

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592369

研究課題名(和文) 神経障害性疼痛治療薬の開発を目指した内因性カンナビノイドの疼痛抑制機序の全貌解明

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms of pain relief by endocannabinoids aimed at development of analgesics for neuropathic pain

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛に対する新たな鎮痛薬開発に貢献するため、疼痛機序に關与する受容体・イオンチャネルに対する内因性カンナビノイド、アナンダマイドの影響を、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、アナンダマイドが電位依存性ナトリウムチャネル(Nav)機能を抑制することを発見した。

また、アナンダマイドは温度感受性受容体の一つであるTRPA1受容体機能を増強することを確認し、TRPA1受容体刺激薬である植物精油カルバクロールがNav機能を抑制することを確認した。

これらの結果は、内因性カンナビノイドの疼痛抑制機序を解明するために役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of endocannabinoid, anandamide on receptors or ion channels related to mechanisms of pain electrophysiologically using *Xenopus* oocyte expression system to contribute the development of new analgesics for neuropathic pain. We found that anandamide inhibited voltage-gated sodium channels (Nav) functions.

On the other hand, we demonstrated that anandamide enhanced the functions of TRPA1 receptor, one of temperature-sensitive receptors, and that plant essential oil, carvacrol which are agonist of TRPA1 receptor, suppressed Nav functions.

These results would help to elucidate the mechanisms of pain relief by endocannabinoids.

研究分野：麻酔・疼痛管理学

キーワード：神経障害性疼痛 内因性カンナビノイド アナンダマイド 疼痛抑制機序の解明 新たな鎮痛薬開発

1. 研究開始当初の背景

(1) 慢性疼痛を代表する神経障害性疼痛は、現在存在する鎮痛薬では無効な例が多く、その病態機序に関する研究が進められているが、未だ解明にはいたっておらず、その解明とともに新たな鎮痛薬開発が強く望まれている。

(2) 近年、脳内物質である内因性カンナビノイドが強い鎮痛作用を持つことで、新たな鎮痛薬として期待がもたれているが、開発にはいたっていない。内因性カンナビノイドの疼痛抑制機序そのものが未だ明らかになっておらず、これを解明することが新たな鎮痛薬開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 内因性カンナビノイドの疼痛抑制機序全貌を分子レベルで解明し、神経障害性疼痛に対する新たな鎮痛薬開発に貢献することを目的とした。

(2) 具体的には、疼痛機序に深く関与する受容体・イオンチャネルへの内因性カンナビノイドの影響を明らかにすることを目的とした。

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)による疼痛機序に関与する受容体・イオンチャネルに対する5種の内因性カンナビノイドの影響解析(再構築系における作用解析)

神経障害性疼痛や侵害受容性疼痛に関与すると考えられている受容体・イオンチャネルとして、アデノシン-3'-リン酸(ATP)受容体、電依存性ナトリウムチャネル、NMDA受容体、CGRP受容体、GABA受容体、グリシン受容体などが考えられているが、これらの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、Voltage-clamp法によって、リガンド誘発性電流や電位依存性電流に対する内因性カンナビノイドの影響を解析する。

(2) 電気生理学的手法(パッチクランプ法)による脳-脊髄-末梢神経における疼痛機序に関与する受容体・イオンチャネルに対する5種の内因性カンナビノイドの影響解析(神経細胞を用いた作用解析)

ラット脳スライス、ラット脊髄後角スライスを作成、ラット脊髄後根神経節(DRG)細胞を培養し、の結果より影響が認められた受容体・イオンチャネルにおけるリガンド誘発性電流や電位依存性電流に対する内因性カンナビノイドの影響を、パッチクランプ法を用いて解析する。

(3) 神経障害性疼痛のモデルマウスに対する5種の内因性カンナビノイド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)

神経障害性疼痛モデルマウスの作成  
行動薬理的解析による疼痛抑制効果の解析

作成した神経障害性疼痛モデルマウスに対する5種の内因性カンナビノイドの疼痛抑制効果を実験薬理的に解析する。脳内投与、髄腔内投与、局所投与、および全身投与を行い、それぞれのレベルでの効果を解析する。

(4) ノックアウトマウス・神経障害性疼痛モデルマウスに対する5種の内因性カンナビノイド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)

