

機関番号：15401
 研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20602002
 研究課題名 (和文) 神経因性疼痛発症トリガー因子としての“Nav1.9 燃え上がり現象”の基礎的解析
 研究課題名 (英文) Regulation of the Spontaneous Augmentation of Nav1.9 in Mouse Dorsal Root Ganglion Neurons.
 研究代表者
 緒方 宣邦 (OGATA NOBUKUNI)
 広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授
 研究者番号：80091255

研究成果の概要 (和文)：

小型 DRG ニューロンに特異的に発現している Nav1.9 電流のピーク値が経時的に数倍以上に増大し、その後に減少する現象 (キンドリング) の調節メカニズムの詳細は不明である。そこで本研究では、キンドリングに対する細胞内環境変化の影響について検討した。キンドリングは、細胞内 ATP (3 mM) 存在下においてほぼ完全に抑制されることが見出された。一方、GTP (500 μM) および PMA (100 nM) 存在下ではキンドリングの抑制は認められなかった。この事より、細胞内 ATP が枯渇するような神経障害時には Nav1.9 電流が増大し、神経細胞の興奮性に対して促進的に作用することが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

The mechanism underlying the spontaneous augmentation of Nav1.9 is still unclear. We examined the effects of protein kinases A and C (PKA and PKC), on the spontaneous augmentation of Nav1.9. The spontaneous augmentation of the Nav1.9 current was significantly suppressed by activation of PKA, whereas activation of PKC did not affect the voltage dependence of inactivation for the Nav1.9 current. These results indicate that the spontaneous augmentation of Nav1.9 was regulated directly by PKA, and indirectly by PKC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：神経生理学

科研費の分科・細目：疼痛学

キーワード：ナトリウムチャンネル、疼痛、パッチクランプ

1. 研究開始当初の背景
 末梢感覚ニューロンに特異的に存在するテ

トロドトキシン非感受性 Na チャネルには、
 Nav1.8 と Nav1.9 の二つのタイプが存在す

る。NaV1.8 に関しては、これまでの多くの研究により、その機能的役割は比較的解明されている。しかし、新規に同定された NaV1.9 の機能については、申請者もその開発グループに加わった NaV1.8 ノックアウトマウス（文献：Nature Neuroscience, 2, 541-548）においてのみ、解析が可能であるため、その研究はあまり伸展していない。

最近、申請者らは、細胞内 ATP 濃度の減少により NaV1.9 の機能的発現が、著しく増大し、後根神経節ニューロンが過剰興奮を来すことを報告した。すなわち Nav1.9 は、機能的には“ATP-感受性 Na チャンネル”であり、細胞内 ATP 濃度の減少は、さまざまな細胞傷害に伴う病態と関連付けられ、この NaV1.9 燃え上がり (Kindling) 現象が、神経因性疼痛のトリガーとなりうるものが強く示唆される。このような点から、NaV1.9 燃え上がり現象の発現メカニズムを調べることで、神経因性疼痛発症機構の解明が進展することが期待される。

痛みの研究で最近脚光を浴びているのは、痛みの受容体や Na チャンネルなどの膜蛋白に関する新発見である。特に神経因性疼痛の場合には、痛みの受容体自体はその発生機序にあまり関係がなく、Na チャンネルの変化が最も重要であることを考慮に入れると、申請者らの研究対象である NaV1.9 に関する研究要報告が重度が高い。申請者らの研究の大きな特徴は、分子生物学的研究から機能の最終的解析に不可欠である個体レベルの研究まで包括的に含んでいる点であるが、さらに、重要な点は、細胞内 ATP 濃度の低下が、疼痛発現のトリガーとなり得る点を示していることである。細胞外 ATP の疼痛発現における関与は、我が国の研究者により実証されておう、細胞傷害に伴う ATP の漏出は細胞内外において疼痛増強作用を発揮している可能性が考えられる。さらに本申請は、“ATP-感受性 Na チャンネル”をターゲットにした世界で初めての研究であり、疼痛学のみならず、イオンチャンネルの生理・薬理学の立場からも、成果が期待されるものであり、その研究が急がれる。

