

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102
研究種目：若手研究(A)
研究期間：2011～2013
課題番号：23689068
研究課題名(和文) 鎮痛補助薬のTRPチャンネルに対する作用の検討

研究課題名(英文) Effect of analgesic adjuvant on TRP channels

研究代表者

辛島 裕士 (Karashima, Yuji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：80380434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円、(間接経費) 4,320,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、慢性疼痛や癌性疼痛の治療補助に頻用されるアセトアミノフェン、抗てんかん薬(ガバペンチン、クロナゼパム)、プレガバリンの痛みに関与すると報告されているTRPチャンネルに対する直接作用を、電気生理学的手法を用いて解明すること目的とした。アセトアミノフェンは、その代謝産物がTRPA1に作用するがTRPV1には作用しないことが明らかになった。また抗てんかん薬(ガバペンチン、クロナゼパム)とプレガバリンはTRPA1、TRPV1のいずれにも直接作用がないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the effect of analgesics and adjuvant analgesics on TRP channels which are reported to be participated in pain by using the patch clamp technique. Acetaminophen, antiepileptic drugs (gabapentin, clonazepam), and pregabalin which are frequently used for chronic pain and cancer pain were evaluated. As for acetaminophen, its metabolites acted on TRPA1 but not on TRPV1. Antiepileptic drugs such as gabapentin and clonazepam, and pregabalin have no direct action on both TRPA1 and TRPV1.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：麻酔・蘇生学

キーワード：TRPチャンネル 鎮痛薬 パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景

「痛み」は「実質的または潜在的な組織損傷に結びつく、あるいはこのような損傷を表わす言葉を使って述べられる不快な感覚・情動体験である」と定義される(国際疼痛学会)。癌性疼痛および周術期の痛みを含め、痛みのコントロールは患者の医療に対する満足度を考える上で重要であることは言うまでもない。しかし痛みの種類は多岐に渡り、患者個々によって異なる。これまで様々な手法が試みられているが、必ずしも満足な結果が得られているわけではない。そのためペインクリニックおよび緩和医療における疼痛管理には、オピオイド、NSAIDs、局所麻酔薬に加え、アセトアミノフェン、抗うつ薬、抗てんかん薬等を併用しながら試行錯誤で治療を行っている状態である。疼痛に対する治療は、長年モルヒネを中心としたオピオイド、NSAIDs、局所麻酔薬等に頼っており、それでもなお痛みのコントロールは難しく、これまで解明された痛みの機序の他に、近年新たな痛みの機序としてのTRP (Transient Receptor Potential) チャンネルの関与が注目されており研究が進んでいる。TRP チャンネルファミリーは様々な細胞機能、特に感覚機能に関与する新しいチャンネル群として近年研究の進んでいる分野である。TRP チャンネルは6 回膜貫通型の非選択性陽イオンチャンネルであり、哺乳類のTRP スーパーファミリーは6 つのサブグループ(TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPP, TRPML) に大きく分かれる。またそれぞれのサブグループは更に細分化される(TRPC1-7, TRPV1-6, TRPM1-8, TRPA1, TRPP2,3,5, TRPML1-3)。そのうち末梢神経に発現するTRP チャンネル(TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8、TRPA1) は痛みに関与する受容体として注目を浴びている。例えば、TRPV1 は唐辛子の成分であるカプサイシンや熱(42 以上) に反応するチャンネルであり、TRPA1 はマスタードオイルやワサビなどの成分であるAITC (Allyl isothiocyanate) に反

応することが知られている。いずれの活性化物質も度を過ぎれば痛みになると我々が日常で感じることのできるものである。そのため従来の痛みの治療に変わるTRP チャンネルに作用する新たな種類の鎮痛薬創薬が期待されている。実際、TRPV1 作動薬であるカプサイシン(唐辛子の成分) はペインクリニック領域で痛みの治療に用いられており、また、新たな鎮痛薬としてのTRPV1 ブロッカーの治療も第 相試験まで進んできている。

