

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K18093

研究課題名(和文)慢性疼痛における神経成長因子シグナリングの解明と新規治療薬の開発

研究課題名(英文) Identification of pain-specific nerve growth factor signaling and development of mechanism-based novel therapeutics for chronic pain

研究代表者

加藤 純悟 (KATO, Jungo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：40465018

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、重大な社会問題である慢性疼痛に対し、神経成長因子(NGF)に着目して新規鎮痛標的の同定を試みた。このNGF変異によって起こる、骨関節の痛覚が特異的に欠如する先天性無痛無汗症V型という疾患に着目し、この疾患のモデルマウスを確立し解析を進めたところ、骨関節の炎症時際に特異的な痛みの欠如が見られた。一方、このNGF変異マウスの唾液腺を調べたところ、NGFは正常に分泌され、組織解析でも神経系の発達も正常であった。さらにこのNGF変異マウスでは炎症時の骨破壊が著しく軽減されることがから、このNGF変異が引き起こすシグナリングの変化は骨保護作用のある有力な新規鎮痛標的になりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

慢性疼痛は様々な病因で発症し、実に25%にあたる多くの国民に苦痛、QOLの著しい低下をもたらし、社会生活活動の低下から大きな社会問題を招いている。従来の治療では満足が得られないことが多く、発症機序のさらなる理解とそれに基づく新規治療法の確立が喫緊の課題である。NGFは古くから鎮痛標的として注目を集めてきたが、副作用の問題から臨床応用へは至っておらず、より痛みに特異的なシグナリングの同定が求められてきた。本研究のNGF変異マウスでのシグナリングは骨保護作用を有する鎮痛効果が期待でき、創薬への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Chronic pain remains a huge socio-economical problem affecting millions of citizens. We have focused on nerve growth factor (NGF) signaling to identify novel therapeutic targets against chronic pain. In this project, we established a transgenic mouse line that modeled hereditary sensory and autonomic neuropathy type V (HSAN V), in which the NGF mutation results in bone/joint-specific painless phenotype. We observed painless phenotype in the NGF-mutated mice specifically when inflammation takes place in their joints. On the other hand, we found that the maturation and secretion of NGF in salivary gland were normal. The immunohistochemical analysis revealed that the development of pain-related nerve system remained normal in the NGF-mutated mice. Moreover, the bone erosion caused by joint inflammation was significantly attenuated in the NGF-mutated mice. Taken together, the altered NGF signaling taking place in the NGF-mutated mice can be a novel analgesic target for chronic pain.

研究分野：麻酔学

キーワード：慢性痛 神経成長因子 関節炎 先天性無痛無汗症

## 1. 研究開始当初の背景

慢性疼痛は様々な病因で発症し、実に25%にあたる多くの国民に苦痛、QOLの著しい低下をもたらす、社会生活活動の低下から大きな社会問題を招いている。従来の治療では満足が得られないことが多く、発症機序のさらなる理解とそれに基づく新規治療法の確立が喫緊の課題である。近年、神経成長因子(nerve growth factor: NGF)が新たな治療標的として注目を集めており、最近行われた抗NGF抗体による種々の慢性疼痛に対する国際的な臨床試験には大きな期待が寄せられた。しかしながら、有効な治療効果が示された一方で、感覚障害や急速な骨破壊などの無視できない副作用も報告され、再検討が必要な状況である<sup>1)</sup>。従って、痛覚により特異的なNGFシグナリングを特定し、より安全かつ効果的な治療標的を同定することが期待されている。これに対し我々は、NGF変異によって起こる、骨・関節の痛覚が特異的に欠如する先天性無痛無汗症V型(HSAN-V)というユニークな疾患に着目した。この疾患のモデルマウス(R100E NGF変異マウス)を確立し、痛みに特異的なNGFシグナリングの同定が可能であると考え、本研究の着想に至った。R100E NGF変異は、過去のin vitro研究で二つ知られているNGFの受容体のうち、TrkAとの結合は正常で、p75との結合が障害を受けることが報告されている。R100E NGF変異マウスでの痛みに関する表現系を調べることで、多様なNGFの生理作用の中で、痛みに特化したNGFシグナリングを特定し、副作用の少ない新規鎮痛標的の同定につながると考えた。

