

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462462

研究課題名(和文) 選択的Nav1.3阻害薬の開発を目指した、電位依存性Naチャンネルの抑制機序解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms underlying inhibition of voltage-gated sodium channel aimed at development of selective inhibitor on Nav1.3

研究代表者

佐多 竹良 (SATA, Takeyoshi)

産業医科大学・大学病院・病院長

研究者番号：60128030

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経障害性疼痛に対する新たな鎮痛薬としてのNav1.3選択的阻害薬の開発に貢献するため、神経障害性疼痛に対する治療薬として使用されている抗うつ薬と、新たな治療薬として期待されるニューロステロイド、アロプレグナノロンの代謝物、アロプレグナノロン硫酸塩の電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニット、Nav1.3に対する影響を電気生理学的に調べた。その結果、これらの薬剤が、濃度依存性にNav1.3機能を抑制することを発見した。さらにこれらの抑制効果は、 α 3サブユニットとの共発現によって増強されることを発見した。これらの結果は、Nav1.3機能抑制機序を解明するのに役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated the effects of antidepressants as conventional medications for neuropathic pain, and allopregnanolone sulfate, the metabolite of allopregnanolone that is desired as a new medication for neuropathic pain on voltage-gated sodium channel α 3 subunit, Nav1.3 electrophysiologically in order to contribute the development of selective Nav1.3 inhibitor as a new analgesic for neuropathic pain. We found that these compounds inhibit the function of Nav1.3 dose-dependently. Moreover, we demonstrated that these inhibitory effects were enhanced by co-expression with α 3 subunit. These results would help to clarify the mechanisms underlying inhibition of Nav1.3 function, and contribute the development of selective Nav1.3 inhibitor.

研究分野：麻酔科学

キーワード：神経障害性疼痛 電位依存性ナトリウムチャンネル Nav1.3サブユニット Nav1.3選択的阻害薬 新たな鎮痛薬開発

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛は、難治性の慢性疼痛を形成する病態の一つであり、新たな鎮痛薬の開発が望まれている。脊髄後根神経節(DRG)に発現する電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav)の α サブユニット、Nav1.3、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9が疼痛発現機序に深く関与していることが明らかになっており、選択的ナトリウムチャンネル阻害薬の研究が進められているが、未だに有効な鎮痛薬開発にはつながっていない。

(2) 一方、神経障害性疼痛時には、Nav1.3のみの発現量が増加し、その他のサブユニットの発現量は減少することが報告されており、神経障害性疼痛発現への最も強い関与が示唆されるNav1.3に対する選択的阻害薬の開発は、神経障害性疼痛に対する有効な鎮痛薬開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

難治性の神経障害性疼痛に対する新たな鎮痛薬としての選択的Nav1.3阻害薬の開発に貢献するために、Nav1.3の抑制機序を分子レベルで解析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)と分子生物学的手法を用いた選択的Nav1.3、Nav1.7阻害薬の作用部位の同定-1(Nav1.3に対する作用部位)

これまでに報告されているNav1.3とNav1.7をほぼ同等に阻害する薬物、2,4-diaminotriazine 52のNav1.3に対する作用部位を分子レベルで同定する。 α サブユニットのアミノ酸配列を比較し、その他のサブユニットと異なる部位を抽出し、Nav1.3の抑制に重要と思われる部位を想定し、これらの部位をポイントミューテーションさせたNav1.3の遺伝子変異型cRNAを作成する。これら遺伝子変異型Nav1.3と野生型Nav1.3に対する2,4-diaminotriazine 52の影響の違いを、アフリカツメガエル卵母細胞発現系による再構築系の実験により電気生理学的に解析し、それらの影響の違いを元に、2,4-diaminotriazine 52のNav1.3に対する作用部位を同定する。

(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)と分子生物学的手法を用いた選択的Nav1.3、Nav1.7阻害薬の作用部位の同定-2(Nav1.7に対する作用部位)

(1)と同様に、2,4-diaminotriazine 52のNav1.7に対する作用部位を分子レベルで同定する。Nav1.7の抑制に重要と思われる部位を想定し、これらの部位に関するNav1.7の遺伝子変異型cRNAを作成する。野生型Nav1.7と遺伝子変異型Nav1.7に対する2,4-diaminotriazine 52の影響を電気生理学的に解析し、2,4-diaminotriazine 52のNav1.7に対する作用部位を同定する。

