

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20602016

研究課題名(和文) 気体メディエーター硫化水素の神経因性疼痛への関与について

研究課題名(英文) Involvement of the gasotransmitter hydrogen sulfide in neurogenic pain

研究代表者

川畑 篤史 (KAWABATA ATSUFUMI)

近畿大学・薬学部・教授

研究者番号：20177728

研究成果の概要(和文)：硫化水素の疼痛情報伝達促進メカニズムに  $Ca_v3.2$  T型カルシウムチャネルが関与することを明らかにした。また、L5 脊髄神経切断神経障害性疼痛モデルを作成し、痛覚過敏・アロディニアの保持に内因性硫化水素による  $Ca_v3.2$  の活性化が関与すること、さらに、本モデルでは  $Ca_v3.2$  の発現誘導がおこなわれていることを見出し、硫化水素/ $Ca_v3.2$  系が神経因性疼痛の新たな治療標的になりうることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We first demonstrated the involvement of  $Ca_v3.2$  T-type calcium channels in hydrogen sulfide-induced facilitation of nociception. We then found that, in rats with L5 spinal nerve injury, the activation of  $Ca_v3.2$  by endogenous hydrogen sulfide was involved in the maintenance of hyperalgesia/allodynia, and  $Ca_v3.2$  was upregulated, suggesting that the hydrogen sulfide/ $Ca_v3.2$  pathway should be a therapeutic target for treatment of neurogenic pain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：時限

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ニューロパチー、神経障害性疼痛、生体内ガス、硫化水素、T型カルシウムチャネル、痛み、神経因性疼痛、siRNA

## 1. 研究開始当初の背景

脳における  $H_2S$  の役割に関する研究は比較的早くから行われており、 $H_2S$  ドナーである NaHS が  $K_{ATP}$  チャネルを活性化することで神経細胞の過分極を誘起することや、NMDA 受容体の感受性を増大させることで海馬長期増強(LTP)を促進することなどが知られている。我々は、早くから  $H_2S$  の生体内における役割を解明するための研究に着手し、 $H_2S$  の平滑筋作用、胃粘膜保護作用、NO系とのクロスト

ークのほか、痛みの情報伝達物質としての  $H_2S$  の新たな機能などを相次いで報告していた。 $H_2S$  が T型  $Ca^{2+}$  チャネルの感受性を増大させることは、ホールセルパッチクランプ法により NG108-15 細胞や脊髄後根神経節(DRG)細胞を用いて証明している。また NaHS のラット足底内投与により T型  $Ca^{2+}$  チャネルの活性化を介して痛覚過敏が起こることや、エンドトキシンの足底内投与によって誘起される痛覚過敏が  $H_2S$  合成酵素の1つである CSE の阻

害薬 DL-propargylglycine (PPG) や  $\beta$ -cyanoalanine (BCA) により抑制されることも明らかにした。さらに、 $H_2S$  は体性痛のみならず内臓痛の発現にも深く関与しており、結腸痛および膀胱痛への  $H_2S$  の関与についても報告していた。このように  $H_2S$  が T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルを介して痛みの情報伝達に関与する重要な生体内分子であることを我々はすでに明らかにしていた。

## 2. 研究の目的

上述のように、我々は電気生理学的手法を用いて、 $H_2S$  が T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの感受性を増大させることを見出し、さらに、末梢組織において  $H_2S$  が知覚神経上に存在する T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルを介して痛覚過敏を誘起することを既に証明していた。一方、T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルは、神経因性疼痛の病態とも深く関わっていることが近年明らかになりつつあった。そこで、本研究では、T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルの 3 つのサブタイプのうち、痛みとの関係が最も大きいとされている  $Ca_v3.2$  が  $H_2S$  による痛覚過敏に関与するか否かを調べ、さらに  $Ca_v3.2$  T 型  $Ca^{2+}$  チャンネルと神経因性疼痛との関係を明らかにすることを主目的として本研究を企画した。

## 3. 研究の方法

(1) 痛みの検定：ラットの機械的侵害受容閾値をランダルセリット法により、またアロディニアを von Frey 法により評価した。

(2)  $Ca_v3.2$  のノックダウン：アンチセンス法または RNA 干渉法により一次知覚神経に発現する  $Ca_v3.2$  をノックダウンした。

(3) DRG における  $Ca_v3.2$  発現分布：免疫染色法により調べた。

(4)  $Ca_v3.2$ 、CSE などの蛋白量は Western blot 法により測定した。

## 4. 研究成果

(1) 末梢組織および脊髄内  $H_2S$  による痛覚過敏への  $Ca_v3.2$  の関与について

$H_2S$  ドナーである NaHS の足底内あるいは脊髄内投与により機械的痛覚過敏が誘起されたが、これは T 型カルシウムチャンネル阻害薬であるミベフラジルによって阻止された (図 1)。また一次知覚神経の  $Ca_v3.2$  のノックダウンによっても NaHS 誘起痛覚過敏は阻止された (図 2)。これらのことより、末梢および脊髄において  $H_2S$  は  $Ca_v3.2$  を介して痛覚過敏を誘起することが明らかとなった。