ノックアウトマウス・神経障害性疼痛モデルマウスの作成

作用部位と考えられる受容体・イオンチャネルのノックアウトマウスを作成し、さらに、ノックアウトマウスの神経障害性疼痛モデルを作成する。

行動薬理的解析による疼痛抑制効果の解析

作成したノックアウトマウス・神経障害性疼痛モデルマウスに対する5種の内因性カンナビノイドの疼痛抑制効果を実験薬理的に解析する。これにより、疼痛抑制機序における種々の受容体・イオンチャネルの関連性などが明らかとなり、さらなる解明につながる。

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内因性カンナビノイド、アナンダマイド anandamide (AEA) の電位依存性ナトリウムチャネル(Nav) $\alpha$ サブユニット、Nav1.2、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8に対する影響解析

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~-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AEAの影響を調べた。10 $\mu$ mol/Lの濃度のAEAは、Nav1.2、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8のカレントを、 $V_{max}$  (-90mV or -100mV) において、それぞれ 7 $\pm$ 2%、6 $\pm$ 1%、9 $\pm$ 1%、21 $\pm$ 5%、 $V_{1/2}$  において、46 $\pm$ 4%、49 $\pm$ 3%、37 $\pm$ 2%、27 $\pm$ 2%抑制した(図1)(\*\* p < 0.01)

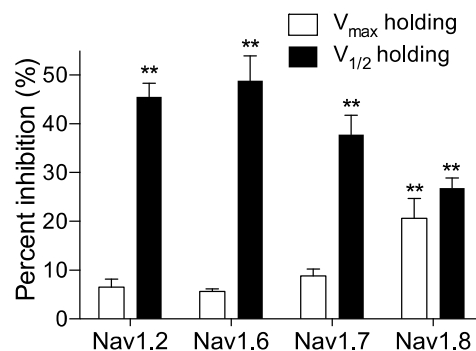


図1 4種の $\alpha$ サブユニットに対するAEAの抑制効果

(2)  $V_{1/2}$ におけるAEAの濃度反応曲線

(1)の結果から、AEAは $V_{max}$ よりも $V_{1/2}$ において強い抑制効果を発揮したことから、 $V_{1/2}$ における濃度反応曲線を作成した。AEAは、全ての $\alpha$ 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、 $Nav_{1.2}$ 、 $Nav_{1.6}$ 、 $Nav_{1.7}$ 、 $Nav_{1.8}$ における $IC_{50}$ 値はそれぞれ、 $17 \pm 3 \mu\text{mol/L}$ 、 $12 \pm 1 \mu\text{mol/L}$ 、 $27 \pm 3 \mu\text{mol/L}$ 、 $40 \pm 14 \mu\text{mol/L}$ であった(図2)。

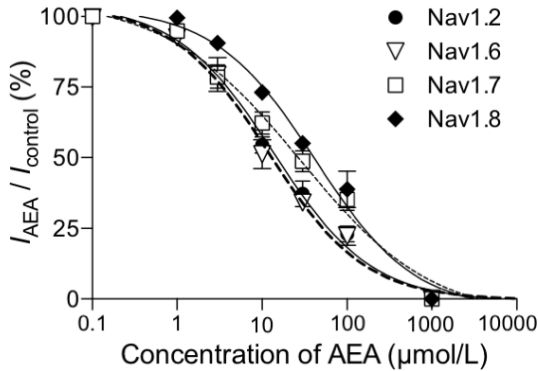


図2 4種の $\alpha$ サブユニットに対するAEAの濃度反応曲線

(3) AEAの使用依存性効果に関する検討

AEAによる $Nav_{\alpha}$ の抑制メカニズムをさらに解明するため、AEAの使用依存性に関する検討を行った。その結果、AEAは $Nav_{1.8}$ を除く $Nav_{1.2}$ 、 $Nav_{1.6}$ 、 $Nav_{1.7}$ 機能を使用依存性に抑制することを発見した(\*\*  $p < 0.01$ )。 $\alpha$ サブユニットの違いによる抑制機序相違の発見は、今後のAEAの分子レベルでの疼痛抑制機序解明への鍵となる可能性がある。