## 2. 研究の目的

### (1) R100E NGF マウスでの表現系解析と無痛の機序の解明

R100E NGF マウスを種々の痛み行動解析により野生株と比較することで、R100E NGF マウスの痛みに関する表現系を明らかにする。組織レベルでは、NGF依存性とされる痛覚神経系の発達および炎症時の関節周囲の痛覚神経発芽の度合いを免疫染色によりR100E NGF マウスと野生マウスで比較検討する。また、分子レベルではR100E NGF マウスでの骨関節炎症時のNGFシグナリングの異常を生化学的、免疫組織学的に評価する。

### (2) NGF-p75 シグナリングを標的とした鎮痛効果および骨保護作用の評価

抗NGF抗体を用いた臨床試験では骨破壊という副作用の可能性が問題視された<sup>1)</sup>。このことは、多様な生理的作用を持つNGFを単純に中和することの弊害を示唆する。そこで、本研究ではR100E NGF変異マウスを用いて、NGF-p75シグナリングの骨関節炎症時の骨破壊への関与を調べる。また、同様のモデルを用いてp75阻害薬の骨破壊に対する効果を調べることで、p75を介したシグナリングの役割を特定する。

(3) NGF-p75シグナリング標的鎮痛のさらなる応用の探索：骨関節術後痛モデルへの応用  
慢性痛への移行が問題となる病態の一つが骨関節手術をはじめとした手術後痛である。そこでR100E NGF変異マウスおよびp75阻害薬を用いて骨関節術後痛の前臨床動物モデルに応用することで、術後痛におけるNGFシグナリングの関与を明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) R100E NGF マウスでの表現系解析と無痛の機序の解明

R100E NGF マウスの痛みに関する表現系解析として、健常時の触覚をvon Frey試験、冷覚をアセトン試験、温覚をHargreaves試験にて調べ、野生株マウスと比較する。また、病的疼痛をもたらす障害を加えた際の反応性を調べるため、R100E NGF マウスの足背にホルマリンを注入し、痛み様行動の頻度を野生株と比較する。さらに、足関節にcomplete Freund's adjuvantを投与する足関節炎症モデルにおける痛み様反応をdynamic weight bearingシステムを用いて評価する。これらにより、どの種類の痛み刺激に対してR100E NGF マウスが無痛状態を呈するのかを調べ、無痛機序の推測を行う。R100E NGF マウスにおいて、NGFの成熟、分泌に異常がないかを調べるため、唾液腺を抽出し、ウェスタンブロットにてNGFの発現パターンを解析する。また、末梢組織の免疫染色を行い、疼痛神経系の発達・発芽を調べ無

痛状態との関連性を調べる。

### (2) NGF-p75 シグナリングを標的とした鎮痛効果および骨保護作用の評価

炎症性骨関節疾患における骨破壊における NGF-p75 シグナリングの関与を調べるため、R100E NGF マウスに complete Freund's adjuvant の膝関節内投与による骨関節の炎症を加えた際の骨破壊の程度をマイクロ CT で評価し、NGF 変異シグナリングの骨保護作用を検討する。また、R100E 変異によって影響が出ると予想される NGF 受容体の一つである p75 に対する阻害薬の鎮痛効果を CFA 関節炎マウスモデルで Dynamic weight bearing を用いて評価する。また、マイクロ CT にて p75 阻害薬の炎症性骨破壊に対する保護作用を検討する。

### (3) NGF-p75 シグナリング標的鎮痛のさらなる応用の探索：骨関節術後痛モデルへの応用

骨関節術後痛での NGF-p75 シグナリングの関与を調べるため、R100E NGF 変異マウスに対して脛骨骨折/ピンニングモデルを施行し、痛みの評価を dynamic weight bearing システムを用いて評価し、骨破壊・再生の程度をマイクロ CT で評価し、野生株と比較する。同様に、脛骨骨折/ピンニングモデルにて、p75 阻害薬の痛みおよび骨破壊・再生に対する効果を評価する。