(3) 電気生理学的手法(アフリカツメガエル卵母細胞発現系)と分子生物学的手法を用いたNav1.3のみを選択的に阻害するために重要な部位の同定

(1)、(2)で得られた結果より、2,4-diaminotriazine 52の作用部位に関して、Nav1.3とNav1.7で共通した作用部位が同定されるため、Nav1.3あるいはNav1.7のみに存在する作用部位が同定される。そこで、Nav1.3のみに存在する作用部位について、ポイントミューテーションの様々な組み合わせを行った遺伝子変異型cRNAを作成することにより、Nav1.3のみを選択的に阻害するために重要な構造について、さらなる解析を行う。

(4) 遺伝子変異マウスと神経障害性疼痛モデルマウスによる鎮痛効果の検討

(1)~(3)で同定された作用部位の遺伝子変異マウスと神経障害性疼痛モデルマウスを作成し、2,4-diaminotriazine 52の鎮痛効果の検討を、行動薬理的に行う。

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Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8に対する抗うつ薬(アミトリプチリン、イミプラミン、ノルトリプチリン、デュロキセチン)の影響解析

抗うつ薬は、神経障害性疼痛に対する鎮痛薬として使用されるが、その作用機序としてナトリウムチャンネルの抑制作用の関与が示唆されている。Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8において、約半分のカレントの得られる保持電位(-40~-70mV)($V_{1/2}$)から-20mV~+10mVに脱分極させ、得られたカレント(チャンネルの不活性化状態を表す)に対する4種の抗うつ薬の影響を調べ、濃度反応曲線を作成した。

全ての抗うつ薬は、全てのNav α サブユニットにおいて、濃度依存性にナトリウムカレントを抑制した。アミトリプチリンのNav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8に対するIC₅₀値はそれぞれ、55.6±6.5、8.4±1.5、40.7±4.3、4.6±2.3、10.4±0.8であり、イミプラミンの上記5種 α サブユニットに対するIC₅₀値はそれぞれ、67.8±12.2、11.2±1.2、63.1±13.5、7.9±0.4、15.4±0.9であり、ノルトリプチリンの上記5種 α サブユニットに対するIC₅₀値はそれぞれ、44.8±4.7、14.0±1.8、63.0±8.5、12.8±0.8、19.1±0.6であり、デュロキセチンの上記5種 α サブユニットに対するIC₅₀値はそれぞれ、74.1±10.2、24.9±1.8、73.2±11.5、11.7±3.2、17.2±3.5 μ mol/Lであった(図1~4)。これらの結果から、Nav1.2、Nav1.6と比較し、Nav1.3、Nav1.7、Nav1.8に対する抗うつ薬の強い抑制作用が明らかとなり、後者3つのサブユニットが抗うつ薬の作用部位として重要であ

ることが示唆された。

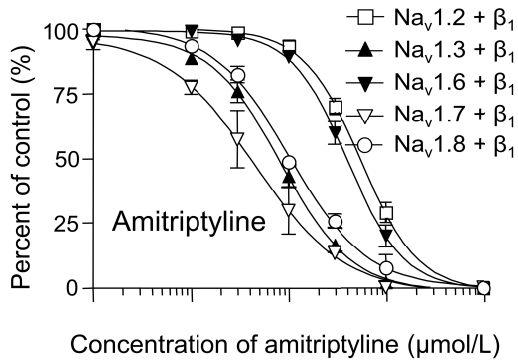


図 1. 4 種の $Na_v\alpha$ サブユニットに対するアミトリプチリンの抑制効果 (濃度反応曲線)

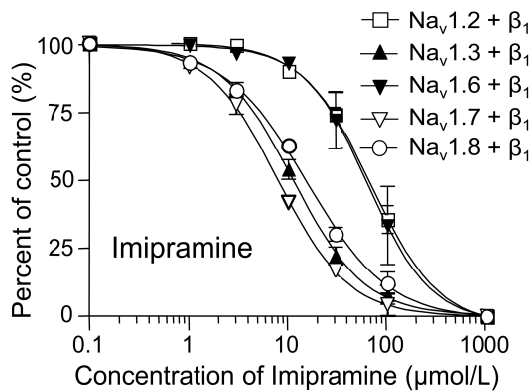


図 2. 4 種の $Na_v\alpha$ サブユニットに対するイミプラミンの抑制効果 (濃度反応曲線)