我々はこれまでTRPA1 が痛み受容チャンネルである可能性に着目し、主に電気生理学的手法を用いて研究を行い、以下のような報告を行ってきた。

TRPA1 は冷たい刺激(17 以下) に反応する痛み刺激受容体である(Karashima, et al. PNAS. 2009)

ニコチンの痛み刺激はTRPA1 活性化によって生じるものである(Talavera, Karashima, et al. Nat Neurosci. 2009)

TRPA1 はメンソールに対し活性化と抑制の二相性の反応を示す(Karashima, et al. J Neurosci. 2007)

抗真菌薬クロトリマゾールによる痛み刺激はTRPV1 及びTRPA1 の活性化による(Meseguer, Karashima, et al. J Neurosci. 2008)

TRPA1 のCa²⁺選択性はアゴニストによって変化する(Karashima, et al. Biophys J. 2009)

TRPA1 のチャンネル活性はPIP₂ の修飾を受ける(Karashima, et al. Pflugers Arch. 2008)

アセトアミノフェンは以前より全世界的、特に欧米で日常的に利用されている解熱鎮痛薬であり、また近年、癌性疼痛に対する補助治療薬としての役割も挙げられている。そのため、今後NSAIDs の使用が中心の日本においても利用が増えてくることが予想される。しかし、長年使用されているにも関わらず、未だ

にその機序は不明である。また抗てんかん薬（ガバペンチン、クロナゼパム）やプレガバリンも慢性疼痛の治療に使われるが、これらの痛みに対する機序も完全に解明されたとは言い難い。

我々は予備実験においてアセトアミノフェンがTRPA1のチャンネル活性に影響を与えることを明らかにした。しかしその機序はまだ未解明な部分が多く、またそれ以外のTRPチャンネルに対する効果も不明である。また抗てんかん薬（ガバペンチン、クロナゼパム）やプレガバリンの鎮痛効果とTRPチャンネルの関連性についての報告もほとんど見られない。本研究において、これらの薬物のTRPチャンネルに対する分子機序を解明することにより、痛みの機序に関する新たな知見が得られるものと考えられる。

2. 研究の目的

アセトアミノフェン、抗てんかん薬（ガバペンチン、クロナゼパム）、プレガバリンは慢性疼痛や癌性疼痛の治療補助に頻用されている。しかし、その痛みに対する機序は不明、もしくは完全に解明されたとは言い難い。TRPチャンネルの一群は、末梢神経細胞に発現し痛みに関係すると報告されている。そこで本研究では、アセトアミノフェン、抗てんかん薬（ガバペンチン、クロナゼパム）、プレガバリンのTRPチャンネルに対する直接作用を検討するとともに、細胞内カルシウム測定法、パッチクランプ法を用いた生理学的手法、種々の薬理的阻害薬を用いた実験により、その機序を可能な限り解明することを目的とする。

3. 研究の方法

末梢神経に発現し、痛みとの関与が指摘されているTRPチャンネル（TRPA1、TRPV1、TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8）をHEK細胞もしくはCHO細胞に一過性発現させる。次に細胞内カルシウム測定装置を用いて、慢性疼痛や癌性疼痛のコントロールに用いられているアセトアミ

ノフェン、抗てんかん薬（ガバペンチン、クロナゼパム）及びプレガバリンのそれぞれのTRPチャンネルに対する反応のスクリーニングを行う。次に反応のあったものに対しては、パッチクランプ法により電気生理学的特性を明らかにしTRPチャンネルに対する薬物の作用機序の解明を行う。最後にマウスの三叉神経または後根神経の単離細胞を用いて、過剰発現させた系と同様の反応がみられるかの検討を行う。

4. 研究成果

アセトアミノフェンのTRPチャンネルに対する作用に関して検討。

i) アセトアミノフェンおよびその代謝産物とTRPA1

申請当時、細胞内Ca濃度測定による予備実験においてアセトアミノフェンの代謝産物であるN-acetyl-p-benzo-quinoneimine (NAPQI) およびp-benzoquinone(p-BQ)がmTRPA1のチャンネル活性に影響を与えることを明らかにしていたので、その作用機序に関して更なる検討を進めることを目的とした。

