

論文内容の要旨

氏名	おおくぼ かず まさ 大久保 寿 政		
学位の種類	博士(薬学)		
学位記番号	薬第99号		
学位授与の日付	平成24年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第5条第1項該当		
学位論文題目	硫化水素／T型カルシウムチャネル系の疼痛情報伝達における役割と神経障害性疼痛の治療標的分子としての可能性に関する研究		
論文審査委員(主査)	教授	川 畑 篤 史	
	(副主査)	教授	杉 浦 麗 子
	(副主査)	教授	小 竹 武

硫化水素(H<sub>2</sub>S)は、特徴的な強い刺激臭を有する有毒な無色透明の気体で、自然界では火山地帯や温泉などで生じるほか、最近では人工的に発生させたH<sub>2</sub>Sガスによる自殺が相次いだことで話題となった。一方、H<sub>2</sub>Sは一酸化窒素、一酸化炭素に続く第三の生体内ガス状態情報伝達物質として近年注目されている。生体内では、H<sub>2</sub>SはL-cysteineからcystathionine-γ-lyase (CSE) やcystathionine-β-synthase (CBS)によって生成される他、cysteine aminotransferase (CAT) と3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) によるH<sub>2</sub>S産生経路も存在する。H<sub>2</sub>Sは、神経細胞傷害・保護、神経突起伸長、心筋保護、平滑筋収縮・弛緩、炎症促進・抑制、疼痛情報伝達など様々な生体内現象に関与することが報告されている。H<sub>2</sub>Sの標的分子は多様で、ATP感受性カリウムチャネル、T型カルシウムチャネル、TRPA1チャネルなどのイオンチャネルがH<sub>2</sub>Sにより活性化されることが知られている。川畑らのグループはH<sub>2</sub>SがT型カルシウムチャネルを活性化させることで体性痛および内臓痛を誘起あるいは促進することを報告している。また、T型カルシウムチャネルには3つのアイソフォーム、Ca<sub>v</sub>3.1、Ca<sub>v</sub>3.2およびCa<sub>v</sub>3.3が存在するが、このうち知覚神経に豊富に発現するCa<sub>v</sub>3.2がH<sub>2</sub>Sの標的分子として機能し、末梢組織における痛みの情報伝達制御において重要な役割を果たすことも証明している。

糖尿病性末梢神経障害、ヘルペス後神経痛、三叉神経痛などの神経障害性疼痛は難治性の慢性疼痛で、何らかの要因によって神経が障害されることによって二次的に生じる痛みのことをいう。神経障害性疼痛は、非ステロイド性抗炎症薬やオピオイド系鎮痛薬に対して抵抗性を示すことが多く、現在は抗うつ薬や抗けいれん薬などによる治療が行われているが十分な有効性は得られていない。最近、プレガバリンが神経障害性疼痛治療薬として上市され話題になったが、浮動性めまい、傾眠、浮腫などの副作用があり、より有効で副作用の少ない治療薬の開発が望まれている。川畑らのグループは、第5腰神経切断(L5SNX)により誘起される神経障害性疼痛ラットにおいて、H<sub>2</sub>Sの産生を抑制するCSE阻害薬やT型カルシウムチャネル阻害薬が有効であること、また、このラットでは知覚神経におけるCa<sub>v</sub>3.2の発現誘導が起こっており、これをRNA干渉法によりノックダウンすることで神経障害性疼痛が抑制されることを報告し、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分子になりうることを示唆している。