## 4. 研究成果

### (1) R100E NGF マウスでの表現系解析と無痛の機序の解明

健常時における R100E NGF 変異マウスの触覚・温冷覚を野生株と比較したところ、有意な差は認められなかった (図 1 A: 触覚, B: 冷覚, C: 温覚)。このことは、R100E NGF 変異が感覚神経系の発達および健常時の感覚機能に大きな影響を及ぼさないことを示唆する。

また、ホルマリンの足背皮下投与による体表性急性痛における R100E NGF 変異の影響を調べたところ、R100E NGF 変異マウスは野生株とほぼ同等の疼痛様反応を示した (図 2)。このことから、R100E NGF 変異は体表性の急性痛にも大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

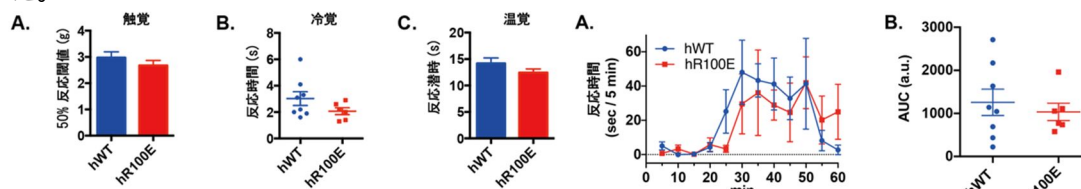


図 1. 健常時の感覚における R100E NGF 変異マウスと野生株の比較  
(A) von Frey テストによる触覚評価 (hWT: n = 12, hR100E: n = 17).  
(B) アセトンテストによる冷覚評価 (hWT: n = 8, hR100E: n = 6)  
(C) Hargreaves テストによる温覚評価 (hWT: n = 12, hR100E: n = 17),  
平均 ± 標準誤差, Student t 検定.

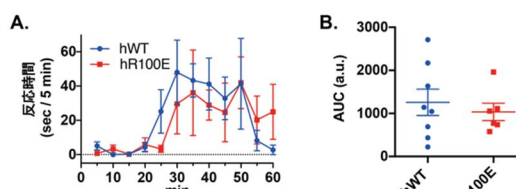


図 2. ホルマリンテストによる体表性急性痛での R100E NGF 変異マウスと野生株の比較  
(A) 足背へのホルマリン皮下投与後の反応時間の推移 (hWT: n = 8, hR100E: n = 6)  
(B) The area under the curves (A.U.C.). 平均 ± 標準誤差, Student t 検定.

次に、骨関節炎症時の R100E NGF 変異マウスの表現系を調べるため、complete Freund's adjuvant を足関節内に投与したモデルで野生株と比較したところ、R100E NGF 変異マウスは野生株と同等の足関節の腫脹を認めたとともに、機械的・温覚刺激に対する過敏性も同等に発生した (図 3 A, B, C)。

一方、dynamic weight bearing システムを用いた自発行動時の行動解析では、足関節炎症モデルにおいて野生株では患側への体重荷重が著しく制限されていたのに対し、R100E NGF 変異マウスでは患側を健常時とほぼ同等に使い続けていることが示された (図 4 A, B)。以上のことから、R100E NGF 変異では体表性の感覚・痛覚は正常に保たれるものの、骨関節における炎症のような病的状況下での痛覚過敏が抑えられることが示唆された。

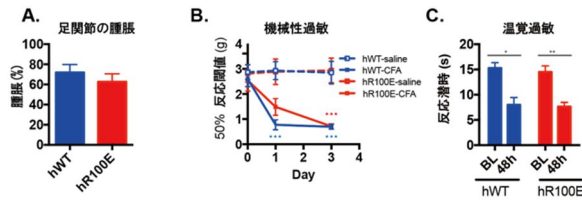


図3. 足関節炎症モデルでの R100E NGF 変異マウスと野生株の比較  
 (A) CFA 足関節投与後 4 日目での足関節腫脹  
 (B) CFA 投与後の von Frey テストによる機械性過敏発生の時間経過  
 (C) CFA 投与後 48 時間での Hargreaves テストによる温覚過敏  
 hWT-saline: n = 8, hWT-CFA: n = 7, hR100E-saline: n = 6, hR100E-CFA: n = 6.  
 平均 ± 標準誤差. \*P < .05, \*\*P < .01 versus hWT group compared by Student' s t test (A, C) and two-way ANOVA (B).

