

## 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 25 年 5 月 16 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591756

研究課題名（和文） 癌性疼痛に対する新たな鎮痛薬開発を目指した ATP 受容体に関する疼痛機序の解明

研究課題名（英文） Investigations of pain mechanism related to ATP receptors aiming at new analgesics for cancer pain

研究代表者

佐多竹良（SATA TAKEYOSHI）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：60128030

研究成果の概要（和文）：ATP 受容体に対する鎮痛薬の影響を調べた結果、局所麻酔薬リドカインが、ATP 受容体サブタイプの一つ、P2X<sub>7</sub> の機能を抑制することがわかった。この作用は、受容体に直接作用し、非拮抗的阻害であることが強く示唆された。これらの結果は、いまだ不明なりドカインの癌性疼痛時における鎮痛作用のメカニズムの一つである可能性を示唆するとともに、今後のさらなる研究による新たな鎮痛薬開発への可能性を示している。

研究成果の概要（英文）：We investigated the effects of several analgesics on many subtypes of ATP receptors, and revealed that local anesthetics, lidocaine inhibited the function of P2X<sub>7</sub>, one of the ATP receptor subtypes. We demonstrated that this effect happen through direct effect of lidocaine on P2X<sub>7</sub> receptor, and is non-competitive inhibition. These results suggest that inhibition of P2X<sub>7</sub> function by lidocaine is one of the mechanisms of analgesic effects by lidocaine for cancer pain, which are still unknown, and indicate the possibility of development of new analgesics for cancer pain by further research about this mechanism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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

（1）癌性疼痛は、麻薬や NSAIDs が無効な例も多く、新たな鎮痛薬の開発が望まれている。神経因性疼痛は癌性疼痛の大きな要因であるが、これに対する有効な鎮痛薬は存在しない。従って、神経因性疼痛に対する鎮痛薬の開発が、難治性癌性疼痛に対する新たな鎮痛薬開発の鍵と考えられる。

（2）近年、ATP 受容体が新たな神経因性疼痛の機序として注目されており、ATP 受容体をターゲットにした鎮痛薬の開発は、神経因性疼痛に対する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) ATP 受容体に関する疼痛機構を分子レベルで解析し、神経因性疼痛や癌性疼痛の新たな治療薬の開発に貢献することを目的とした。

(2) 具体的には、理想的な ATP 受容体阻害薬 (3 サブタイプ選択的阻害薬) の開発を目的とし、特に神経系に発現する 3 サブタイプに対する全身麻酔薬や ATP 受容体阻害薬の分子レベルでの作用部位・結合部位を明らかにし、その作用部位の疼痛機序又は薬剤の鎮痛機序への関与について検討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 7 種のイオンチャンネル型 ATP 受容体 (P2X) と 8 種の G 蛋白結合型 ATP 受容体 (P2Y) への全身麻酔薬・阻害薬の影響解析

7 種の P2X (P2X<sub>1</sub>-P2X<sub>7</sub>) と 8 種の P2Y (P2Y<sub>1</sub>-P2Y<sub>14</sub>) 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、ATP 誘発性電流に対する全麻酔薬・阻害薬の影響を解析する。各薬剤のサブタイプ間での作用の違い、あるいは同じサブタイプに対する各薬剤の作用の違いなどを詳細に比較・検討する。

(2) 遺伝子変異株を用いた電気生理学的手法による全身麻酔薬・阻害薬の作用部位の同定

(1) より得られた結果と、ATP 受容体サブタイプ間のアミノ酸配列の違いを元に、疼痛発現に関与しているサブタイプ (P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub>) に対する阻害薬の作用部位として重要な部位をポイントミューテーションさせ、P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub> の遺伝子変異 cRNA を作成する。これを発現させ、遺伝子変異 P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub> における ATP 誘発性電流に対する全身麻酔薬・阻害薬の影響を解析することにより、作用部位を明らかにする。