神経障害性疼痛の1つにがん化学療法の副作用によって生じるものがある。この神経障害性疼痛は幅広い種類の抗がん剤で高頻度に生じ、患者は癌性の疼痛に加えて二重の苦しみを味わうことになり、臨床で大いなる問題となっている。抗がん剤による神経障害性疼痛に関する実験動物を用いた研究も盛んに行われているが、2004年、FlattersとBennettは、T型カルシウムチャネル阻害薬であるエトスクシמידが抗がん薬により誘起される神経障害性疼痛に対して有効であることを報告している。そこで、本研究においては、抗がん薬であるパクリタキセルをラットに反復投与することにより神経障害性疼痛モデルを作製し、H<sub>2</sub>S/Ca<sub>v</sub>3.2系の病態への関与と治療標的分子としての可能性を検討した。次に、アスコルビン酸がT型カルシウムチャネルのうちCa<sub>v</sub>3.2を選択的に阻害するとの報告に着目し、皮膚透過性アスコルビン酸前駆体の軟膏剤を作製して神経障害性疼痛に対する治療効果を調べた。さらに、H<sub>2</sub>SがCa<sub>v</sub>3.2以外にTRPA1を活性化すると知見に基づき、マウスにおいて認められるH<sub>2</sub>S誘起痛覚過敏にCa<sub>v</sub>3.2に加えてTRPA1が関与するか否かを検討した。

第1章では、がん化学療法の副作用によって生じる神経障害性疼痛にH<sub>2</sub>Sおよびその標的分子であるT型カルシウムチャネルが関与するか否かを検討した。はじめに、T型カルシウムチャネルの新規選択的阻害薬NNC 55-0396と従来から汎用されている同阻害薬mibefradilのCa<sub>v</sub>3.2に対する阻害効力を、Ca<sub>v</sub>3.2を導入したHEK293細胞においてパッチクランプ法により比較検討したところ、NNC 55-0396は、mibefradilと同等以上の効力でCa<sub>v</sub>3.2を介する膜電流を濃度依存かつ可逆的に抑制することが明らかとなった。次に、ラットにおいて、抗がん薬であるパクリタキセルを2日に1回の割合で計4回、反復腹腔内投与することにより投与開始2週間後でプラトーに達する痛覚過敏が認められることを確認した。この痛覚過敏はmibefradilおよびNNC 55-0396の足底内投与により消失し、さらに、アンチセンス法による知覚神経Ca<sub>v</sub>3.2のノックダウンによっても抑制された。また、CSE阻害薬であるDL-propargylglycine (PPG) あるいはβ-cyanoalanine (BCA) の腹腔内投与によってもパクリタキセル誘起痛覚過敏が抑制された。次に、第4～6腰神経の後根神経節(DRG)と脊髄、および後肢足底組織中のCSEおよびCa<sub>v</sub>3.2のタンパク発現量を調べたところ、パクリタキセル処置による有意な変化は認められず、DRGにおけるCa<sub>v</sub>3.2の劇的な発現誘導が見られた第5腰神経切断ラットでの報告とは異なる結果が得られた。一方、足底組織中のH<sub>2</sub>S含量はパクリタキセル処置によって約40%上昇していた。これらの知見より、パクリタキセル誘起神経障害性疼痛モデルでは、末梢組織中においてCSEによって内因性に生成されるH<sub>2</sub>Sが増加し、これによってCa<sub>v</sub>3.2 T型カルシウムチャネルの活性が高まることで痛覚過敏が起こっている可能性が示唆された。