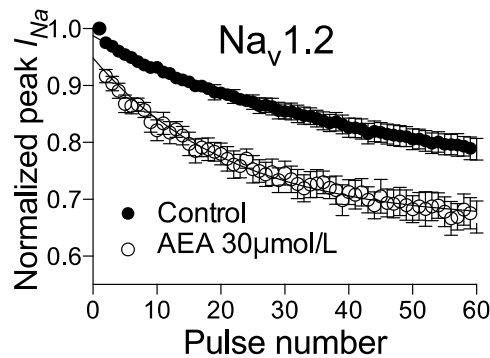


図3  $Nav_{1.2}$ に対する使用依存性効果の検討

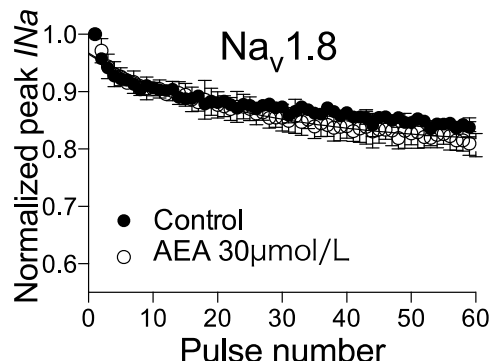


図4  $Nav_{1.8}$ に対する使用依存性効果の検討

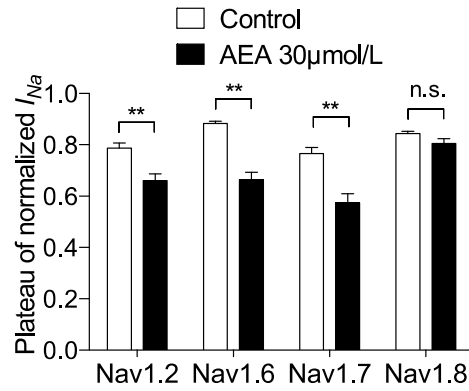


図5 4種の $\alpha$ サブユニットにおけるプラトーの比較

(4) AEAの $Nav_{1.3}$ サブユニットに対する影響解析

$Nav_{1.3}$ は、神経障害性疼痛の状態において、DRGにおける発現量が増加することが示されており、疼痛発現との関連が注目されているが、AEAの $Nav_{1.3}$ に対する影響を解析した。その結果、他の $Nav_{\alpha}$ サブユニットに対する影響と異なり、ほとんど影響を及ぼさないことが確認された。サブユニットの違いによってAEAの作用が異なることは、AEAの疼痛抑制機序を解明する上で、重要な手がかりとなり得る。

(5) 温度感受性受容体 TRPA1 に対するAEAの影響解析

冷刺激感受性を持つTRPA1は、冷感アロディニアや、慢性疼痛のメカニズムに関与することが示唆されているが、これに対するAEAの影響を解析した。AEAはTRPA1におけるカルバクロール(CAV)誘発性電流を増強することを発見した(図6)。

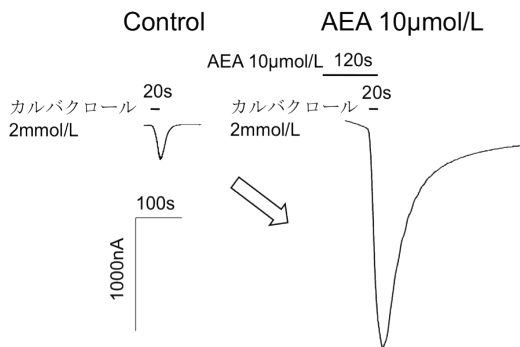


図6 TRPA1に対するAEAの増強効果

(6)  $Nav_{\alpha}$ サブユニット、 $Nav_{1.2}$ 、 $Nav_{1.3}$ 、 $Nav_{1.6}$ 、 $Nav_{1.7}$ 、 $Nav_{1.8}$ に対するカルバクロール(CAV)の影響解析

(5)の結果から、AEAがTRPA1の刺激薬であるCAVの作用を増強することが確認された。CAVは香辛料として用いられるオレガノを代表する芳香植物に含まれる精油であるが、抗細菌作用、抗酸化作用、抗炎症作用など多くの有効な生理機能を持ち、鎮痛作用も持つことが報告されているが、そのメカ

ニズムについては不明な点が多い。従って、CAVの鎮痛メカニズムを解明することは、内因性カンナビノイドの疼痛抑制機序を明らかにするための重要な手がかりとなる可能性がある。そこで、CAVのNav $\alpha$ サブユニットに対する影響を解析した。 $V_{max}$ と $V_{1/2}$ における脱分極性カレントに対する薬物の影響を調べた。300 $\mu$ mol/Lの濃度のCAVは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8のカレントを、 $V_{max}$ において、それぞれ12 $\pm$ 1%、6 $\pm$ 1%、32 $\pm$ 4%、25 $\pm$ 3%、12 $\pm$ 2%、 $V_{1/2}$ において、61 $\pm$ 3%、30 $\pm$ 2%、63 $\pm$ 1%、45 $\pm$ 2%、16 $\pm$ 2%抑制した(図7)。

