

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16502

研究課題名（和文）慢性疼痛に対する新たな鎮痛法開発を目指したTRPV3チャネル抑制機構の解明

研究課題名（英文）Investigation of the mechanisms of TRPV3 channel inhibition aimed at the development of novel pain relief for chronic pain

研究代表者

堀下 玲子 (Horishita, Reiko)

産業医科大学・医学部・非常勤医師

研究者番号：40746658

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： TRPV3チャネルは炎症性疼痛の発生・進展に深く関与することが示されているが、TRPV3チャネルの調節機構については不明な点が多い。慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬・鎮痛法開発に貢献するために、局所麻酔薬を利用してTRPV3チャネルの抑制機構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。その結果、局所麻酔薬は濃度依存性にTRPV3チャネル機能を抑制するが、これらの抑制機序は細胞内シグナルによらず、電荷型局所麻酔薬が細胞外からTRPV3チャネル透過孔へ作用することによって抑制効果を発揮することが示唆された。

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、その複雑な病態のため現存する鎮痛薬では治療困難な例が多く、新たな鎮痛薬・鎮痛法の開発が強く望まれている。TRPV3チャネルは炎症性疼痛の発生に深く関与することが示されているが、その活性化調節機構については未だ明らかにされていない。局所麻酔薬を利用して、TRPV3チャネルの新たな抑制機構を発見した我々の研究結果は、慢性疼痛発生に重要な役割を持つTRPV3チャネルをターゲットにした新たな鎮痛薬・鎮痛法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）： TRPV3 channel has been suggested to be involved in the mechanisms underlying chronic inflammatory pain, however, the regulation of TRPV3 activity has not been elucidated, so far. We planned the experiments that will explore the mechanisms underlying TRPV3 channel inhibition by using local anesthetics to contribute development of novel analgesics or pain relief for refractory chronic pain. We studied various electrophysiological experiments through *Xenopus oocytes* system. As a result, we found that local anesthetics could inhibit TRPV3 channel function via extracellular interactions of their charged form with the TRPV3 channel pore. Our results would contribute to the overall understanding of the mechanisms behind the analgesic effects of local anesthetics, and the development of novel analgesics or pain relief for 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 TRPV3チャネル 局所麻酔薬 TRPV3抑制機序

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、その複雑な病態のため現存する鎮痛薬では治療困難な例が多く、新たな鎮痛薬・鎮痛法の開発が強く望まれている。温度感受性受容体である **TRP** チャンネルは温度や化学的・機械的刺激を受容する分子であるが、いくつかのサブタイプが慢性疼痛の発生と進展に重要な役割を持つことが明らかになってきた。

(2) **TRPV3** チャンネルもそのサブタイプの一つであり、特に炎症性疼痛の発生・進展に深く関与することが示されているが、**TRPV3** チャンネルの調節機構については不明な点が多く、これをターゲットにした有効な鎮痛薬開発には至っていない。従って、**TRPV3** チャンネル抑制機構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・鎮痛法開発への手がかりとなる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬・鎮痛法開発に貢献するために、局所麻酔薬を利用して **TRPV3** チャンネルの抑制機構を分子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

TRPV3 チャンネルをターゲットにした慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬と鎮痛法開発に貢献するため、**TRPV3** 抑制機構を分子レベルで解明することと、慢性疼痛に対する電荷型局所麻酔薬の局所投与の有効性を探ることを目的として研究計画を立てた。

(1) TRPV3 と TRPV1 チャンネルの cRNA によるキメラ型 cRNA の作成

TRPV3 と TRPV1 は共に 6 回膜貫通型サブユニットからなるチャンネルであるが、アミノ酸配列の相同性は約 50% であり、異なる構造を持つ。局所麻酔薬の作用部位を同定するために、複数のキメラ型 cRNA を作成する。

(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)を用いたキメラ型 TRP チャンネルに対する局所麻酔薬の影響解析と作用部位の同定