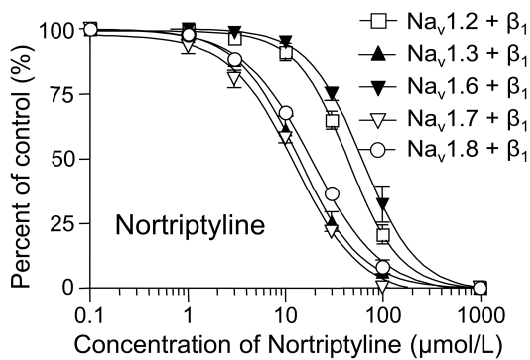


図 3. 4 種の $Na_v\alpha$ サブユニットに対するノルトリプチリンの抑制効果 (濃度反応曲線)

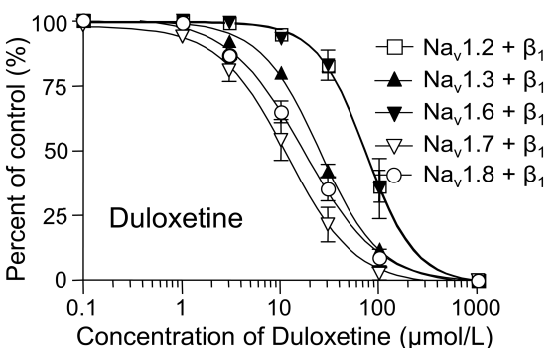


図 4. 4 種の $Na_v\alpha$ サブユニットに対するデュロキセチンの抑制効果 (濃度反応曲線)

(2) Na_v の活性化に対する 4 種の抗うつ薬の影響解析

抗うつ薬による Na_v 抑制機序を解析するために、抑制作用の強かった $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ におけるチャンネルの活性化に対する抗うつ薬の影響を調べた。最大カレントの得られる保持電位 V_{max} (-90 又は -100mV) から 60mV まで 10mV の間隔で 50ms 脱分極させて発生させたカレントに対する抗うつ薬の影響を調べ、さらに Boltzmann の式より得られた activation curve の midpoint ($V_{1/2}$) を算出した。4 種の抗うつ薬は、3 種のサブユニット全てにおいて、わずかながら $V_{1/2}$ を脱分極方向へシフトさせた (2.3mV 未満)。この結果から、チャンネルの活性化の抑制が、3 種のサブユニットに対する抗うつ薬の抑制効果のメカニズムの一つであることが示された。