(3) マウスを用いた行動薬理学による *in vivo* での疼痛機序解析

① 遺伝子変異マウス及び癌性疼痛モデルマウスの作成

(2) から得られた結果を元に、阻害薬の作用部位と考えられる部位を変異させた遺伝子変異マウスを作成する。また、野生型及び遺伝子変異型マウスにおける癌性疼痛モ

デルマウスを作成する。

② 行動薬理的解析による疼痛機序の解析

作成した遺伝子変異マウスと癌性疼痛モデルマウスに対する阻害薬の影響を行動薬理的に解析する。これによって、電気生理学の実験により発見された作用部位が疼痛機序に関与しているかどうかを確認する。

(4) 電気生理学的手法 (パッチクランプ法) による脊髄後根神経節 (DRG) 細胞と脊髄ミクログリア細胞に発現している ATP 受容体への全身麻酔薬・阻害薬の影響解析

(3) で作成した遺伝子変異マウスと癌性疼痛モデルマウスの DRG 細胞に発現している P2X<sub>3</sub> と、脊髄ミクログリア細胞に発現している P2X<sub>4</sub>、P2Y<sub>12</sub> に対する全身麻酔薬・阻害薬の影響をパッチクランプ法によって解析する。これにより、①~③の結果のさらなる裏付けを行う。

## 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 P2X<sub>3</sub> に対する鎮痛薬の影響解析

疼痛発現に関与すると考えられている P2X<sub>3</sub> の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にチャンネルを発現させ、Voltage-clamp 法によって、P2X<sub>3</sub> の ATP 誘発性電流に対する鎮痛薬 (ガバペンチン、プレガバリン、トラマドール)、抗うつ薬 (アミトリプチリン、ノルトリプチリン、イミプラミン、デュロキセチン)、局所麻酔薬 (リドカイン、メピバカイン、ロピバカイン、ブピバカイン) の影響を解析した。P2X<sub>3</sub> における ATP 濃度反応曲線を作成し、EC<sub>50</sub> を求め (1.8 μM)、これに近い濃度、ATP 2 μM による誘発性電流に対する薬物の影響を調べた。全ての薬物に対して有意な影響は認められなかった。

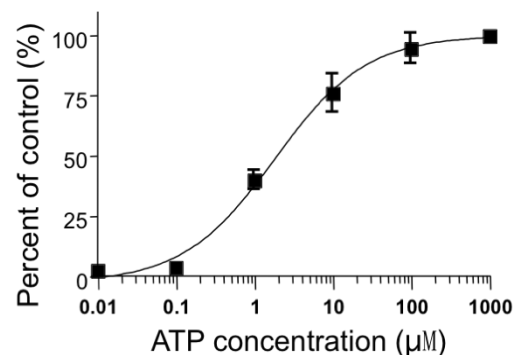


図1 P2X<sub>3</sub>におけるATP濃度反応曲線

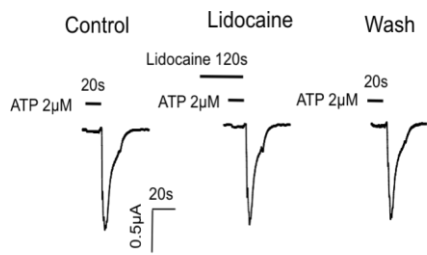


図2 P2X<sub>3</sub>に対するリドカインの影響

(2) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた P2X<sub>4</sub> に対する鎮痛薬の影響解析

P2X<sub>3</sub> 同様に疼痛発現に関与すると考えられている P2X<sub>4</sub> の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にチャネルを発現させ、Voltage-clamp 法によって、P2X<sub>4</sub> の ATP 誘発性電流に対する上記鎮痛薬、抗うつ薬、局所麻酔薬の影響を解析した。P2X<sub>3</sub> と同様に ATP 濃度反応曲線を作成し、EC<sub>50</sub> を求め (11.3 µM)、これに近い濃度、ATP 10 µM による誘発性電流に対する薬物の影響を調べた。全ての薬物に対して有意な影響は認められなかった。