(1) で作成したキメラ型 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発現させ、これに対する局所麻酔薬・電荷型局所麻酔薬の影響を電気生理学的に解析する。野生型 TRPV3 に対する影響と比較することにより、局所麻酔薬の TRPV3 機能抑制に関わる作用部位を同定する。

(3) 慢性疼痛モデルマウスに対する電荷型局所麻酔薬の局所投与(塗布)による鎮痛効果の解析(in vivo での行動薬理学による作用解析)

慢性疼痛モデルマウスと電荷型局所麻酔薬塗布製剤を作成する。作成した慢性疼痛モデルマウスに対して電荷型局所麻酔薬塗布製剤を塗布し、行動薬理的に鎮痛効果を解析する。

(4) 遺伝子変異マウスに対する電荷型局所麻酔薬の局所投与(塗布)による鎮痛効果の解析(in vivo での行動薬理学による作用解析)

(2) で得られた局所麻酔薬の TRPV3 機能抑制に関わる作用部位を変異させた遺伝子変異マウスを作成し、これを用いて慢性疼痛モデルマウスを作成し、電荷型局所麻酔薬塗布製剤の鎮痛効果を解析する。(3) の結果と比較することにより、TRPV3 機能抑制に関わる局所麻酔薬の作用部位と慢性疼痛抑制効果との関連性を明らかにする。

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た TRPV3 チャンネルに対する局所麻酔薬の影響解析

TRPV3 チャンネルの 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発現させ、Voltage-clamp 法を用いて 2-aminoethyl diphenylborate (2APB) 誘発性電流に対する局所麻酔薬の影響を電気生理学的に調べたところ、リドカイン、メピバカイン、ロピバカイン、ブピバカインは 2APB 誘発性電流を濃度依存性に抑制し、 IC_{50} 値はそれぞれ、 2.5 ± 0.5 、 1.4 ± 0.3 、 0.28 ± 0.04 、 0.17 ± 0.04 であった。

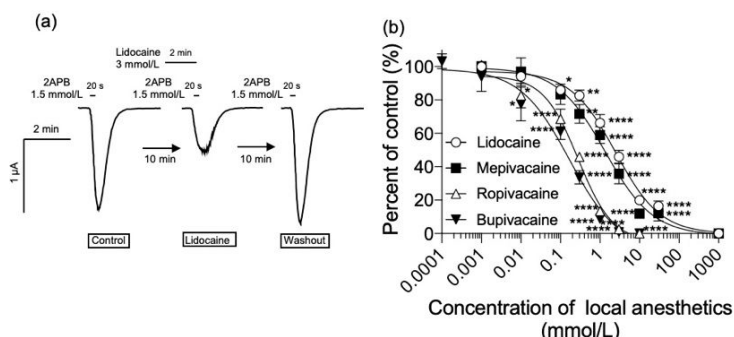


図1 TRPV3における2APB誘発性電流に対する局所麻酔薬の影響

(2) TRPV3 チャンネルに対するリドカインの直接的活性化の解析

研究途中、我々は 4 種の局所麻酔薬全てが **TRPV3** チャンネルを僅かに活性化することを発見したため、リドカインによる **TRPV3** 活性化について解析した。リドカインは直接的に **TRPV3** チャンネルを活性化したが、最大反応量は **2APB** 誘発性電流の $7.1 \pm 2.2\%$ であり、僅かな活性化であった。