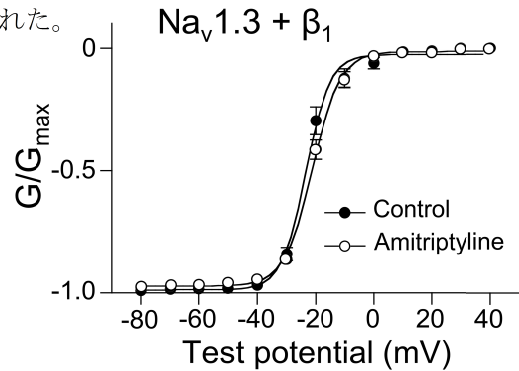


図 5. $Na_v1.3$ の活性化に対するアミトリプチリンの影響

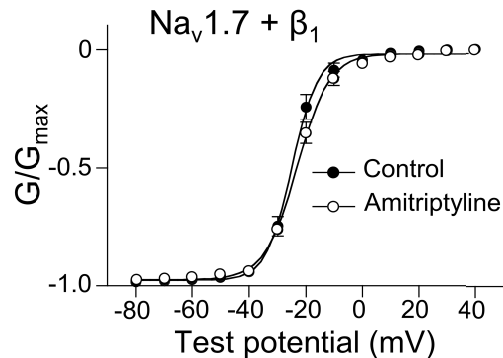


図 6. $Na_v1.7$ の活性化に対するアミトリプチリンの影響

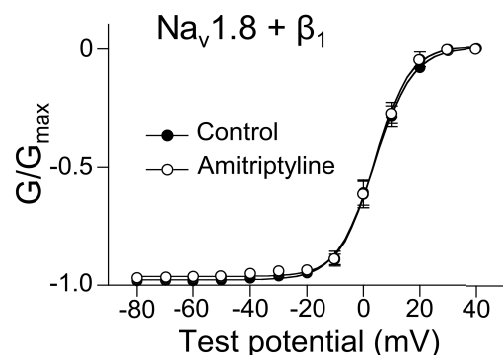


図 7. $Na_v1.8$ の活性化に対するアミトリプチリンの影響

(3) Na_v の不活性化に対する4種の抗うつ薬の影響解析

さらに、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ におけるチャンネルの不活性化に対する抗うつ薬の影響を調べた。 $-140mV$ から $0mV$ まで $10mV$ おきに $200ms$ のプレパルスを与え、その後、 $-10mV \sim +10mV$ まで $50ms$ 脱分極させ、脱分極性カレントに対する抗うつ薬の影響を調べた。その結果、全ての抗うつ薬は3種のサブユニットにおいて、inactivation curve の $V_{1/2}$ を過分極方向へシフトさせた ($2.5 \sim 8.9mV$)。この結果から、チャンネルの不活性化の促進が、3種のサブユニットに対する抗うつ薬の抑制効果のメカニズムの一つであることが示された。

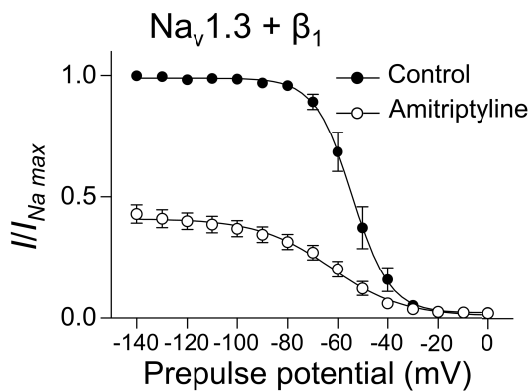


図 8. $Na_v1.3$ の不活性化に対するアミトリプチリンの影響

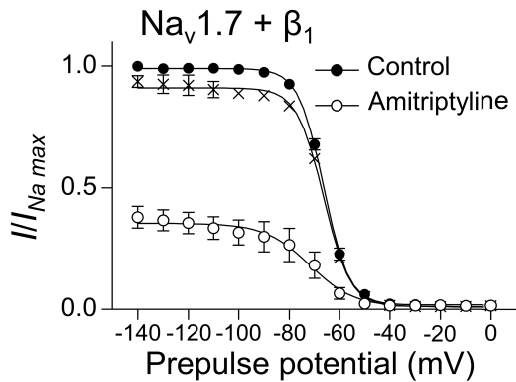


図 9. $Na_v1.7$ の不活性化に対するアミトリプチリンの影響

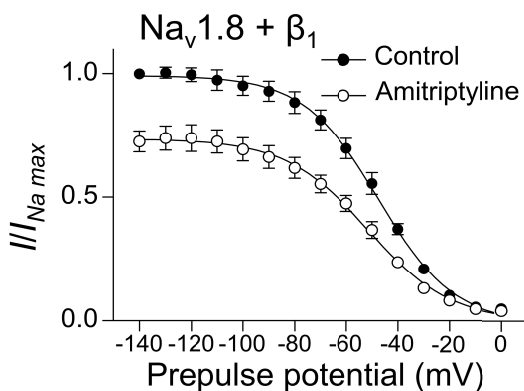


図 10. $Na_v1.8$ の不活性化に対するアミトリプチリンの影響

(4) 4種の抗うつ薬の使用依存性に関する検討

抗うつ薬による $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ の抑制メカニズムをさらに解明するため、4種の抗うつ薬の使用依存性に関する検討を行った。その結果、4種の抗うつ薬は3種全てのサブユニットにおける脱分極性カレントを使用依存性に抑制した。この結果から、抗うつ薬は、これら3種のサブユニットにおいてチャンネルのポアに作用することが示唆された。