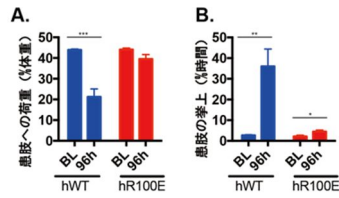


図4 足関節炎症モデルにおける Dynamic weight bearing システムを用いた自発行動時の痛み評価での R100E NGF 変異マウスと野生株の比較  
 (A)CFA 足関節投与後 4 日目での患肢への荷重変化  
 (B) CFA 足関節投与後 4 日目での患肢の挙上時間  
 平均 ± 標準誤差. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001, compared by Student' s t test.

さらに、R100E NGF 変異マウスの末梢神経系での痛覚神経の発達を蛍光免疫組織染色で調べたところ、脊髄後根神経節での TrkA(+)ニューロンの数および坐骨神経での CGRP(+)神経繊維の密度において野生株との差は認められなかった(図5)。従って、足関節炎症モデルにおける R100E NGF 変異マウスの無痛様表現は、痛覚神経系の発達の障害によるものではなく、末梢性感作機構におけるシグナリングの障害が主な機序であることが示された。

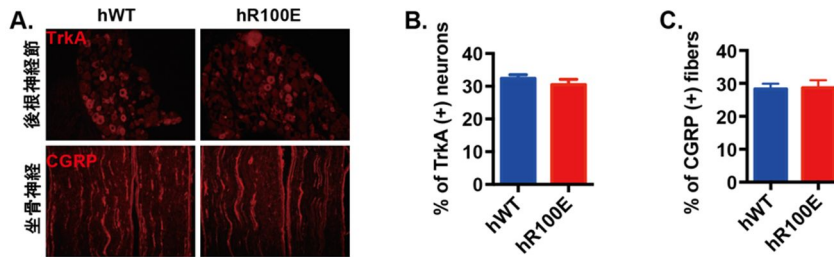


図5. 痛覚神経系の発達における R100E NGF 変異マウスと野生株の比較  
 (A) 脊髄後根神経節(上)における TrkA(+) 痛覚神経と坐骨神経(下)における CGRP(+) 神経繊維の免疫染色  
 (B) 脊髄後根神経節での TrkA(+) 痛覚神経の割合  
 (C) 坐骨神経での CGRP(+) 神経繊維の割合  
 (hWT: n = 5, hR100E: n = 5)  
 平均 ± 標準誤差, Student' t 検定.

## (2) NGF-p75 シグナリングを標的とした鎮痛効果および骨保護作用の評価

Complete Freund's adjuvant を足関節に投与し 2 週間後の大腿骨遠位部をマイクロ CT で評価したところ、野生株では著しい骨密度の低下と骨梁数の減少を認めた。一方、R100E NGF 変異マウスでは、この炎症性の骨破壊が有意に減弱していることが示された(図6)。過去の臨床研究で、抗 NGF 抗体による NGF 中和が骨破壊をもたらす可能性が示されたが、この結果は NGF-p75 シグナリングを特異的に標的とすることで、むしろ骨保護作用を期待できる鎮痛標的になりうる実証された。当初、実施予定であった p75 阻害薬の鎮痛および骨破壊における作用の評価は、in vivo で安全性の示された投与可能な p75 阻害薬の入手が困難であり、実施に至らなかった。

