

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460112

研究課題名(和文)炎症性および神経障害性疼痛におけるT型カルシウムチャンネルとカルシニューリンの役割

研究課題名(英文) Roles of T-type calcium channels and calcineurin in inflammatory or neuropathic pain

研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：90271410

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：一次知覚神経のCav3.2 T型カルシウムチャンネル(Tチャンネル)は、体性痛、内臓痛、神経障害性疼痛などの痛みの発症に寄与することが知られている。本研究では始めに、種々の疼痛モデルを用いて、新規Tチャンネル阻害薬RQ-00311651の鎮痛効果を検討し、この化合物が中枢抑制作用の少ない経口投与可能な鎮痛薬となりうることを報告した。また、我々が以前に報告している第5腰神経切断誘起神経障害性疼痛ラットにおける一次知覚神経のCav3.2発現増加に、転写因子Egr-1および脱ユビキチン化酵素USP5の発現増加を介したCav3.2の転写促進およびプロテアソーム分解抑制が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Cav3.2 T-type calcium channels (T-channels) expressed in primary sensory neurons have been known to contribute to development of various intractable pain, including somatic, visceral and neuropathic pain. In the present study, we first examined analgesic effects of RQ-00311651, a novel T-channel blocker, in various pain model animals, and have reported that the compound may serve as an orally available analgesic for treatment of neuropathic and visceral pain with minimum central side effects. We also examined the mechanism of Cav3.2 upregulation in primary sensory neurons in a neuropathic pain model induced by L5 spinal nerve cutting, which we have reported previously, and have shown that increase in expression of Egr-1, a transcription factor, and USP5, a deubiquitinating enzyme, enhances transcription of Cav3.2 and suppresses proteasomal degradation of Cav3.2, respectively, leading to upregulation and maintenance of Cav3.2 expression in primary sensory neurons after nerve injury.

研究分野：薬理学

キーワード：T型カルシウムチャンネル 神経障害性疼痛 Egr-1 USP5 一次知覚神経

## 1. 研究開始当初の背景

静止膜電位付近で活性化される T 型電位依存性  $Ca^{2+}$  チャンネル (T チャンネル) の 3 つのサブタイプのうち、 $Ca_v3.2$  は鈍い痛みを伝える知覚神経 C 線維に豊富に発現し、疼痛の発症に中心的な役割を担っていることから、新たな疼痛治療薬開発のターゲット分子として注目されている。我々は神経損傷による神経障害性疼痛モデルでは知覚神経の  $Ca_v3.2$  発現が増加しており、これが疼痛の発症・維持に寄与することを報告している<sup>1)</sup>。また他のグループにより、 $Ca_v3.2$  の転写は転写調節因子の Egr-1 および REST によりそれぞれ促進的および抑制的に調節されていることが報告されている<sup>2)</sup>。さらに我々は  $Ca_v3.2$  のチャンネル機能が cyclic AMP (cAMP)/protein kinase A (PKA) 系によりリン酸化され、促進的調節を受けることを報告している<sup>3)</sup>。カルシニューリン (CaN) は  $Ca^{2+}$ /カルモジュリンにより活性化される Ser/Thr 脱リン酸化酵素で、転写因子の活性化 T 細胞核内因子 (NFAT) の活性化を介して様々なタンパクの転写調節に関与する他、数種のイオンチャンネルを直接脱リン酸化することでその機能を調節している。CaN/NFAT 系の活性化が Egr-1 発現誘導に関与するとの報告もあることから<sup>4)</sup>、CaN は  $Ca_v3.2$  の発現増加および脱リン酸化によるチャンネル機能制御に関与する可能性が考えられる。また、 $Ca_v3.2$  から流入した  $Ca^{2+}$  が CaN 活性化に関与する可能性も考えられ、疼痛の発症・維持における  $Ca_v3.2$  と CaN のクロストークの関与は興味深い。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、神経障害性疼痛発症に伴う  $Ca_v3.2$  のチャンネル機能および発現レベル変化の分子メカニズムを解明するため、CaN によるチャンネルの脱リン酸化あるいは NFAT 系を介した転写レベルでのチャンネル調節、 $Ca_v3.2$  による CaN 活性化などが実際に疼痛発症に関与する可能性を、細胞・組織・動物レベルにおいて、電気生理学的、生化学的、形態学的、薬理学的および動物行動学的手法を駆使して明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) $Ca_v3.2$ リン酸化レベルの検討