第2章では、皮膚透過性両親媒性アスコルビン酸前駆体の軟膏剤を神経障害性疼痛の治療に応用できるかを検討した。前述のように、 $H_2S$ の標的分子である $Ca_v3.2$ を選択的に阻害するアスコルビン酸を皮膚局所に適用することで神経障害性疼痛をコントロールできれば臨床的に有用であるが、アスコルビン酸は皮膚透過性が極めて低く、また生体内では不安定である。そこで、アスコルビン酸に疎水性基を付加し皮膚透過性、安定性を高めた両親媒性アスコルビン酸前駆体、disodium isostearyl 2-O-L-ascorbyl phosphate (DI-VCP)の軟膏剤を用いて治療効果を検討した。始めに、ラットにおいて $H_2S$ ドナーであるNaHSの足底皮下への投与により誘起される痛覚過敏がアスコルビン酸の同時投与により抑制されることを確認した。次に、アスコルビン酸あるいはDI-VCPの軟膏剤を後肢に塗布したところ、NaHS誘起痛覚過敏はDI-VCP軟膏により抑制されたが、アスコルビン酸軟膏は無効であった。また、DI-VCP軟膏塗布90分後、足底組織中のアスコルビン酸濃度は有意に増加したが、アスコルビン酸軟膏の塗布ではアスコルビン酸濃度に変化は認められなかった。パクリタキセルあるいはL5SN1Cにより誘起される神経障害性疼痛モデルラットを用いて検討を行ったところ、アスコルビン酸あるいはDI-VCPの足底内皮下投与は両モデルにおける痛覚過敏を抑制したが、DI-VCPの効果はアスコルビン酸と比較してより持続的であった。次に、両神経障害性疼痛モデルにアスコルビン酸あるいはDI-VCPの軟膏を塗布したところ、DI-VCP軟膏は持続的に痛覚過敏を強く抑制したが、アスコルビン酸軟膏は無効であった。2つのモデルにおけるDI-VCPの足底内皮下投与あるいは軟膏塗布による痛覚過敏抑制効果と比較すると、パクリタキセル処置ラットではL5SN1Cラットと比較してより速効性であった。最後に、神経障害性疼痛モデルラットの足底組織中のアスコルビン酸含量を測定したところ、L5SN1Cラットでは変化は無かったが、パクリタキセル処置ラットではコントロールラットに比べて足底組織中アスコルビン酸含量が有意に低下していた。これらの知見から、DI-VCPの軟膏剤は、神経障害性疼痛の治療に応用できる可能性が強く示唆された。また、がん化学療法に伴う神経障害性疼痛の病態に、 $Ca_v3.2$ 阻害活性を有する内因性アスコルビン酸の含量低下が関与する可能性も考えられる。

第3章では、NaHS誘起痛覚過敏の分子メカニズムをさらに解析するため、マウスにおいて $Ca_v3.2$ に加えてTRPA1チャンネルが $H_2S$ の標的分子として関与するかどうかを用いて検討した。マウスの後肢足底内にNaHSを投与することにより、ラットの場合と同様に、機械的痛覚過敏およびアロディニアが認められたが、これらはいずれもT型カルシウムチャンネル阻害薬あるいはTRPA1チャンネル阻害薬により阻止された。また、T型カルシウムチャンネルのうち $Ca_v3.2$ を選択的に阻害することが知られるアスコルビン酸や $ZnCl_2$ もNaHSの効果抑制した。最後に、アンチセンス法によって知覚神経に発現する $Ca_v3.2$ あるいはTRPA1をノックダウンしたところ、いずれによってもNaHS誘起痛覚過敏は抑制された。これらの知見から、マウスにおける $H_2S$ 誘起痛覚過敏およびアロディニアの発現には $Ca_v3.2$ に加えTRPA1の活性化が必要であることが示唆された。

今回の研究により、がん化学療法に伴って生じる神経障害性疼痛に、GSE/ $H_2S$ / $Ca_v3.2$ 系の活性化が関与することが明らかとなり、その病態に末梢組織中の内因性 $H_2S$ 濃度の増加と $Ca_v3.2$ 阻害活性をもつアスコルビン酸濃度の低下が関係している可能性が示唆された。また、皮膚透過性両親媒性アスコルビン酸前駆体であるDI-VCPの軟膏剤はがん化学療法やそれ以外の原因によって誘起される神経障害性疼痛の治療薬として応用できる可能性が強く示唆された。さらに、 $H_2S$ による機械的痛覚過敏・アロディニアに $Ca_v3.2$ に加えてTRPA1が関与することが明らかとなり、今後、 $H_2S$ /TRPA1系が神経障害性疼痛や内臓痛の病態にどのように関与するかを検討していく必要性が示唆された。本研究により、末梢組織中のGSE由来 $H_2S$ が $Ca_v3.2$ T型カルシウムチャンネルやTRPA1チャンネルを介して疼痛情報伝達において重要な役割を果たすことが明らかとなり、これらの分子を標的とした各種難治性疼痛の治療薬開発のための新たな方向性を示すことができた。