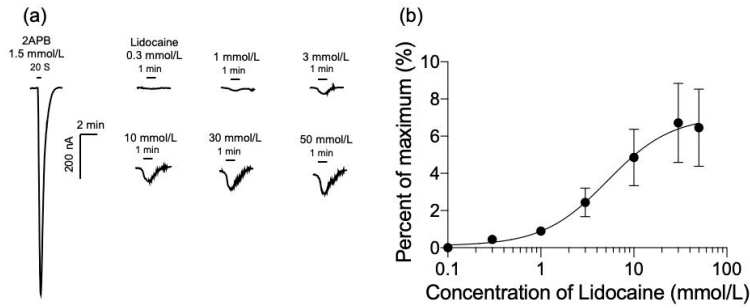


図2 TRPV3におけるリドカインの直接的活性化

(3) 2APB 濃度反応曲線に対するリドカインの影響

局所麻酔薬の **TRPV3** 抑制効果の抑制形式を探るため、**2APB** 濃度反応曲線に対するリドカイン **3mM** の影響を調べたところ、リドカインは最大反応量 E_{max} を $48.1 \pm 6.7\%$ 抑制し、その抑制形式が非拮抗阻害であることが示された。

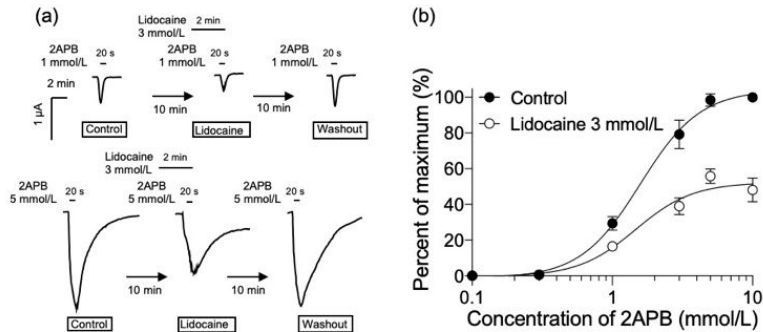


図3 2APB濃度反応曲線に対するリドカインの影響

(4) リドカインの TRPV3 抑制作用に対する細胞内シグナルの影響解析

Phospholipase C (PLC) 刺激薬 (*m*-3MSFBS) の TRPV3 抑制作用の解析

m-3MSFBS ($10 \mu\text{M}$) は **TRPV3** の **2APB** 誘発性電流を $50.7 \pm 4.2\%$ に抑制したが、PLC 阻害薬 (**U-73122** $5 \mu\text{M}$) の前投与によって、その抑制効果は拮抗された。このことから、**TRPV3** チャンネルは PLC の活性化によって抑制されることが示された。

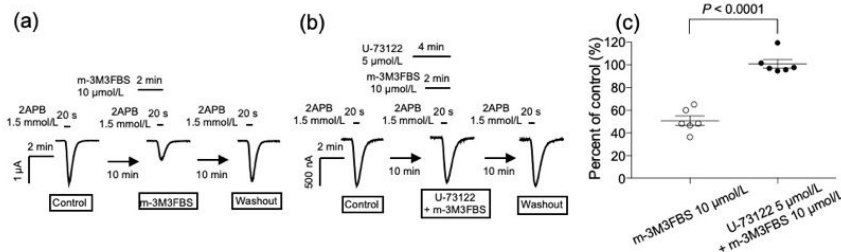


図4 PLC刺激薬 (*m*-3MSFBS) による TRPV3 抑制効果

リドカインの TRPV3 抑制作用に対する U-73122 の影響解析

U-73122 $5 \mu\text{M}$ の存在下におけるリドカインの **2APB** 誘発性電流に対する影響を解析したところ、リドカインの **TRPV3** 抑制効果は拮抗されなかった。このことから、リドカインの **TRPV3** 抑制作用に **PLC** が関与しないことが証明された。