$Ca_v3.2$  を自然に発現している神経前駆様 NG108-15 細胞を用いて、 $Ca_v3.2$  を免疫沈降法により回収し、そのリン酸化レベルを Western blot (WB) 法により検討した。CaN による脱リン酸化の有無は、 $Ca_v3.2$  リン酸化レベルを増加させる膜透過性 cAMP アナログの dibutyryl cAMP (db-cAMP) 刺激<sup>3)</sup> に対する CaN 阻害薬 FK506 の影響を観察することで検討した。

### (2) $Ca_v3.2$ の T チャンネル電流 (T 電流) 測定

Whole cell patch-clamp 法により  $Ca^{2+}$  チャンネル電流を測定した。T チャンネル電流は保持電

位 -80 mV から刺激電位 -20 mV を 200 ms 与えたときの最大電流から刺激開始から 150 ms 後の電流を差し引いた値として算出した。

### (3) 疼痛モデル動物の作製

神経障害性疼痛モデルは、麻酔条件下、ラットの第 5 腰神経の切断 (L5 spinal nerve cutting, L5SNC) 処置により作製した。

### (4) 痛覚閾値の測定

ラットの処置側足底において、von Frey ファイラメントを用いた up-down 法および paw pressure 法により機械的痛覚閾値を測定した。

### (5) 一次知覚神経のタンパク発現量

後肢へ入力する一次知覚神経の細胞体が存在する L4~L6 レベルの後根神経節 (DRG) を摘出し、その組織溶解液中のタンパク発現量を WB 法により検討した。

### (6) DRG の Egr-1 および USP5 発現抑制

麻酔条件下でラット髄腔内に挿入したカニューレから Egr-1 あるいは USP5 を標的としたアンチセンスオリゴデオキシヌクレオチド (AS-ODN) を髄腔内投与することで標的タンパクの発現を減少させた。

## 4. 研究成果

### (1) NG108-15 細胞における $Ca_v3.2$ の T チャンネル電流およびリン酸化レベルにおよぼす CaN 阻害薬 FK506 の影響

NG108-15 細胞における T チャンネル電流は db-cAMP 刺激により明らかに増強されたが、CaN 阻害薬 FK506 は増強効果を示さなかった。また、この細胞の  $Ca_v3.2$  リン酸化レベルも FK506 で増加せず、さらに、db-cAMP により増加したリン酸化レベルに対しても FK506 は無効であった。これらの結果から、 $Ca_v3.2$  のチャンネル機能調節には CaN による脱リン酸化の関与はないことが示唆された。

### (2) 第 5 腰神経切断 (L5SNC) 誘起神経障害性疼痛モデルラットの DRG における $Ca_v3.2$ 発現誘導への CaN の関与

先の結果から、 $Ca_v3.2$  のチャンネル機能調節に CaN の脱リン酸化の関与はないことがわかったことから、次に DRG における  $Ca_v3.2$  発現増加が疼痛の発症・維持に関与していることを報告している L5SNC 誘起神経障害性疼痛モデルラットを用いて  $Ca_v3.2$  発現誘導における CaN の関与を検討した。始めに、L5SNC 処置ラットの痛覚過敏/アロディニアの発症に T チャンネルが関与していることを再確認するために、痛覚閾値低下が最大に達して持続する L5SNC 処置 14 日後において (図 1A)、新規 T チャンネル阻害薬 RQ-00311651 (RQ) の効果を検討したところ、RQ は 5 および 10 mg/kg の腹腔内投与 (i.p.) で paw pressure 法、von Frey 法いずれの測定方法で検討した場合も有意な鎮痛効果を示した (図 1B、