(2) L5 腰神経切断により誘起される神経障害性疼痛への CSE 由来  $H_2S$  の関与について

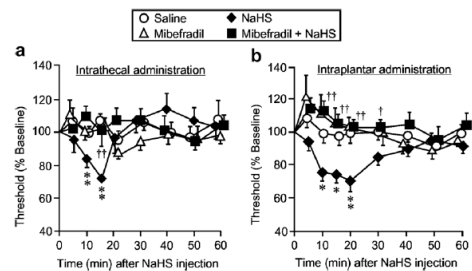


図 1 脊髄または足底内投与による NaHS 誘起痛覚過敏に対するミベフラジルの阻害作用

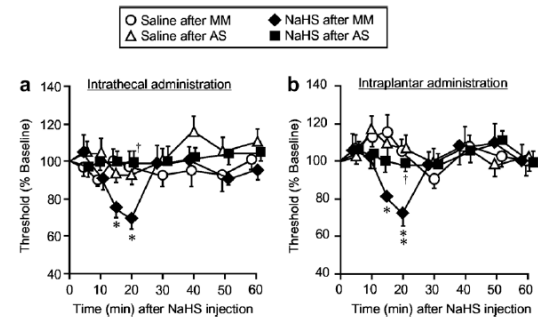


図 2 アンチセンス法による  $Ca_v3.2$  ノックダウンによって NaHS 誘起痛覚過敏は抑制される

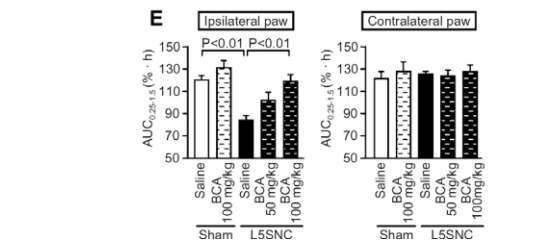
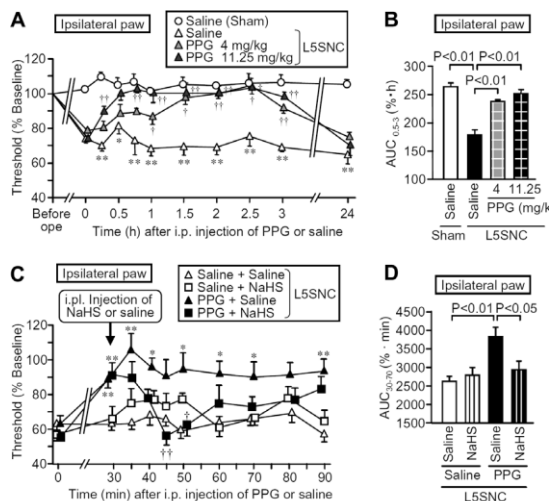


図 3 L5 腰神経切断誘起神経障害性疼痛に対する CSE 阻害薬の効果

L5 腰神経切断により 14 日後には、明確な機械的侵害受容閾値の低下、すなわち痛覚過敏が誘起されたが、この痛覚過敏は CSE 阻害薬である DL-propargylglycine (PPG) の投与により、完全に抑制された (図 3 A, B)。こ

のPPGの抗痛覚過敏効果は、NaHSにより消失した(図3C, D)。また、同様の抗痛覚過敏効果は異なるCSE阻害薬であるβ-cyanoalanineの投与によっても認められた(図3E)。これらのことより、本モデルの痛覚過敏にCSE由来内因性H<sub>2</sub>Sが関与することが判明した。

(3) L5腰神経切断により誘起される神経障害性疼痛へのT型Ca<sup>2+</sup>チャネルの関与について

L5腰神経切断ラットで認められたニューロパチーラットに対してT型Ca<sup>2+</sup>チャネル阻害薬であるミベフラジルを投与したところ、痛覚過敏は明らかに抑制された。このことから本モデルにおける痛覚過敏にT型Ca<sup>2+</sup>チャネルの機能亢進が関与する可能性が示唆された。