TRPA1は主に侵害受容ニューロンのA δ -およびC-fiberに発現し、炎症時には発現の割合が多くなることが知られ炎症痛との関連が強く示唆されている。

mTRPA1を一過性に過剰発現させたCHO細胞におけるホールセルパッチクランプ法においても細胞内Ca濃度測定と同様にNAPQIおよびp-BQによりmTRPA1の活性化がみられた。そして、これら物質による活性化はdose-dependentであった（mTRPA1の活性化パターンは、代表的活性化物質であるAITCのようにdose-dependentに活性化パターンを示すものと、メントールやニコチンのように低容量で活性化し高容量で抑制するという二峰性のパターンを示すものがあることが知られている）。

細胞内外のCa濃度を变化させた実験系においては、NAPQIおよびp-BQによるmTRPA1

の活性化には細胞外 Ca の存在が重要であることが示された。また細胞内 Ca の存在は mTRPA1 の活性化を増幅させることが判明した。

またアセトアミノフェンそのものでは TRPA1 の活性化は認められなかった。更に、NAPQI と p-BQ 以外のアセトアミノフェンの代謝産物として報告されている AM404 では活性化は認められなかった。

上記結果をもとに更にマウスを用いた研究を進める予定であったが、本研究期間中に他施設より相次いで重なるテーマの研究報告が発表された (FASEB J. 2010 Dec;24(12):4904-16 & Nat Commun. 2011 Nov 22;2:551.) ためアセトアミノフェンとその代謝産物の TRPA1 に対する作用の検討は中断することとした。

ii) アセトアミノフェンおよびその代謝産物と TRPV1

次に TRPV1 に対するアセトアミノフェンおよびその代謝産物である NAPQI、p-BQ の作用の検討を行った。

TRPV1 は主に侵害受容ニューロンの A_δ-および C-fiber において TRPA1 の多くが共発現するチャンネルであり TRPA1 と同様に痛みに関与することが報告されている。

HEK 細胞に一過性に発現させた TRPV1 においてホールセルパッチクランプを施行した。しかしアセトアミノフェン、NAPQI、p-BQ のいずれの物質も TRPV1 に対する直接作用を示さなかった。また TRPV1 のアゴニストであるカプサイシンによる TRPV1 のチャンネル活性をアセトアミノフェン、NAPQI、p-BQ のいずれの物質も抑制しなかった。

尚、NAPQI と p-BQ 以外のアセトアミノフェンの代謝産物として報告されている AM404 による TRPV1 の活性化はすでに報告されており (PLoS one. 2010 Sep; 5(9):e12748)、本研究では行っていない。

iii) アセトアミノフェンおよびその代謝産物とその他の TRP チャンネル

TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8 に関しても同様の検討を行う予定であったが、研究期間内ではこれらチャンネルに関しての実験は行っていない。

痛みの研究では TRPV1 が先行しているが、近年、炎症や神経因性疼痛への TRPA1 の関与が多く報告されている。本研究のアセトアミノフェンの作用が TRPV1 ではなく TRPA1 に関与しているということは、慢性疼痛や癌性疼痛等の痛みに関しては TRPA1 が非常に大きな役割を果たしている可能性を示唆しており TRPA1 に関与する新薬の開発が期待される。

抗てんかん薬 (ガバペンチン、クロナゼラム)、プレガバリンの TRP チャンネルに対する作用に関して検討。

細胞内 Ca 測定の系において (一部ホールセルパッチクランプ法を用いて) 検討を行った。

HEK 細胞に TRPA1 および TRPV1 を一過性に発現させた系においては、上記のいずれの物質も直接作用は及ぼさなかった。

TRPV2、TRPV3、TRPV4、TRPM8 に関しても同様の検討を行う予定であったが、研究期間内ではこれらチャンネルに関しての実験は行っていない。

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 0 件)

{ 学会発表 } (計 0 件)

{ 図書 } (計 0 件)

{ 産業財産権 }
出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辛島 裕士 （からしま ゆうじ）

研究者番号：80380434