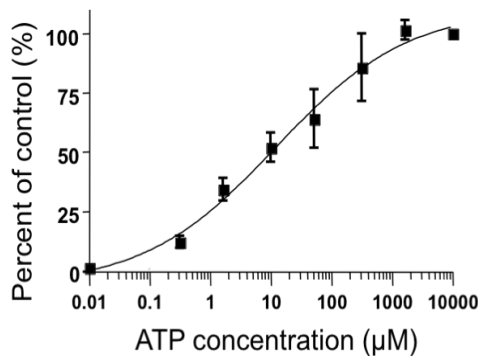


図3 P2X<sub>4</sub>におけるATP濃度反応曲線

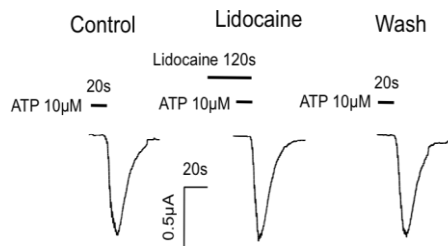


図4 P2X<sub>4</sub>に対するリドカインの影響

(3) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた P2X<sub>7</sub> に対する鎮痛薬の影響解析

P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub> 同様に疼痛発現に関与すると考えられている P2X<sub>7</sub> の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にチャネルを発現させ、Voltage-clamp 法によって、

P2X<sub>7</sub> の ATP 誘発性電流に対する上記鎮痛薬、抗うつ薬、局所麻酔薬の影響を解析した。P2X<sub>3</sub>、P2X<sub>4</sub> と同様に ATP 濃度反応曲線を作成し、EC<sub>50</sub> を求め (1.1mM)、これに近い濃度、ATP 1mM による誘発性電流に対する薬物の影響を調べた。その結果、上記鎮痛薬のうち、局所麻酔薬リドカインのみが、P2X<sub>7</sub> の機能を抑制することを発見した。

10 µM、30 µM、0.1mM、0.3mM、1mM、3mM のリドカインは、ATP 誘発性電流をそれぞれ、93.2 ± 3.8%、89.4 ± 4.8%、65.1 ± 7.9%、45.0 ± 5.5%、26.0 ± 7.3%、8.8 ± 1.5% に濃度依存性に抑制し、0.1mM 以上の濃度では有意な抑制であった。