2. 研究の目的

種々の侵害刺激情報は主に無髄C線維によって伝搬され、C線維は組織の炎症や神経の損傷などに起因する慢性疼痛に深く関与している。私達はC線維を発する小型の一次知覚ニューロンにのみ特異的に存在するテトロドトキシン非感受性ナトリウム (Na) チャンネルと疼痛発現の関連について、長年、検討している。

最近の私たちの研究により、テトロドトキシン非感受性 Na チャンネルのひとつである NaV1.9 (New atypical-Na channel の頭文字

をとり、NaNともよばれる) について、これが「神経因性疼痛を始めとする慢性疼痛の発現に重要な役割を担っている」との基礎的実験データを得ている。私達の研究の目的は、痛覚情報処理機構におけるテトロドトキシン非感受性ナトリウム Na チャンネルの機能解析を行い、さらには神経因性疼痛の機序の解明を目指すことである。

神経因性疼痛の発症メカニズムは未だ解明されていないが、私たちが現在、研究を重ねている NaV1.9 はまさにこのような疼痛において重要な役割を担っていると考えられるイオンチャンネルである。NaV1.8 遺伝子を欠損したマウスを利用することにより、従来のアプローチでは不可能であったさまざまな独創的解析手段が可能である。すなわちこの変異マウスを用いることにより、痛覚情報処理機構における NaV1.9 の機能および各種疼痛発現のメカニズムを分子レベルで解明することが可能となり、さらには従来の鎮痛薬とはまったく作用機序の異なる画期的な薬剤の開発なども期待できる。当面の具体的な目標としては、細胞内 ATP 濃度の低下によって引き起こされる NaV1.9 燃え上がり現象がどのようなメカニズムによるのかを解明することが、当面の最も大きな課題である。そこで、本申請の期間内には、この点を先ず明らかにしたい。パッチクランプ法、単一細胞 RT-PCR 法、免疫組織学的手法などを用いて、NaV1.9 電流の構造と機能をさらに明らかにし、NaV1.9 燃え上がり現象は細胞内情報伝達機構を介した現象であるのか、あるいは、NaV1.9 自体の性質に起因するものなのかを決定する。本申請によって、アロディニアや疼痛過敏などの病的疼痛発現機序の基礎的研究が進展することが予想され、さらにはカウザルギーや反射性交感神経ジストロフィーなどの難治性疾患の病因解明にも貢献することが期待できる。

3. 研究の方法

1. Nav1.8 ノックアウトマウスの後根神経節におけるイオンチャンネル機能の解析

1) パッチクランプ法によるイオンチャンネル機能の解析

Nav1.8 ノックアウトマウスより後根神経節を摘出し、酵素処理により、神経細胞を単離培養する。パッチクランプ法を用いてイオンチャンネル機能の変化を調べる。

2) 変異 Nav1.9 を用いた機能発現実験

Nav1.9 の一部にさまざまな改変を加え、それを哺乳類の神経細胞で発現させ、機能の変化を観察し、遺伝子構造を解析する。変異 Nav1.9 を用いた機能発現実験のために、既の上頸神経節の培養神経細胞を利用した実験

モデルを確立している。上頸神経節は交感神経節のひとつで、知覚神経節と発生学的にいずれも神経堤 (Neural crest) より発達したものであるが、交感神経節のほうには Nav1.9 が発現していないため、いろいろな実験上のメリットがある。

3) Single cell RT-PCR 法 (次頁挿入図参照) を用いた新規 Na 電流の遺伝子検索
パッチクランプ法により、電流の記録を行い、発現電流を調べた後、パッチ電極を吸引し、細胞質を採取する。細胞質に含まれる mRNA から逆転写反応により cDNA をつくり、Nested PCR を用いて、発現遺伝子を検出する。本方法は、多様性に富む後根神経節ニューロンの分離同定に不可欠である。既に 9 種の異なる Na チャネル mRNA の検出に成功している。

