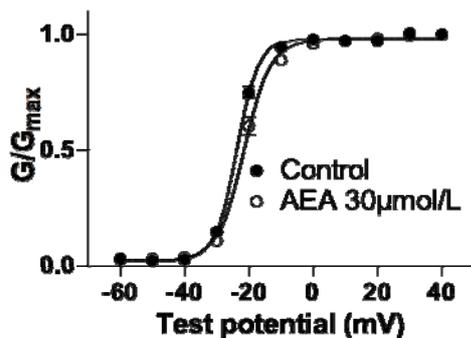


図11  $V_{1/2}$ における $Na_v1.2$ の活性化に対するAEAの影響

(8) 抑制メカニズムの解析として、次にチャンネルのgatingにおける不活性化に対するAEAの影響を調べた。図12に示したように、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ において、AEAはinactivation curveを過分極方向へシフトさせた。AEAによるmidpoint ( $V_{1/2}$ )のシフトは、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ において、それぞれ6mV、5mV、4mV、4mVであった。これにより、全てのサブユニットに対するAEAの抑制効果のメカニズムの一つがチャンネルの不活性化の促進であることが示された。

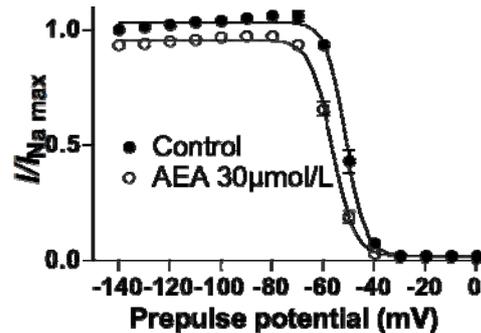


図12  $Na_v1.2$ の不活性化に対するAEAの影響

(5) ~ (8)の結果より、ナトリウムチャンネルの抑制作用が、AEAの作用機序の一つである可能性が示唆された。疼痛機序への関与が強く示唆される、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ にも抑制効果が認められたことは、AEAの鎮痛効果の作用機序である可能性も示唆している。

(9) ニューロステロイド、内因性カンナビノイドのナトリウムチャンネルへの作用を詳しく解析した研究は、国内外ともにほとんど行われていない。これら生体内に存在する鎮痛作用を有する内因性物質の影響を明らかにしたことは、これらの鎮痛作用解明の大きな手がかりとなると考えられる。さらなる研究を重ねることにより、ナトリウムチャンネルの疼痛機序解明に対しても手がかりとなると考えられる。

## 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)

[学会発表] (計2件)

①堀下貴文、内因性カンナビノイド、アナンダマイドの電位依存性ナトリウムチャンネルに対する影響、日本麻酔科学会第58回学術集会、2011年5月20日、神戸国際会議場(神戸)

②堀下貴文、ニューロステロイドの電位依存性ナトリウムチャンネル $Na_v1.2$ 機能に対する影

響、日本麻酔科学会第 57 回学術集会、2010  
年 6 月 3 日、福岡国際会議場（福岡）

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・講師

研究者番号：40369070

(2) 連携研究者

大倉 暖 (OOKURA DAN)

産業医科大学・医学部・研究員

研究者番号：00596710