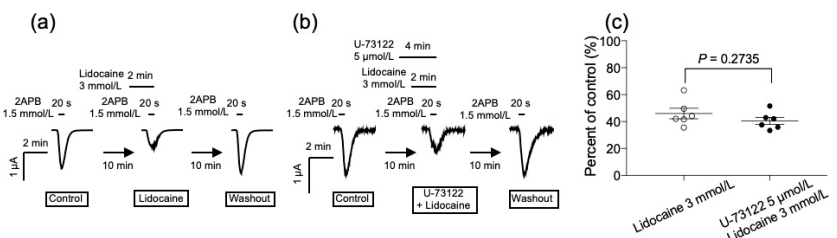


図5 リドカインの TRPV3 抑制作用に対する PLC 阻害薬 (U-73122) の影響

リドカイン TRPV3 抑制作用に対するカルシウム-カルモジュリン (Ca²⁺-CaM) 複合体の影響解析

TRPV3 チャンルにおける 2APB 誘発性電流は、CaM 阻害薬 (Oph A 20μM) によって 152 ± 3.0% 増強され、TRPV3 が Ca²⁺-CaM 複合体によって抑制されることが示されたが、リドカインの TRPV3 抑制効果は Oph A によって影響を受けなかった。このことから、Ca²⁺-CaM 複合体はリドカインの TRPV3 抑制作用に関与しないことが証明された。

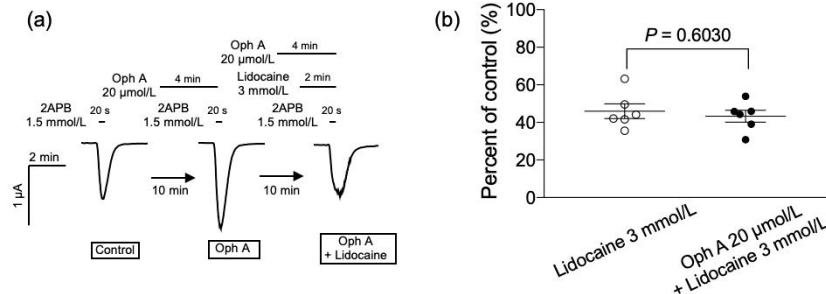


図6 リドカインのTRPV3抑制作用に対するCaM阻害薬 (Oph A) の影響

リドカインの TRPV3 抑制作用に対する細胞膜成分フォスファチジルイノシトール(4,5) ニリン酸 (PI(4,5)P₂) の影響解析

PI(4,5)P₂ 合成酵素 (PI 4 キナーゼ) 阻害薬である phenylarsine oxide (PAO) 30μM によって、TRPV3 における 2APB 誘発性電流は、193 ± 20.3% 増強され、TRPV3 が PI(4,5)P₂ によって抑制されることが示されたが、リドカインの TRPV3 抑制効果は PAO によって影響を受けなかった。このことから、PI(4,5)P₂ はリドカインの TRPV3 抑制作用に関与しないことが証明された。

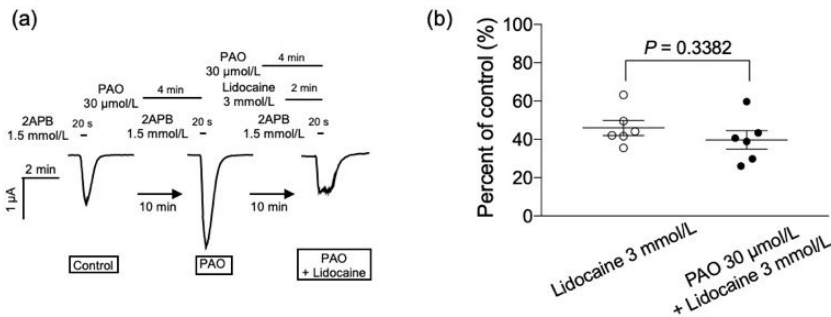


図7 リドカインのTRPV3抑制作用に対するPI(4,5)P₂の影響

(5) 電荷型局所麻酔薬 (QX-314) 及び非電荷型局所麻酔薬 (ベンゾカイン) の TRPV3 チャンルに対する影響

TRPV3 における 2APB 誘発性電流に対する QX-314 及びベンゾカイン細胞外投与の影響解析
 QX-314 及びベンゾカインをその他の局所麻酔薬同様に細胞外投与したところ、QX-314 は 2APB 誘発性電流を濃度依存性に抑制し、IC₅₀ 値は 0.97 ± 0.14μM であったが、ベンゾカインは影響を与えなかった。