(4) L5腰神経切断誘起神経障害性疼痛ラットにおけるCa<sub>v</sub>3.2 T型Ca<sup>2+</sup>チャネルの挙動について

免疫染色により、ラット脊髄後根神経節(DRG)の比較的小さい細胞体にCa<sub>v</sub>3.2の発現が多く認められた(図4A)。L5腰神経切断誘起神経障害性疼痛ラットのDRGにおけるCa<sub>v</sub>3.2発現量をWestern blot解析したところ、明らかな発現誘導が認められた(図4B, C)。一方、足底組織におけるCSEの蛋白発現量(図4D, E)およびmRNA量(図4F)には変化は見られなかった。これらのことより、本ニューロパチーモデルでは、知覚神経においてH<sub>2</sub>Sの標的分子であるCa<sub>v</sub>3.2の発現誘導が起こっており、これが痛覚過敏に関与する可能性が示唆された。

(5) L5腰神経切断により誘起される神経障害性疼痛に及ぼすCa<sub>v</sub>3.2ノックダウンの影響

最後に、L5腰神経切断誘起神経障害性疼痛の病態へのCa<sub>v</sub>3.2の関与を明らかにするため、RNA干渉法によりCa<sub>v</sub>3.2のノックダウン実験を行った。その結果、正常ラットの脊髄内へCa<sub>v</sub>3.2を標的とするsiRNAを反復投与しても影響は見られなかったが、L5腰神経切断に投与すると、DRGにおけるCa<sub>v</sub>3.2量の増加が明らかに抑制され、また痛覚過敏も抑制された(図5)。

(6) 結論

上記の研究成果により、CSE由来内因性H<sub>2</sub>Sは一次知覚神経の末梢端に発現するCa<sub>v</sub>3.2を介して痛覚過敏を誘起すること、また、神経障害性疼痛の病態に知覚神経におけるCa<sub>v</sub>3.2の発現誘導が関与する可能性が示唆された。本研究結果は、CSE/H<sub>2</sub>S/Ca<sub>v</sub>3.2系が神経障害性疼痛の新たな治療標的になりうることを示唆する重要な知見であると思われる。

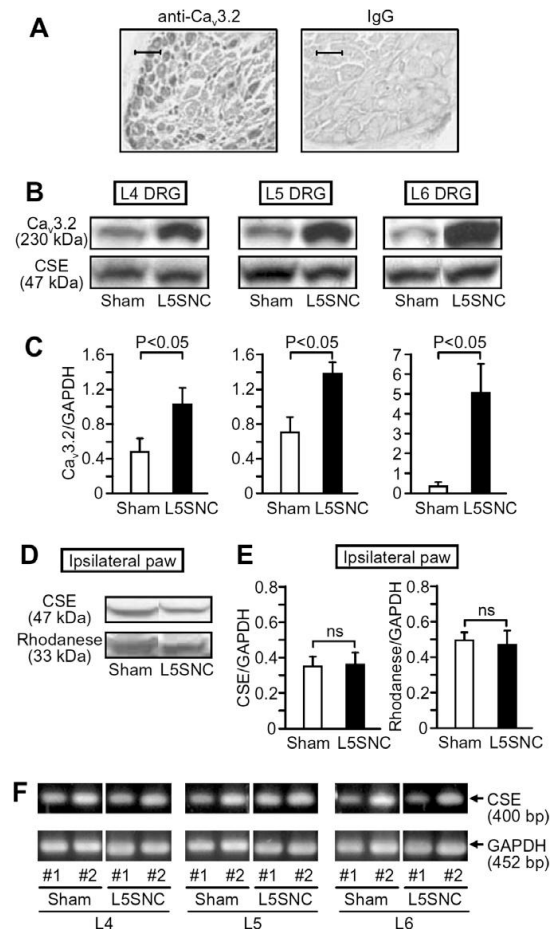


図4 L5腰神経切断誘起神経障害性疼痛ラットにおけるCa<sub>v</sub>3.2およびCSE発現量の変化について

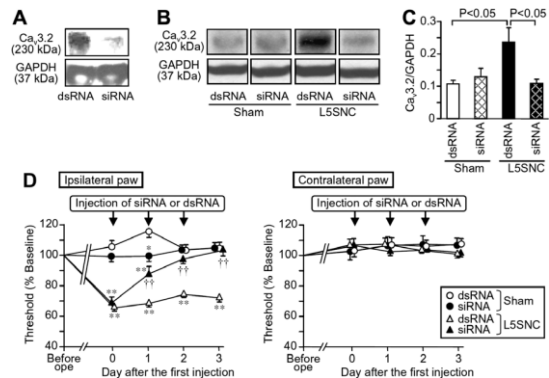


図5 L5腰神経切断誘起神経障害性疼痛に対するCa<sub>v</sub>3.2ノックダウンの影響

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 3件)