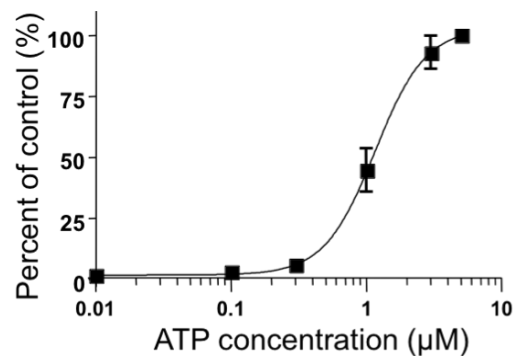


図5 P2X<sub>7</sub>におけるATP濃度反応曲線

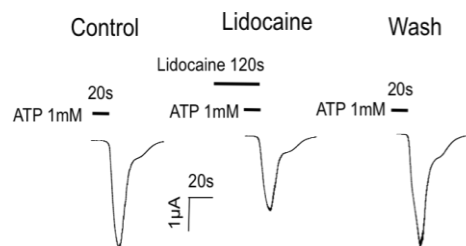


図6 P2X<sub>7</sub>に対するリドカインの影響

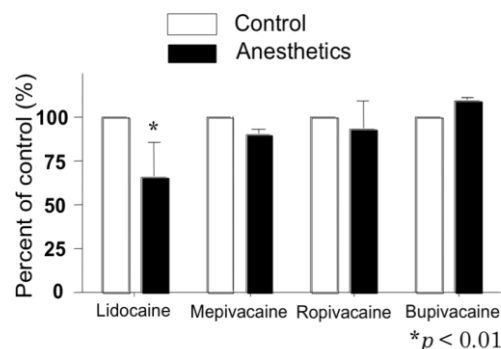


図7 P2X<sub>7</sub>に対する局所麻酔薬の抑制効果の比較

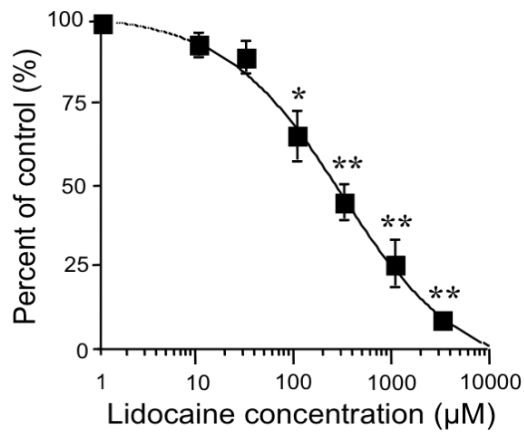


図8 P2X<sub>7</sub>に対するリドカインの抑制効果の濃度反応曲線

(4) P2X<sub>7</sub>に対するリドカインの抑制機序の検討

リドカインの抑制機序について検討するために、10 μM~5mMのATP濃度反応曲線に対するリドカイン0.3mMの抑制効果を検討した。その結果、リドカインの非投与下、投与下における slope factor と EC<sub>50</sub>はそれぞれ、3.7 ± 0.9、4.8 ± 1.1、1.2 ± 0.1mM、1.4 ± 0.2mM、であり、有意な変化はなかったが、最大反応量 E<sub>max</sub>はリドカインによって、49 ± 4.1%まで抑制された。従って、リドカインが EC<sub>50</sub>を変化させずに最大反応量を減少させたことから、その阻害形式は、非拮抗阻害である可能性が示唆された。

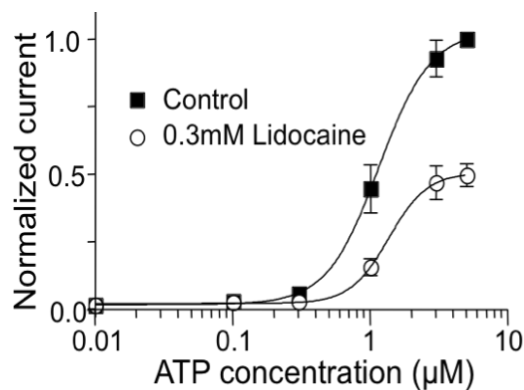


図9 P2X<sub>7</sub>におけるATP濃度反応曲線に対するリドカインの抑制効果

リドカインの全身投与は、癌性疼痛患者において有効な鎮痛効果を発揮する場合がありますが、鎮痛法の一つとして行われているが、そのメカニズムについては明らかにされていない。

今回の結果より、リドカインが P2X に対してサブタイプ選択性を持った P2X<sub>7</sub> の阻害薬であることが示された。このことは、リドカインの P2X<sub>7</sub> 抑制作用が、癌性疼痛をはじめと

した慢性疼痛時における鎮痛機序の一つである可能性を示唆するとともに、慢性疼痛機序における P2X<sub>7</sub> の重要な役割を示唆している。

また、リドカインのサブタイプ選択的抑制効果は、リドカインが細胞内メカニズムでなく、P2X<sub>7</sub>受容体そのものに作用していることを強く示唆しており、今後、P2X<sub>7</sub>の活性化・抑制のメカニズムや構造を考慮し、リドカインの作用機序を解明していくことが重要な意味を持ち、新たな鎮痛薬開発につながる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文

(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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

発表者名：大倉暖、堀下貴文、佐多竹良  
 発表演題：リドカインはATP受容体サブタイプ、P2X<sub>7</sub>受容体機能を抑制する  
 学会名：日本麻酔科学会第60回学術集会  
 発表年月日：平成25年5月23日(発表予定)  
 発表場所：札幌(ロイトン札幌)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐多 竹良 (SATA TAKEYOSHI)  
 産業医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：60128030

(2) 研究分担者

堀下貴文 (HORISHITA TAKAFUMI)  
 産業医科大学・医学部・講師  
 研究者番号：40369070  
 大倉暖 (OOKURA DAN)  
 産業医科大学・医学部・産業医学修練医  
 研究者番号：00596710

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：