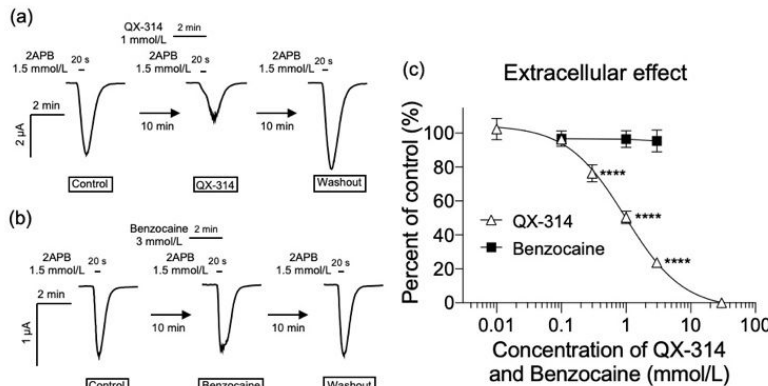


図8 TRPV3に対するQX-314及びベンゾカイン細胞外投与の影響

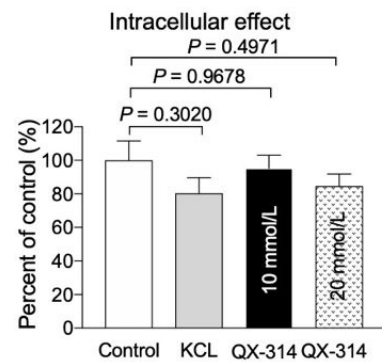


図9 TRPV3に対するQX-314細胞内投与の影響

TRPV3 における 2APB 誘発性電流に対する QX-314 細胞内投与の影響解析

QX-314 10mM 及び **20mM** を卵母細胞に細胞内投与し、その影響を解析したところ、**QX-314** の細胞内投与は **2APB** 誘発性電流を抑制しないことが示された。これらの結果より、非電荷型ではなく電荷型局所麻酔薬が、細胞外から **TRPV3** 機能を抑制することが示された。

(6) TRPV3 に対するリドカインの使用依存性ブロックの解析

2APB を 5 分間隔で投与し **TRPV3** を連続的に活性化させ、リドカイン **1mM** の非存在下、存在下における **2APB** 誘発電流を測定したところ、リドカインの使用依存性効果が認められた。

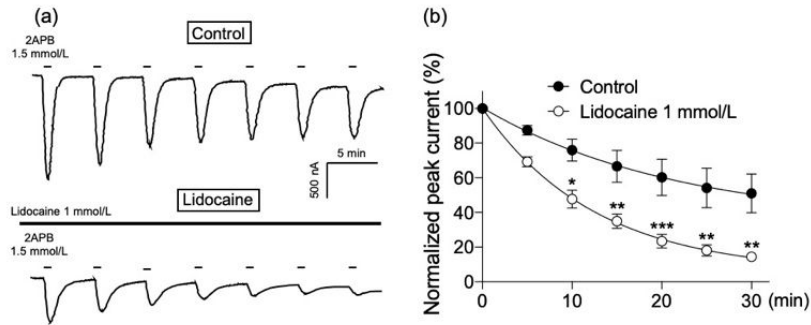


図10 TRPV3に対するリドカインの使用依存性ブロックの解析

(7) TRPV3 チャネル透過孔に対する QX-314 の透過性の検討

TRPV3 チャネル透過孔に対する **QX-314** の透過性の検討を行うため、電位依存性ナトリウムチャネル (Na_v) α サブユニット **Na_v1.7** と **TRPV3** チャネルを共発現させた卵母細胞を用いて解析を行った。細胞外から **QX-314 3mM** 単独投与、**2APB 1mM** 単独投与、**QX-314** と **2APB** の同時投与を行ったところ、電位依存性ナトリウム電流をそれぞれ、**85.2 ± 3.1%**、**71.0 ± 3.9%**、**62.7 ± 3.3%**に抑制した。また、QX-314 3mM の細胞内投与は、ナトリウム電流を **6.9 ± 1.6%**に抑制した。これらの結果から、QX-314 は僅かに TRPV3 チャネルの透過孔を通過できるが、QX-314 自身の TRPV3 抑制効果によって、その透過性が制限されることが推測された。