- ① Takahashi, T., Aoki, T., Okubo, K., Maeda, Y., Sekiguchi, F., Mitani, K., Nishikawa, H., Kawabata, A., Upregulation of Ca<sub>v</sub>3.2 T-type calcium

channels targeted by endogenous hydrogen sulfide contributes to maintenance of neuropathic pain, Pain, 査読有、Vol. 150, 183-191 (2010)

- ② Maeda, Y., Aoki, Y., Sekiguchi, F., Matsunami, M., Takahashi, T., Nishikawa, H., Kawabata, A., Hyperalgesia induced by spinal and peripheral hydrogen sulfide: Evidence for involvement of  $Ca_v3.2$  T-type calcium channels, Pain, 査読有、Vol. 142, 127-132 (2009)
- ③ 川畑篤史、気体メディエーターとしての硫化水素の神経機能、脳 21、査読無、12 巻、239-245 (2009)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 大久保寿政、松村 緑、松波真帆、川畑篤史。硫化水素によるマウスの機械的痛覚増強における T 型カルシウムチャネルおよび TRPA1 チャネルの異なる役割。第 84 回日本薬理学会年会、2011 年 3 月 22-24 日、横浜。
- ② 大久保寿政、松村 緑、松波真帆、川畑篤史。硫化水素により誘起されるマウスの機械的痛覚過敏とアロディニア：T 型カルシウムチャネルおよび TRPA1 チャネルの異なる役割。第 117 回日本薬理学会近畿部会、2010 年 7 月 8 日、徳島。
- ③ 青木優佳、中川舞子、関口富美子、川畑篤史。サイクリック AMP により誘起される痛覚過敏への T 型カルシウムチャネルの関与。第 83 回 日本薬理学会年会、2010 年 3 月 16-18 日、大阪。
- ④ Okubo, K., Matsunami, M., Takahashi, T., Kawabata, A. Roles of hydrogen sulfide and T-type calcium channels in chemotherapy-evoked neuropathic hyperalgesia in rats. 13<sup>th</sup> Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS 2009), 2009 年 9 月 12-15 日, Florence, Italy.
- ⑤ Aoki, Y., Maeda, Y., Matsunami, M., Kawabata, A. Peripheral hydrogen sulfide induces hypersensitivity to C-fiber-preferential sine-wave stimulation and concomitant potentiation of ERK phosphorylation in the spinal dorsal horn neurons. 13<sup>th</sup> Congress of the European Federation of Neurological Societies (EFNS 2009), 2009 年 9 月 12-15 日, Florence, Italy.
- ⑥ Kawabata, A. Roles of hydrogen sulfide in processing of inflammatory pain. In a symposium, "Hydrogen sulfide in inflammation", The First International Conference of Hydrogen Sulfide in Biology and Medicine, 2009 年 6 月 26-28

日, Shanghai, China.

- ⑦ Kawabata, A. Hydrogen sulfide and pain. In a symposium, "Gases as Neuromodulators in Sensing: From Nitric Oxide to Hydrogen sulfide", Experimental Biology 2009, 2009 年 4 月 18-22 日, New Orleans, USA.
- ⑧ 青木優佳、前田佑美、松波真帆、川畑篤史。末梢組織の硫化水素は C 線維を介する疼痛反応と脊髄後角ニューロンにおける ERK リン酸化を増大させる。第 82 回 日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16-18 日、横浜。
- ⑨ 高橋知子、三谷健治、竹村元秀、関口富美子、川畑篤史。内因性硫化水素の標的分子  $Ca_v3.2$  T 型カルシウムチャネルは神経因性疼痛の保持において重要な役割を示す。第 82 回 日本薬理学会年会、2009 年 3 月 16-18 日、横浜。
- ⑩ 青木優佳、前田佑美、松波真帆、川畑篤史。末梢組織中の硫化水素により誘起される知覚神経 C 線維感受性増大：異波長サイン波刺激に対する反応性変化を指標とした検討。第 114 回日本薬理学会近畿部会、2008 年 11 月 14 日、神戸。
- ⑪ Takahashi, T., Maeda, Y., Kawabata, A. Neuropathic pain involves sensitization of  $Ca_v3.2$  T-type calcium channels by endogenous hydrogen sulfide in sensory nerves. 6<sup>th</sup> FENS Forum of European Neuroscience, 2008 年 7 月 12-16 日, Geneva, Switzerland.

[その他]

ホームページ:

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川畑篤史 (KAWABATA ATSUFUMI)  
近畿大学・薬学部・教授  
研究者番号: 20177728

### (2) 研究分担者

吉田 繁 (YOSHIDA SHIGERU)  
近畿大学・理工学部・教授  
研究者番号: 60145224  
関口富美子 (SEKIGUCHI FUMIKO)  
近畿大学・薬学部・准教授  
研究者番号: 90271410

### (3) 連携研究者

なし