

博士學位論文

論文要約

神経障害性疼痛の発症メカニズム解明と新規治療戦略構築に関する基礎・臨床研究：T型カルシウムチャンネルとアンギオテンシン系を治療標的とした検討

岩根 詩織

論文要約

神経障害性疼痛は、体性感覚系の損傷や病変によって誘発される疼痛と定義され、患者の quality of life (QOL) を著しく低下させるが、non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) や麻薬類などの一般的な鎮痛薬を用いた治療に抵抗性を示すことが多い。傷害を受ける神経の解剖学的な位置により末梢性と中枢性に分類され、前者には帯状疱疹後神経痛、糖尿病性末梢神経障害、化学療法誘発性神経障害、外傷性末梢神経損傷後疼痛、三叉神経痛などがあり、後者には脊髄損傷後神経痛、脳卒中後の視床痛などがある[1,2]。神経障害性疼痛の発生・調節メカニズムに関する研究は日々進歩しており、薬物療法の選択肢は増えているが、既存の治療薬がほとんど効かない症例や、副作用が強くて服用し続けることができないことも多いため、新たな作用機序を介して効果を示す新規鎮痛薬の開発が望まれている。

神経の興奮（活動電位）が軸索伝導を経て神経終末に到達すると、高電位活性化型の電位依存性カルシウムチャンネルが開口して細胞内カルシウム濃度が増加することで神経伝達物質がシナプス間隙に放出される[3]。一方、低電位活性化型の電位依存性カルシウムチャンネル（T-channel）は、活動電位のない状態での自発的な神経伝達物質の遊離や、神経の興奮性自体の調節に関与する[4,5]。高電位活性化型カルシウムチャンネルの $\alpha 2\delta$ 調節サブユニットに結合するプレガバリン、ミロガバリンなどのガバペンチノイドは、チャンネルの膜発現を減少させることで神経伝達物質遊離を抑制して痛みの情報伝達を抑制する作用があり、神経障害性疼痛治療薬として臨床応用されている[1]。T-channel は、調節サブユニットを有さず、イオンポアを形成する $\alpha 1$ サブユニットのみで構成されているのでガバペンチノイドの影響を受けない。T-channel の 3 つのサブタイプ $\text{Ca}_v3.1\sim 3.3$ のうち、痛みの情報伝達に最も深く関与するのは $\text{Ca}_v3.2$ チャンネルであり、ガバ

ペンチノイド抵抗性の神経障害性疼痛の治療標的分子として注目されている[4,5]。

生理条件下では、生体内の $Ca_v3.2$ はチャネル分子の細胞外ドメインに存在する 191 番目のヒスチジン残基に亜鉛が配位結合してチャネル活性が抑制された状態にあると考えられている。一方、チオール基を有する L-システインや H_2S などの硫化物は亜鉛との親和性が高く、 $Ca_v3.2$ に配位結合した亜鉛を除去してチャネル抑制を解除する[4,5]。そこで第 1 章では、ラットやマウスにおいて生体内の亜鉛濃度の低下や硫化物の増加が $Ca_v3.2$ のチャネル機能や痛みの感受性に及ぼす影響を検討した。亜鉛キレート剤 N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine (TPEN) をラットに髄腔内あるいは足底内投与すると $Ca_v3.2$ 依存性の機械的痛覚過敏を誘起した。TPEN 足底内投与による痛覚過敏は、dorsal root ganglion (DRG) における $Ca_v3.2$ の発現増加を伴っていた。亜鉛欠乏食を摂取させた全身性亜鉛欠乏マウス[Zn (-); zinc = 0.6 mg/kg]においても $Ca_v3.2$ 依存性のアロディニアが誘起された。このマウスでは亜鉛抑制を解除して痛みを促進する NaHS の効果は検出されなかったが、コントロール食[Zn (+); zinc = 48.9 mg/kg]を摂取させたマウスでは NaHS の足底内投与によりアロディニアがみとめられ、T-channel 阻害薬により完全に消失した。このことから一次知覚神経に発現する $Ca_v3.2$ のチャネル活性は亜鉛により抑制され、この亜鉛抑制を解除する NaHS によりチャネル活性が促進され痛みの感受性が上昇することが示唆された。

$Ca_v3.2$ の発現は、転写レベルで early growth response-1 (Egr-1) と repressor element-1 silencing transcription factor (REST) によってそれぞれ正負に制御されている[6]。また、細胞膜に発現した $Ca_v3.2$ はユビキチン化され、プロテアソーム分解を受けるが、知覚神経が傷害を受けて興奮性が高まると、脱ユビキチン化酵素である ubiquitin specific protease 5 (USP5) の発現誘導が起こることで、 $Ca_v3.2$ のプロ