(1) ~ (7) の結果より、局所麻酔薬は濃度依存性に **TRPV3** チャネル機能を抑制するが、これらの抑制機序は細胞内シグナルによらず、電荷型局所麻酔薬が細胞外から **TRPV3** チャネル透過孔へ作用することによって抑制効果を発揮することが示唆された。これらの結果は、局所麻酔薬の新たな作用機序を示すと共に、慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬・鎮痛法開発への手がかりとなる可能性がある。

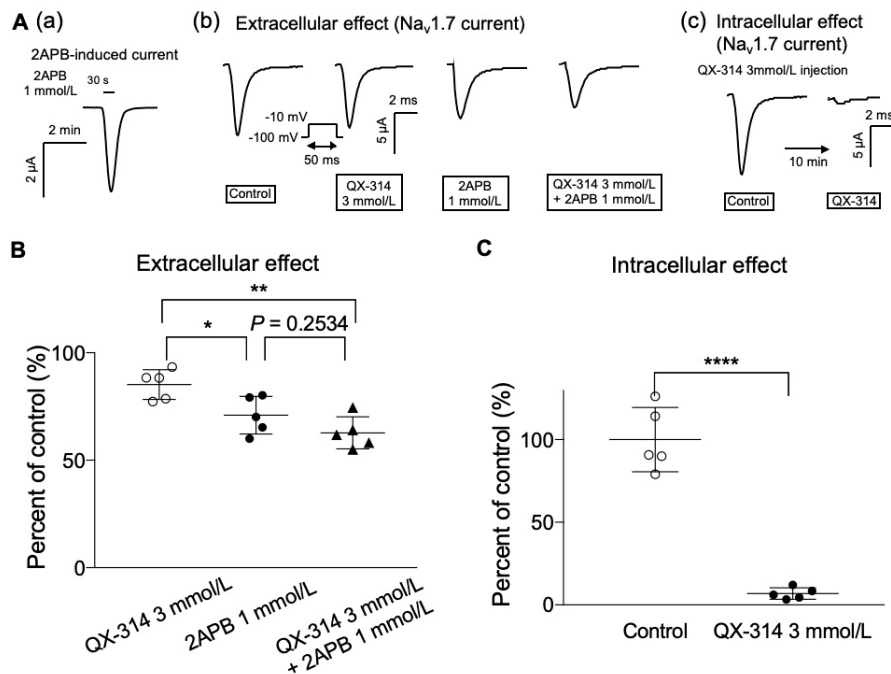


図11 TRPV3チャネル透過孔に対するQX-314の透過性の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Reiko Horishita, Yuichi Ogata, Ryo Fukui, Ryo Yamazaki, Kuniaki Moriwaki, Susumu Ueno, Nobuyuki Yanagihara, Yasuhito Uezono, Yuka Yokoyama, Kouichiro Minami, Takafumi Horishita	4. 巻 132
2. 論文標題 Local anesthetics inhibit transient receptor potential vanilloid subtype 3 channel function in <i>Xenopus oocytes</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anesthesia & Analgesia	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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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 堀下玲子、堀下貴文、南智子、緒方裕一、川崎貴士
2. 発表標題 局所麻酔薬は温度感受性TRPチャネルサブファミリー、TRPV3機能を抑制する
3. 学会等名 日本麻酔科学会第65回学術集会
4. 発表年 2018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
---------	---------