C) ( 発表論文 参照 )

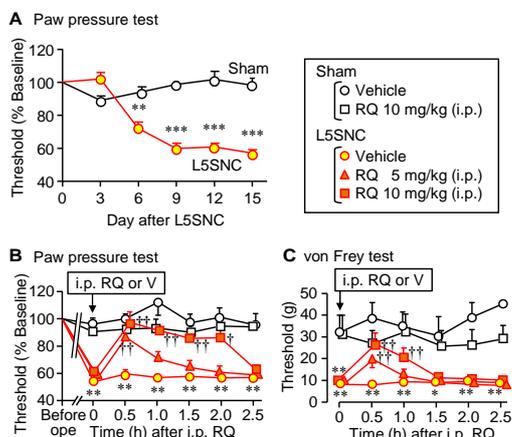


図1 第5腰神経切断(L5SNC)誘起神経障害性疼痛モデルラットの痛覚閾値の経時変化(A)およびL5SNC処置14日後の痛覚過敏/アロディニアに対する新規Tチャネル阻害薬RQ-00311651(RQ)の鎮痛効果(B,C). データは4-8例の平均値 ± 標準誤差で示している。\* P<0.05, \*\* P<0.01, \*\*\* P<0.001 vs. Sham, † P<0.05, †† P<0.01 vs. Vehicle in L5SNC.

次に、L5SNCにより有意に痛覚閾値が低下し始める処置6日後( Day 6、神経障害性疼痛発症初期)と安定して痛覚閾値が低下する処置14日後( Day 14、神経障害性疼痛維持期)のラットから処置側のL4、L5、L6レベルDRGを摘出し、Ca<sub>v</sub>3.2、CaN、Egr-1、REST、およびCa<sub>v</sub>3.2のプロテアソーム分解を阻害してチャネルの細胞膜発現量を増加させることが報告されている脱ユビキチン化酵素 USP5<sup>5)</sup>のタンパク発現量を検討したところ、Day 6のDRGでは切断したL5ではなくL4レベルにおいてCa<sub>v</sub>3.2およびEgr-1の有意な増加が見られたが(図2A)、CaN、REST、USP5の発現量はShamとL5SNC処置ラット間で差は認められなかった。また、Day 14のL4-DRGではCa<sub>v</sub>3.2とEgr-1に加え、USP5の発現レベルもL5SNC群で有意に増加していたが(図2B) RESTとCaNの発現レベルはSham群と同程度であった。

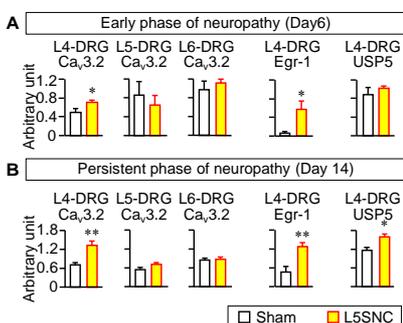


図2 L5SNC処置6日後(神経障害性疼痛発症初期)(A)および14日後(神経障害性疼痛維持期)(B)のラットから摘出したL4~L6レベルDRGにおけるCa<sub>v</sub>3.2、Egr-1およびUSP5発現量. データは4-5例の平均値 ± 標準誤差で示している。\* P<0.05, \*\* P<0.01 vs. Sham.