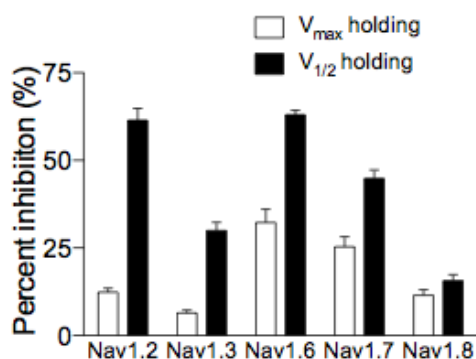


図7 5種の $\alpha$ サブユニットに対するCAVの抑制効果

(7)  $V_{1/2}$ におけるCAVの濃度反応曲線

(6)の結果から、CAVは $V_{max}$ よりも $V_{1/2}$ において強い抑制効果を生じたことから、 $V_{1/2}$ における濃度反応曲線を作成した。CAVは、全ての $\alpha$ 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、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8における $IC_{50}$ 値はそれぞれ、0.23 $\pm$ 0.02mmol/L、0.52 $\pm$ 0.04mmol/L、0.21 $\pm$ 0.01mmol/L、0.37 $\pm$ 0.02mmol/L、0.81 $\pm$ 0.05mmol/Lであった(図8)。

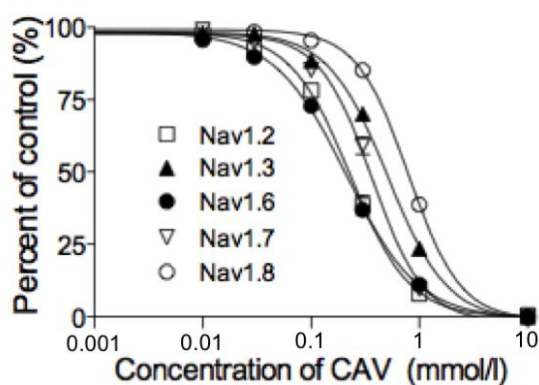


図8 5種の $\alpha$ サブユニットに対するCAVの濃度反応曲線

(8) Navの活性化に対するCAVの影響解析

さらに、抑制メカニズムを解析するために、チャンネルの活性化に対するCAV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CAV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。CAVは全ての $\alpha$ 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9、図10)。Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8における $V_{max}$ と $V_{1/2}$ でのシフトは、それぞれ3mVと3mV、1mVと3mV、6mVと5mV、3mVと3mV、4mVと2mVであった。これらの結果から、全ての $\alpha$ 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。

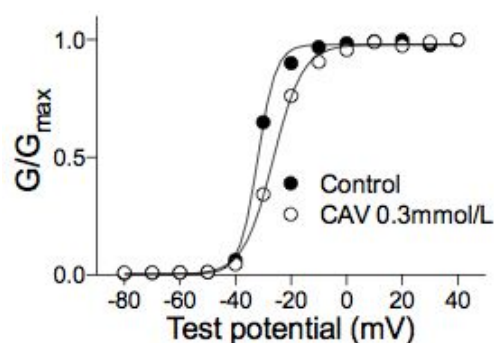


図9  $V_{max}$ におけるNav1.6の活性化に対するCAVの影響

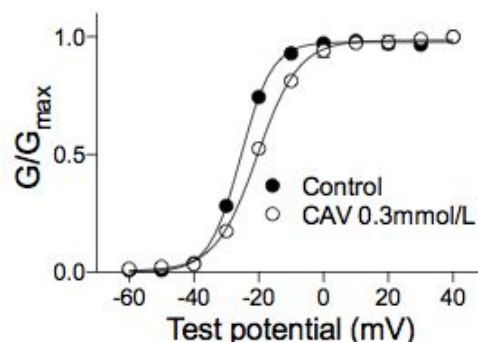


図10  $V_{1/2}$ におけるNav1.6の活性化に対するCAVの影響

(9) Navの不活性化に対するCAVの影響解析

さらに、チャンネルの不活性化に対するCAVの影響を調べた。CAVは、全ての $\alpha$ サブユニットにおいて、inactivation curveを過分極方向へシフトさせた。CAVによるmidpoint( $V_{1/2}$ )のシフトは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8において、それぞれ6mV、6mV、6mV、5mV、6mVであった。これらの結果から、チャンネルの不活性化の促進が、全ての $\alpha$ サブユニットに対するCAVの抑制効果のメカニズムの一つであることが示された。