2. 疼痛モデルを用いた Nav1.9 ノックアウトマウスにおける痛覚感受性の解析

1) 急性疼痛モデル

熱刺激を用いたホットプレート法やテールフリック法、機械的刺激を用いるテール・ピンチ法などにより主に A δ 求心線維の疼痛閾値の検定を行う。

2) 組織傷害後の炎症モデル

カンタリジン、カラジナン、フロイントアジュバントやホルマリンなどの起炎性物質を用いた炎症モデルを用いた炎症性疼痛感受性のテストを行う。

3) マウス疼痛モデル動物を用いた痛覚感受性 (痛覚閾値) の検定

座骨神経結紮モデル (ベネットモデル) をマウスにおいて作製し、この疼痛モデルを用いて、Nav1.8 ノックアウトマウスにおける痛覚過敏の発生機構を検討する。

3. 痛覚特異的ナトリウムチャネルの組織化学的検討

免疫組織化学的に、痛覚特異的ナトリウムチャネルの後根神経節および末梢軸索内における新規持続性 Na チャネル蛋白の発現の局在を調べることにより、その機能的役割を検討する。

初年度にスタートした実験は、全て次年度以降も引き続いておこない、研究全体を予定年度内に完成させる。最終年度においては、補足データの追加と研究のまとめを主体とした。本研究には、薬学博士の学位と十分な技術をもつ技術員である柿村順一技官、および、既に各種技術を習得済みの 4 名の博士課程大学院生も参加している。

4. 研究成果

Nav1.9 の生理学的、薬理的性質を明らかにした。すなわち、細胞内 ATP が枯渇するような神経障害時には Nav1.9 電流が増大し、神経細胞の興奮性に対して促進的に作用することが示された。また、PKC の活性化により Nav1.9 の開口確率が減少し、神経細胞の興奮性に対して抑制的に作用することが示された。このように Nav1.9 電流は細胞内環境の変動に強く影響を受け、病的な痛覚の伝達は、このような調節機構のバランスの破綻により、なされているという考えが導き出された。

Nav1.9 電流のキンドリングは、細胞内環境が保たれた状態で記録することができるナスタチン法では観察されないことから、何らかの細胞内因子により調節を受けることが示唆される。私達は細胞内 ATP の減少がキンドリングを誘発する要因である事を既に報告している。しかし、ATP 以外の調節因子の関与は未だ明らかではない。そこで本研究では Nav1.9 電流に対する GTP および PKC 活性化薬 PMA の効果を検討した。

GTP (500 μ M) を細胞内添加した群では、対照群と比較して、キンドリングの発生率およびピーク電流値の増大率に有意な差は認められなかった。PMA (100 nM) を添加した群では、発生率には影響が認められなかったが、増大率には有意な低下が認められた。PMA 添加群において、保持電位 -80mV ではピーク電流値が経時的に減少するが、-120mV では維持される現象がみられ、不活性化曲線の過分極側への移行が確認された。このことより、PMA による増大率の低下は、チャネルの不活性化が原因であると考えられ、ATP によるキンドリングに対する直接的抑制作用とは異なるものである。

以上の事より、G タンパク質系や PKC 系が Nav1.9 のキンドリングに直接的に関与している可能性は低いと考えられたが、PKC 系はキンドリングと無関係に、Nav1.9 の不活性化を促進することが確認された。現時点においては、キンドリングを誘発する直接的な要因の一つとして、細胞内 ATP の減少が挙げられる。神経障害時に細胞内 ATP が枯渇することにより Nav1.9 電流が増大し、神経細胞の興奮性に対して促進的に作用する可能性が考えられる。

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)

1. Nobukuni Ogata, Regulation of the Nav1.9 kindling in mouse dorsal root ganglion neurons: effect of PKA and PKC pathways. Marine Drugs. 査読有 8, 2010, 728-740.

〔学会発表〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

緒方 宣邦 (OGATA NOBUKUNI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・名誉教授

研究者番号：80091255

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：