(3) L5SNC 処置による L4-DRG の Ca<sub>v</sub>3.2 発現誘導への Egr-1 および USP5 の関与

ラットの L5SNC 処置により L4-DRG で見られる Ca<sub>v</sub>3.2 発現増加に Egr-1 および USP5 が関与する可能性を検討するため、Egr-1 あるいは USP5 に対する AS-ODN を髄腔内投与(i.t.)し、DRG におけるこれらタンパクの発現抑制の効果を検討した。神経障害性疼痛発症初期に当たる Day 6-9 では、Egr-1-AS-ODN 投与により L5SNC で低下した痛覚閾値が Sham 群と同レベルまで上昇し明らかな鎮痛効果が見られたが、USP5-AS-ODN の投与ではこのような鎮痛効果は見られなかった。また、DRG の Ca<sub>v</sub>3.2 発現量も Egr-1-AS-ODN 投与で有意に減少したが、USP5-AS-ODN では減少しなかった。一方、神経障害性疼痛維持期の Day 11-14 に AS-ODN を投与した場合は、Egr-1、USP5 いずれの発現抑制によっても明らかな鎮痛効果が見られ、また、L4-DRG の Ca<sub>v</sub>3.2 発現量も Egr-1、USP5 いずれの AS-ODN 投与によっても有意な減少が認められた。

(4) まとめ

以上の結果より、本研究課題において予想していた Ca<sub>v</sub>3.2 T 型 Ca<sup>2+</sup>チャネルと CaN のクロストークはほとんどないことが示唆された。一方、神経損傷により誘起される神経障害性疼痛の発症・維持に大きな寄与が示されている一次知覚神経の Ca<sub>v</sub>3.2 発現誘導には、転写促進因子 Egr-1 および脱ユビキチン酵素 USP5 の発現増加による転写促進およびプロテアソーム分解抑制がそれぞれ関与することが示唆された。また、Egr-1 は神経障害性疼痛発症および維持どちらにも寄与するのに対して、USP5 は疼痛の発症ではなく維持に寄与する可能性が示唆された(図3)。

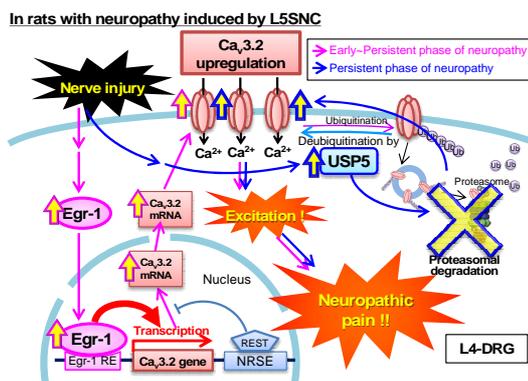


図3 L5SNC 誘起神経障害性疼痛モデルラットの L4-DRG における Ca<sub>v</sub>3.2 発現誘導メカニズム.

< 引用文献 >

- 1) Takahashi et al., 2010, *Pain*. **150**, 183-191.
- 2) von Loo et al., 2013, *J Biol Chem*. **287**, 15489-15501.
- 3) Sekiguchi et al., 2013, *Br J Pharmacol*. **168**, 734-745.
- 4) Susilowati et al., 2011, *Biochem Biophys Res Commun*. **404**, 57-61.
- 5) Garcia-Caballero et al., 2014, *Neuron*. **83**, 1144-1158.

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 1 件)

Sekiguchi, F., Kawara Y, Tsubota M, Kawakami E, Ozaki T, Kawaiishi Y, Tomita S, Kanaoka D, Yoshida S, Ohkubo T, Kawabata A. Therapeutic potential of RQ-00311651, a novel T-type  $Ca^{2+}$  channel blocker, in distinct rodent models for neuropathic and visceral pain. *Pain*. 2016 Aug; **157**(8):1655-65. 査読有 doi: 10.1097/j.pain.0000000000000565.

### 〔学会発表〕(計 12 件)

富田詩織、出口智代、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . 抗がん薬ボルテゾミブにより誘起される神経障害性疼痛には  $Ca_v3.2$  T 型カルシウムチャネルの発現増加が関与する . 第 90 回日本薬理学会年会 . 2017, 3, 15-17, 長崎ブリックホール (長崎市).

Tomita, S., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Kawabata, A. Molecular mechanisms for the upregulation of  $Ca_v3.2$  T-type calcium channels in the neuropathic pain. The 12th International Conference on Protein Phosphatase. 2016, 10, 27-30, Higashi-Osaka, Japan.