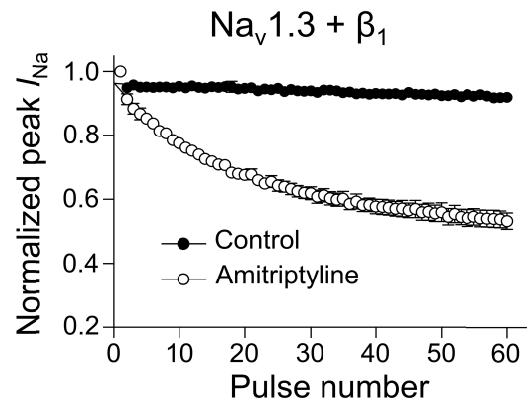


図 11. $Na_v1.3$ におけるアミトリプチリンの使用依存性効果の検討

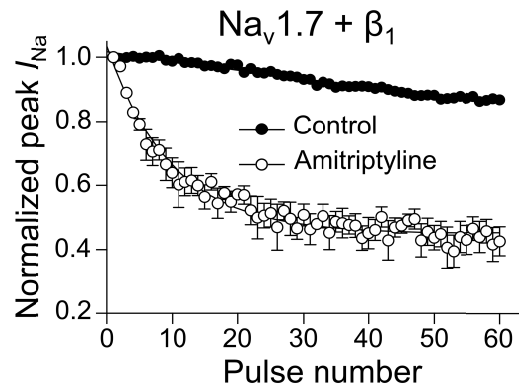


図 12. $Na_v1.7$ におけるアミトリプチリンの使用依存性効果の検討

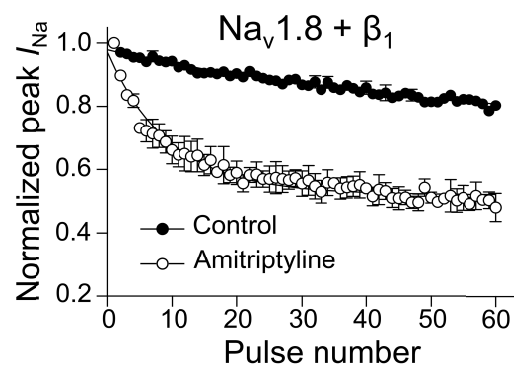


図 13. $Na_v1.8$ におけるアミトリプチリンの使用依存性効果の検討

(5) 4種の抗うつ薬の $Na_v1.3$ 抑制効果に対する β_3 サブユニットの影響解析

ナトリウムチャンネル β サブユニットには、 $\beta_1 \sim \beta_4$ の4種のサブユニットが発見されており、このうち、神経障害性疼痛時には、 $Na_v1.3$ とともに、 β_3 の発現量が増加することが報告されており、 β_3 と神経障害性疼痛との関連性が示唆されている。そこで、 $Na_v1.3$ と β_3 を共に発現させ、これに対する抗うつ薬の影響を調べた。その結果、アミトリプチリンとデュロキセチンの作用は、 β_3 とともに発現させた $Na_v1.3$ に対する作用の方が、有意に強い効果であることが示された。濃度反応曲線の IC_{50} は、アミトリプチリン： $Na_v1.3+\beta_1$ ($8.2 \pm 1.6 \mu\text{mol/L}$) vs $Na_v1.3+\beta_3$ ($4.5 \pm 0.4 \mu\text{mol/L}$)、デュロキセチン： $Na_v1.3+\beta_1$ ($24.9 \pm 1.8 \mu\text{mol/L}$) vs $Na_v1.3+\beta_3$ ($12.6 \pm 2.5 \mu\text{mol/L}$) であった。これらの結果は、神経障害性疼痛時における抗うつ薬の作用機序の一つとして、 $Na_v1.3$ の抑制作用が重要であることを示唆している。

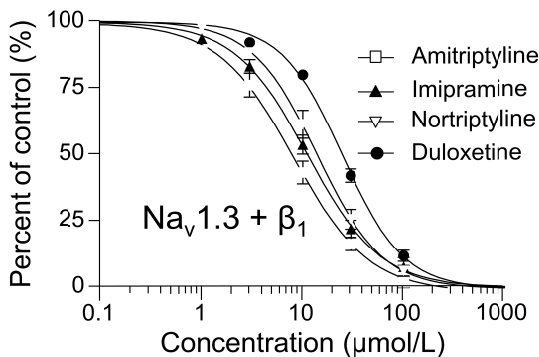


図 14. β_1 と共に発現させた $Na_v1.3$ に対する抗うつ薬の影響 (濃度反応曲線)