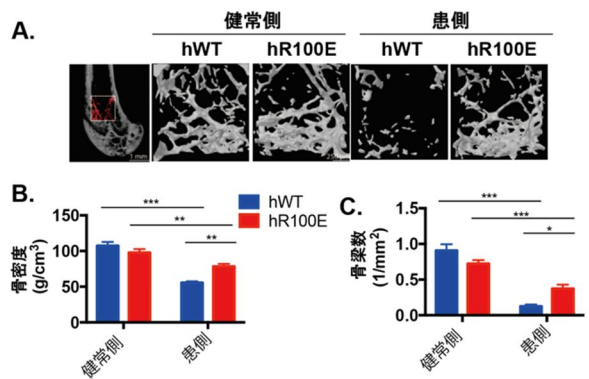


図6 R100E NGF 変異による骨関節炎時の骨破壊への効果  
 (A)CFA 膝関節投与後 14 日目での大腿骨遠位部のマイクロ CT 画像  
 (B,C)CFA 膝関節投与後 14 日目での大腿骨遠位部骨密度 (B) と骨梁数 (C) における R100E NGF 変異マウス (n = 9) と野生株 (n = 7) の比較。  
 平均 ± 標準誤差. \*P < .05, \*\*P < .01, \*\*\*P < .001, compared by one-way ANOVA with Bonferroni' s multiple comparison analysis.

### (3) NGF-p75 シグナリング標的鎮痛のさらなる応用の探索：骨関節術後痛モデルへの応用

本研究では、特に慢性痛への移行のリスクが高いとされている整形外科の骨関節手術をモデルとした骨折/ピンニングモデルを確立し、手術後痛への展開を試みた。同モデルでは、痛みの客観的評価が確立されていないという問題があったが、von Frey テストによる足掌の機械的過敏性では検出できなかったのに対し、dynamic weight bearing システムでは顕著な自発行動時の痛み用行動を定量化することに成功した(図7)。しかしながら、R100E NGF 変異マウスの繁殖に支障が生じたため、同モデルへの適応は未実施となった。

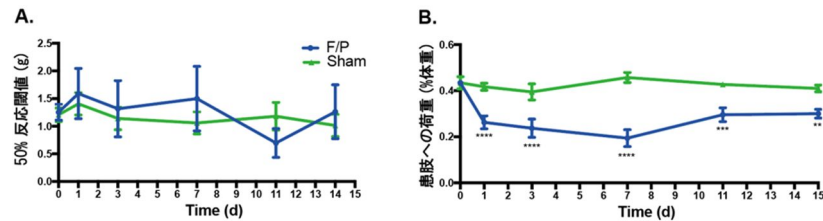


図7 マウス骨関節術後痛モデルでの痛みの評価における dynamic weight bearing システムの有効性

(A) von Frey テストでの評価

(B) dynamic weight bearing システムでの評価

骨折/ピンニング (F/P): n = 8, sham: n = 8

平均 ± 標準誤差. \*\*P < .01, \*\*\*P < .001, \*\*\*\*P < .0001, compared by two-way ANOVA with Bonferroni's multiple comparison analysis.

### 結論と今後の展望

以上の結果から、R100E NGF 変異は痛覚神経系への発達に影響を与えることなく、炎症時のような病的疼痛の発生における痛み感作機構を特異的に抑える可能性が示された。また、懸念された骨破壊に関しても、R100E NGF 変異によるシグナリング変化はむしろ保護的に働く可能性が示唆された。従って、R100E NGF 変異によるシグナリング変化、すなわち NGF-p75 シグナリングは、抗 NGF 抗体による NGF 中和に替わるより安全な鎮痛候補であることが示された。臨床研究において骨破壊の副作用のため、暗唱に乗り上げている NGF 標的鎮痛戦略において、新たな光明を与える結果となった。R100E NGF 変異マウスの繁殖が再開でき次第、骨関節術後痛モデルへの展開を進めていく予定である。NGF-p75 シグナリングを特異的に阻害する戦略として、NGF-p75 結合を選択的に阻害するものクローナル抗体を活用して打開することを考えている。

### 参考文献

1. Hochberg MC. Serious joint-related adverse events in randomized controlled trials of anti-nerve growth factor monoclonal antibodies. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23(suppl 1):S18-21.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kato J, Minoshima R, Ihara N, Nishimura D, Kosugi S, Morisaki H
2. 発表標題 Utilization of Dynamic Weight Bearing system in the evaluation of surgery-induced pain-like behaviors in mice
3. 学会等名 2018 World Congress on Pain (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----