式見志勇、富田詩織、関口富美子、坪田真帆、岸岡史郎、川畑篤史 . マウスの坐骨神経部分結紮誘起神経障害性疼痛には知覚神経における  $Ca_v3.2$  T 型カルシウムチャネルの発現増加が関与する : 転写因子 Egr-1 および脱ユビキチン化酵素 USP5 の役割 . 第 66 回 日本薬学会近畿支部総会・大会 . 2016, 10, 15, 摂南大学薬学部 (高槻市).

富田詩織、式見志勇、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . ラットあるいはマウスの神経障害性疼痛に関与する一次知覚神経における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャネルの発現誘導メカニズム . 第 38 回日本疼痛学会、2016, 6, 24-25, 北海道立道民活動センターかでの 2・7 (札幌市).

富田詩織、式見志勇、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . 神経障害性疼痛モデル動物の後根神経節における  $Ca_v3.2$  T 型カルシウムチャネルの発現誘導メカニズムの解析 . 痛み研究会 2015. 2015, 12, 17-18, 岡崎研究所 (岡崎市).

Tomita, S., Sekiguchi, F., Tsubota, M., Kawabata, A. Molecular mechanisms for the upregulation of  $Ca_v3.2$  T-type calcium channels in the dorsal root ganglion of rats with spinal nerve injury-induced neuropathy: involvement of Egr-1 and USP5. *Neuroscience* 2015. 2015, 10, 17-21, Chicago,

IL, USA.

富田詩織、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . 第 5 腰神経切断誘起神経障害性疼痛ラットの後根神経節における  $Ca_v3.2$  の発現量増加機序の解析 : 転写促進因子 Egr-1 による発現誘導と脱ユビキチン化酵素 USP5 によるプロテアソーム分解抑制 . 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015. 2015, 8, 29, 東京大学 (東京).

式見志勇、富田詩織、関口富美子、坪田真帆、岸岡史郎、川畑篤史 . マウスの坐骨神経部分結紮誘起神経障害性疼痛における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャネルの役割 . 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2015. 2015, 8, 29, 東京大学 (東京).

富田詩織、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . ラット第 5 腰神経切断により誘起される神経障害性疼痛および脊髄後根神経節における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャネル発現増加への転写調節因子 Egr-1 と脱ユビキチン化酵素 USP5 の関与 . 生体機能と創薬シンポジウム 2015 . 2015, 8, 27-28, 日本大学薬学部 (船橋市).

富田詩織、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . 神経障害性疼痛ラットの知覚神経における  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャネル発現誘導には転写因子 Egr-1 および脱ユビキチン化酵素 USP5 が関与する . 第 88 回日本薬理学会年会 . 2015, 3, 18-20, 名古屋国際会議場 (名古屋市).

富田詩織、関口富美子、坪田真帆、川畑篤史 . 第 5 腰神経切断神経障害性疼痛ラットにおける  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャネル発現増加機序の解析 : 転写調節因子 Egr-1 と脱ユビキチン化酵素 USP5 の挙動について . 第 126 回日本薬理学会近畿支部会 2014, 10, 24, 和歌山県 JA ビル (和歌山市).

富田詩織、瓦侑馬、関口富美子、川石雄大、坪田真帆、吉田 繁、大久保つや子、川畑篤史 . 新規 T 型  $Ca^{2+}$  チャネル阻害薬 RQ-00311651 の電気生理学的性質および神経障害性疼痛に対する抑制効果 . 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2014. 2014, 8, 30, 近畿大学 (東大阪市).

### 〔その他〕

ホームページ等

<http://www.phar.kindai.ac.jp/byoutai/index.files/byoutai.htm>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

関口 富美子 (SEKIGUCHI, Fumiko)

近畿大学・薬学部・准教授

研究者番号：9 0 2 7 1 4 1 0

(2)研究分担者

川畑 篤史 (KAWABATA, Atsufumi)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：2 0 1 7 7 7 2 8