テアソーム分解が抑制されて膜発現量が持続的に増加した状態になることが報告されている[7]。一方、坐骨神経の外科的損傷により誘発される神経障害性疼痛や抗がん薬投与後に認められる化学療法誘発性末梢神経障害 (chemotherapy-induced peripheral neuropathy: CIPN) に、マクロファージなどから遊離される核内タンパク high mobility group box 1 (HMGB1) が関与することも報告されている[8,9]。そこで第2章では、ラットの第5腰椎神経を外科的に切断することで誘発される神経障害性疼痛モデル (L5 spinal nerve cutting: L5SNC) における $Ca_v3.2$ の役割と挙動と調べ、それに関与する分子メカニズムを解析した。L5SNC処置後侵害受容閾値が低下し始める6日後と、閾値低下が最大となった後、安定的に持続していた14日後のDRGにおけるタンパク発現量を調べたところ、L4 DRG においては、L5SNC処置6日後に $Ca_v3.2$ とその転写を促進する Egr-1 の発現増加がみられ、14日後には $Ca_v3.2$ と Egr-1 に加え USP5 の発現量が増加していたが L5、L6 の DRG では L5SNC処置6、14日後ともに $Ca_v3.2$ の発現増加はみられなかった。一方、L5SNC処置3日後には L4DRG と坐骨神経においてマクロファージの集積がみられた。また、L5SNC処置9日後には、L4 DRG と坐骨神経において HMGB1 の発現量が増加していた。さらに、抗 HMGB1 中和抗体あるいは HMGB1 の標的分子の1つである receptor for advanced glycation end-product (RAGE) を阻害する low molecular weight heparin (LMWH) を反復投与したところ、L5SNCによる神経障害性疼痛が抑制され、L4DRGにおける Egr-1 と $Ca_v3.2$ の発現誘導も抑制された。これらのことから L5SNC処置後、一次知覚神経にマクロファージが集積し、マクロファージから遊離された HMGB1 が RAGE を活性化することで Egr-1 依存性の $Ca_v3.2$ 発現誘導を促進し、その後の $Ca_v3.2$ の膜発現の上昇を USP5 が維持することで、長期に亘る神経障害性疼痛が誘発される可能性が示唆された。

糖尿病性末梢神経障害 (DPN) には、糖毒性による内皮細胞傷害でおこる微小循環障害、ポリオール代謝亢進による神経細胞内のソルビトール蓄積、酸化ストレスなどが原因で生じる末梢神経系の病変とそれに続く過剰な神経興奮または機能低下が関与する[10,11]。興味深いことに、近年、中枢および末梢のアンギオテンシン系が痛みの調節に関与し、DPN を含む難治性疼痛の発症において何らかの役割を果たす可能性が示唆されている[12]。この可能性を検証するため、第 3 章では関西医科大学附属病院、近畿大学奈良病院、生長会府中病院の 3 病院で、高血圧を合併する 2 型糖尿病患者の診療情報を収集し、アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬 (ACEI) やアンギオテンシン受容体拮抗薬 (ARB; AT₁ 受容体遮断薬) を服用している患者とそれら以外の降圧薬(non-ACEI/non-ARB)を服用している患者の DPN 発症率を比較する後ろ向きコホート研究を実施し、得られた臨床知見を動物実験により検証した。臨床研究の結果、ACEI 服用群と ARB 服用群では、non-ACEI/non-ARB 降圧薬服用群に比べ DPN 発症率が有意に抑制または遅延していた。多変量解析では、DPN 発症を有意に抑制する独立因子として ACEI/ARB 服用と β 受容体遮断薬服用が検出され、逆に有意な増悪因子として年齢 ≥ 73 歳と CRP ≥ 0.23 mg/dL が検出された。基礎研究では、2 型糖尿病モデルであるレプチン欠損 *ob/ob* マウスを用いて ACEI のペリンドプリル、ARB のテルミサルタン、L 型カルシウムチャネル阻害薬のアムロジピンを 6 週齢から 6 週間連日反復腹腔内投与したところ、ペリンドプリルとテルミサルタンは、血糖上昇に影響することなく DPN 発症を有意に抑制したが、アムロジピンは無効であった。これらのことから、ACEI と ARB が 2 型糖尿病に伴う DPN 発症を抑制できることを、臨床および基礎研究により実証された。

以上、本研究により、亜鉛や硫化物による Ca_v3.2 の活性調節によって痛み感受性が変化すること、神経障害性疼痛の病態に Ca_v3.2 およびアンギオテンシ

ン系が大きく関与することが明らかとなった。また、ACEI、ARB を含む既存薬が DPN 予防に応用できることや、Ca_v3.2、HMGB1、RAGE、USP5 などに作用する薬が新規神経障害性疼痛治療薬として開発できることが強く示唆され、神経障害性疼痛に対する新たな予防・治療戦略構築に寄与する重要な基礎・臨床知見が得られた。