大久保寿政君の博士学位論文「硫化水素/T型カルシウムチャンネル系の疼痛情報伝達制御における役割と神経障害性疼痛の治療標的分子としての可能性に関する研究」は、第三のガス状態情報伝達物質であることが最近明らかとなった硫化水素が痛みの情報伝達にどのように関与するかを解析し、臨床において特に問題となっている神経障害性疼痛の病態への関与と治療標的分子としての可能性について検討を行った成果をまとめたものである。

第一章では、がん化学療法のもっとも重大な副作用の一つである神経障害性疼痛の病態に、硫化水素とその標的分子の一つである $Ca_v3.2$ T型カルシウムチャンネルが関与する可能性を検討している。まず、はじめに予備実験において、新規T型カルシウムチャンネル阻害薬として開発されたNNC 55-0396の有効性を培養細胞を用いたパッチクランプにより検討し、NNC 55-0396が3つのT型カルシウムチャンネルのサブタイプのうち硫化水素の標的分子である $Ca_v3.2$ を実際に阻害することができることを初めて証明した。続いて、抗がん薬の一つであるパクリタキセルをラットに反復投与することで、がん化学療法に伴う神経障害性疼痛モデルを作製し、このモデルにおいてNNC 55-0396が有効であることを明らかにした。さらに、一次知覚神経に発現する $Ca_v3.2$ をアンチセンス法によりノックダウンすることで、パクリタキセル誘起神経障害性疼痛を抑制することも証明している。また、硫化水素の合成酵素の一つであるシスタチオンin-アーゼ(GSE)の阻害薬によっても神経障害性疼痛を抑制することができることを明らかにした。最後に、パクリタキセル誘起神経障害性疼痛ラットでは、末梢組織中の硫化水素濃度が上昇しているとの知見を得ている。このように、本章における研究成果は、がん化学療法に伴う神経障害性疼痛の病態に硫化水素/ $Ca_v3.2$ T型カルシウムチャンネル系が大きく関与することを明らかにし、 $Ca_v3.2$ やGSEに対する特異的な阻害薬が、神経障害性疼痛治療薬として臨床的にも応用可能であることを示唆した。

第二章では、第一章で得られた知見に基づいて、 $Ca_v3.2$ を標的とした神経障害性疼痛治療薬の開発に取組んでいる。ビタミンCが $Ca_v3.2$ をサブタイプ選択的に阻害するとの最近の知見に基づき、ビタミンCおよびその関連化合物の局所適用による治療効果が検討された。その結果、ビタミンCを足底皮下へ投与することにより硫化水素によって誘起される痛覚過敏とパクリタキセルあるいは第5腰神経外科的切断により誘起される神経障害性疼痛を抑制することが可能であることが判明した。しかし、ビタミンCは皮膚透過性が悪いので、そのまま軟膏剤として使用しても十分な効果は得られない。そこで、ビタミンCの皮膚透過性誘導体DI-VCPの軟膏剤を後肢に塗布し、神経障害性疼痛に対する治療効果を検討し、有効性を確認することに成功している。さらに、パクリタキセル誘起神経障害性疼痛のラットでは足底組織中のビタミンC濃度が低下しているとの興味深い知見も得られている。

第三章では、硫化水素による痛覚過敏がマウスにおいても認められることを確認した上、 $Ca_v3.2$ T型カルシウムチャンネルの関与の有無を調べ、さらに、最近、硫化水素の新たな標的分子である可能性が報告されたTRPA1チャンネルの関与を検討している。その結果、マウスにおける硫化水素誘起機械的痛覚過敏の発症には、 $Ca_v3.2$ とTRPA1の両方のチャンネルが活性化されることが必要であるとの結論を得ている。

以上、本学位論文は、神経障害性疼痛の病態を解明するための新たな示唆を与える重要な知見を含み、さらに実際の臨床における神経障害性疼痛の治療薬開発に直結する具体案をも提示している。これらを総合的に評価し、本学位論文の学問的価値は極めて高く、さらに将来の医療の発展に大きく貢献する内容を含んでいるものと認めた。