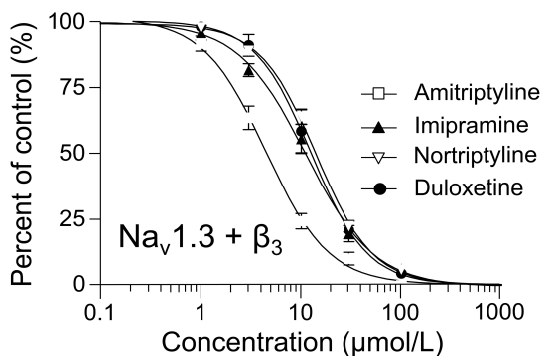


図 15. β_3 と共に発現させた $Na_v1.3$ に対する抗うつ薬の影響 (濃度反応曲線)

(6) β_3 と共に発現させた $Na_v1.3$ の活性化に対する4種の抗うつ薬の影響解析

β_3 と共に発現した $Na_v1.3$ におけるチャンネルの活性化に対する抗うつ薬の影響を調べた。4種の抗うつ薬は、 β_1 と共に発現させた $Na_v1.3$ に対する影響と比較して、 β_3 と共に発現させた $Na_v1.3$ において、より強く activation curve の $V_{1/2}$ を脱分極方向へシフトさせる傾向にあった。特に、アミトリプチリンの作用が最も強く、5.0mV のシフトを示

した。この結果から、チャンネルの活性化抑制に関して、 β_3 サブユニットがその効果を調節している可能性が示された。

$Na_v1.3 + \beta_3$

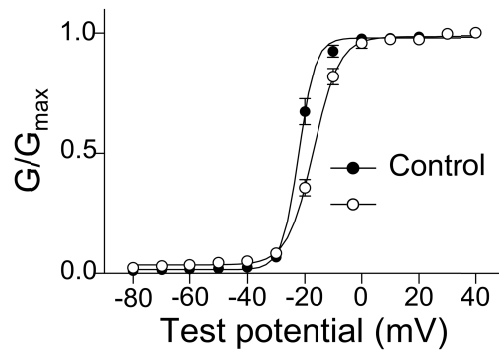


図 16. β_3 と共に発現した $Na_v1.3$ の活性化に対するアミトリプチリンの影響

(7) β_3 と共に発現させた $Na_v1.3$ の不活性化に対する4種の抗うつ薬の影響解析

さらに、 β_3 と共に発現した $Na_v1.3$ におけるチャンネルの不活性化に対する抗うつ薬の影響を調べた。その結果、全ての抗うつ薬は、inactivation curve の $V_{1/2}$ を過分極方向へシフトさせた ($2.5 \sim 25.2 \text{mV}$)。特に、網とリプチリンの影響が最も強く (25.2mV)、 β_3 サブユニットが、不活性化促進の効果がより強くこの結果から、不活性化促進に関して、 β_3 サブユニットがその効果を調節している可能性が示された。

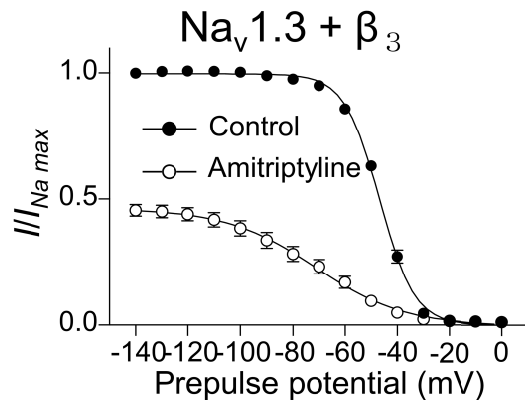


図 17. β_3 と共に発現した $Na_v1.3$ の不活性化に対するアミトリプチリンの影響

(8) アロプレグナノロン硫酸塩の $Na_v1.3$ に対する影響解析

アロプレグナノロンは、神経障害性疼痛モデルにおける鎮痛効果が示され、神経障害性疼痛の治療薬として期待が持たれるニューロステロイドであるが、我々はこれまでに、同ニューロステロイドの代謝物であるアロプレグナノロン硫酸塩 (APS) が、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 機能を抑制することを報告