引用文献

1. Finnerup NB, Kuner R, Jensen TS: **Neuropathic Pain: From Mechanisms to Treatment.** *Physiol Rev* 2021, **101**:259-301.
2. Baron R, Binder A, Wasner G: **Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment.** *Lancet Neurol* 2010, **9**:807-819.
3. Patel R, Montagut-Bordas C, Dickenson AH: **Calcium channel modulation as a target in chronic pain control.** *Br J Pharmacol* 2018, **175**:2173-2184.
4. Sekiguchi F, Tsubota M, Kawabata A: **Involvement of Voltage-Gated Calcium Channels in Inflammation and Inflammatory Pain.** *Biol Pharm Bull* 2018, **41**:1127-1134.
5. Rangel-Galván M, Rangel-Galván V, Rangel-Huerta A: **T-type calcium channel modulation by hydrogen sulfide in neuropathic pain conditions.** *Front Pharmacol* 2023, **14**:1212800.
6. van Loo KM, Schaub C, Pernhorst K, Yaari Y, Beck H, Schoch S, Becker AJ: **Transcriptional regulation of T-type calcium channel CaV3.2: bi-directionality by early growth response 1 (Egr1) and repressor element 1 (RE-1) protein-silencing transcription factor (REST).** *J Biol Chem* 2012, **287**:15489-15501.
7. García-Caballero A, Gadotti VM, Stemkowski P, Weiss N, Souza IA, Hodgkinson V, Bladen C, Chen L, Hamid J, Pizzoccaro A, et al.: **The deubiquitinating enzyme USP5 modulates neuropathic and inflammatory pain by enhancing Cav3.2 channel activity.** *Neuron* 2014, **83**:1144-1158.
8. Nishida T, Tsubota M, Kawaishi Y, Yamanishi H, Kamitani N, Sekiguchi F, Ishikura H, Liu K, Nishibori M, Kawabata A: **Involvement of high mobility group box 1 in the development and maintenance of chemotherapy-induced peripheral neuropathy in rats.** *Toxicology* 2016, **365**:48-58.
9. Sekiguchi F, Domoto R, Nakashima K, Yamasoba D, Yamanishi H, Tsubota M, Wake H, Nishibori M, Kawabata A: **Paclitaxel-induced HMGB1 release from macrophages and its implication for peripheral neuropathy in mice: Evidence for a neuroimmune crosstalk.** *Neuropharmacology* 2018, **141**:201-213.
10. Yang K, Wang Y, Li YW, Chen YG, Xing N, Lin HB, Zhou P, Yu XP: **Progress in the treatment of diabetic peripheral neuropathy.** *Biomed Pharmacother* 2022, **148**:112717.
11. Elafros MA, Andersen H, Bennett DL, Savelieff MG, Viswanathan V, Callaghan BC, Feldman EL: **Towards prevention of diabetic peripheral neuropathy: clinical presentation, pathogenesis, and new treatments.** *Lancet Neurol* 2022, **21**:922-936.
12. Nemoto W, Yamagata R, Nakagawasai O, Tan-No K: **Angiotensin-Related Peptides and Their Role in Pain Regulation.** *Biology (Basel)* 2023, **12**.

研究業績一覧表

主要報文

| 報文題名 | 著者 | 発表誌 | 本論文との対比 |
|---|---|---|---------|
| Ca _v 3.2-dependent hyperalgesia/allodynia following intrathecal and intraplantar zinc chelator administration in rodents. | TOMITA*, S., SEKIGUCHI, F., NAOE, K., SHIKIMI, S., OHIGASHI, M., TSUBOTA, M., KAWABATA, A. | <i>Journal of Pharmacological Sciences</i> , 152 (2) 86-89 (2023). | 第 1 章 |
| Dietary zinc deficiency induces Ca _v 3.2-dependent nociceptive hypersensitivity in mice. | TOMITA*, S., SEKIGUCHI, F., TSUBOTA, M., KAWABATA, A. | <i>Biological and Pharmaceutical Bulletin</i> , 46 (9), 1343-1346 (2023). | 第 1 章 |
| Ca _v 3.2 overexpression in L4 dorsal root ganglion neurons after L5 spinal nerve cutting involves Egr-1, USP5 and HMGB1 in rats: An emerging signaling pathway for neuropathic pain. | TOMITA*, S., SEKIGUCHI, F. (co-First Author), KASANAMI, Y., NAOE, K., TSUBOTA, M., WAKE, H., NISHIBORI, M., KAWABATA, A. | <i>European Journal of Pharmacology</i> , 888, 173587 (2020). | 第 2 章 |
| Clinical and preclinical evidence that angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin receptor blockers prevent diabetic peripheral neuropathy. | IWANE, S., NEMOTO, W. (co-First Author), MIYAMOTO, T., HAYASHI, T., TANAKA, M., UCHITANI, K., MURANAKA, T., FUJITANI, M., KOIZUMI, Y., HIRATA, A., TSUBOTA, M., SEKIGUCHI, F., TAN-NO, K., KAWABATA, A. | <i>Scientific Reports</i> , 14, 1039 (2024). | 第 3 章 |

*旧姓