(10) CAVの使用依存性効果に関する検討

CAVによるNavの抑制メカニズムをさらに解明するため、CAVの使用依存性に関する検討を行った。その結果、CAVは全ての $\alpha$ サブユニットに対して使用依存性に抑制することが示された(\*\* p < 0.01)。

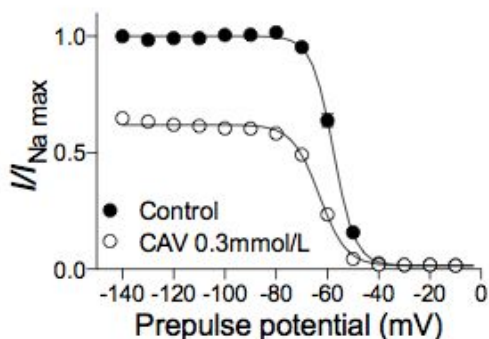


図11 Nav<sub>v</sub>1.6の不活性化に対するCAVの影響

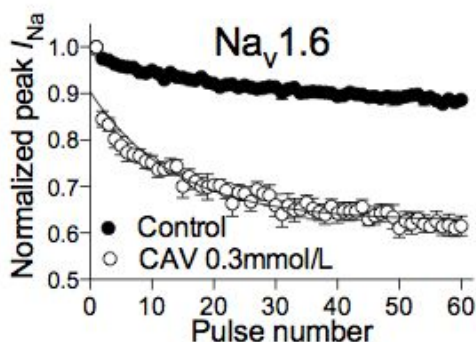


図12 Nav<sub>v</sub>1.6に対する使用依存性効果の検討

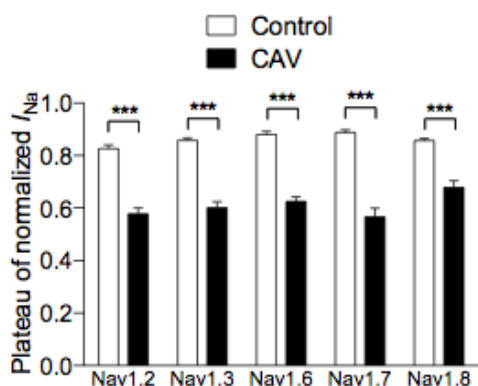


図13 5種の $\alpha$ サブユニットにおけるプラトーの比較

(1) ~ (10) に結果より、ナトリウムチャネルの抑制作用が AEA の作用機序の一つである可能性が示唆され、またその抑制機序についても明らかにされた。また、AEA の TRPA1 機能を増強させることが示されたが、AEA の作用に影響を及ぼしている可能性が示唆される。さらに、AEA による TRPA1 への増強作用が示された CAV も鎮痛作用を持つことが報告されているが、CAV がナトリウムチャネルを抑制するという今回の結果は、CAV の鎮痛機序の一つである可能性を示している。これらの結果は内因性カンナビノイドの鎮痛機序解明の大きな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)

〔雑誌論文〕(計1件)

著書名: Okura Dan(7名1番目), Horishita Takafumi(7名2番目), Sata Takeyoshi(7名7番目).

論文表題: The endocannabinoid anandamide inhibits voltage-gated sodium channels Nav1.2, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 expressed in *Xenopus* oocytes.

雑誌名: *Anesthesia and Analgesia*.

査読: 有り

巻: 118

発行年: 2014年

ページ: 554-62

〔学会発表〕(計1件)

発表者名(代表): 堀下貴文

発表表題: カルバクローラは、電位依存性ナトリウムチャネルサブユニット、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8 機能を抑制する

学会名: 日本麻酔科学会第62回学術集会

発表年月日: 平成27年5月29日(発表予定)

発表場所: 神戸ポートピアホテル(兵庫県神戸市)

#### 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) 研究分担者

佐多 竹良 (SATA Takeyoshi)

産業医科大学・大学病院・病院長

研究者番号: 60128030

##### (3) 連携研究者

大倉 暖 (OKURA Dan)

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00596710