してきた。そこで、Nav1.3 に対する影響についても解析を行った。また、 β_1 、 β_3 サブユニットと共に発現させた Nav1.3 に対する影響を解析し比較した。その結果、IC₅₀ 値は、Nav1.3+ β_1 、Nav1.3+ β_3 でそれぞれ 74.6 ± 4.8 、 $26.3 \pm 2.7 \mu\text{mol/L}$ であり、 β_3 と共に発現させた Nav1.3 に対する抑制効果の方が、有意に強い効果であることが示された。この結果より、APS の鎮痛効果の作用機序として Nav1.3 と β_3 サブユニットがターゲットになっている可能性があることと、また、これらの α 、 β サブユニットが、神経障害性疼痛の発現の重要な鍵になっていることを示唆している。

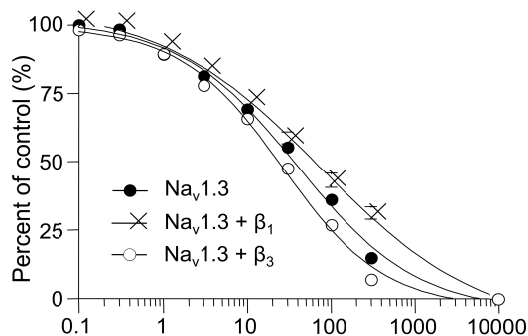


図 18. Nav1.3 に対する APS の影響— β_1 、 β_3 と共に発現させた Nav1.3 に対する影響の比較—

(9) Nav1.3 の活性化に対する APS の影響解析

APS による Nav1.3 抑制機序を解析するために、 β_3 と共に発現させた Nav1.3 におけるチャンネルの活性化に対する APS の影響を調べた。APS は、わずかであるが有意に activation curve の $V_{1/2}$ を脱分極方向へシフトさせた (1.2mV)。この結果から、チャンネルの活性化の抑制が、 β_3 と共に発現した Nav1.3 に対する APS の抑制効果のメカニズムの一つであることが示された。

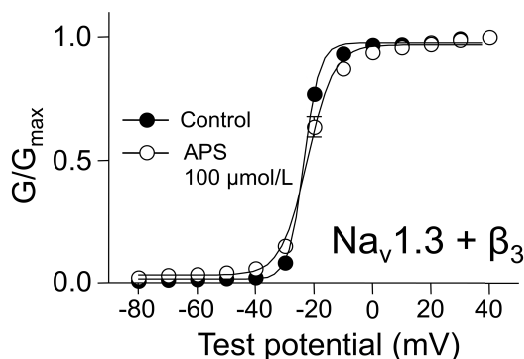


図 19. β_3 と共に発現した Nav1.3 の活性化に対する APS の影響

(10) Nav1.3 の不活性化に対する APS の影響解析

さらに、 β_3 と共に発現させた Nav1.3 の不活性化に対する APS の影響を調べた。 -140mV から 0mV まで 10mV おきに 200ms

のプレパルスを与え、その後、 $-10\text{mV} \sim +10\text{mV}$ まで 50ms 脱分極させ、脱分極性カレントに対する APS の影響を調べた。その結果、APS は inactivation curve の $V_{1/2}$ を過分極方向へ有意にシフトさせた (9.7mV)。この結果から、チャンネルの不活性化の促進が、 β_3 と共に発現した Nav1.3 に対する APS の抑制効果のメカニズムの一つであることが示された。

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1件)

著者名: 堀下貴文、佐多竹良
論文表題: Na⁺チャンネルについて、ここまでわかった! 構造・機能と疼痛への関連性
雑誌名: Lisa
査読: 有り
巻: 22
発行年: 2015 年
ページ: 548-554

[学会発表](計2件)

発表者名: 堀下貴文、大倉暖、南智子、丸岡司、菅友里、佐多竹良
発表表題: 電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニット、Nav1.3 に対するニューロステロイド、アロプレグナロン硫酸塩の影響
学会名: 日本麻酔科学会第 61 回学術集会
発表年月日: 2014 年 5 月 16 日
発表場所: パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

発表者名: 堀下貴文、貴志暢之、大倉暖、佐多竹良
発表表題: 電位依存性ナトリウムチャンネルサブユニット、Nav1.3 に対する抗うつ薬の影響
学会名: 日本麻酔科学会第 60 回学術集会
発表年月日: 2013 年 5 月 24 日
発表場所: ロイトン札幌 (北海道札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐多 竹良 (SATA Takeyoshi)
産業医科大学・大学病院・病院長
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・准教授
研究者番号: 40369070

(3) 連携研究者

大倉 暖 (OKURA Dan)
産業医科大学・医学部・助教
研究者番号: 00596710