

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17821

研究課題名(和文)無痛型神経成長因子を活用した痛み特異的シグナリングの同定と神経再生への応用

研究課題名(英文)Identification of pain-specific nerve growth factor (NGF)-mediated signalings using painless NGF and application to painless nerve regeneration therapy

研究代表者

加藤 純悟 (KATO, Jungo)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：40465018

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文):我々はより安全な鎮痛を目指して、神経成長因子(NGF)による痛み特異的シグナリングの特定を進めてきた。NGF-p75結合を選択的に阻害する抗NGF抗体NGF30をもとに精製したNGF30-F(ab')<sub>2</sub>は、PC12細胞においてNGF受容体TrkAのinternalizationを促進することが示された。またマウス足掌へのNGF投与による疼痛誘発モデルではNGF30-F(ab')<sub>2</sub>の投与が有意に機械的過敏性亢進を抑制し、投与部位での異常な交感神経発芽を抑制することも示された。以上より、NGF30-F(ab')<sub>2</sub>が有効な鎮痛効果を示すとともに痛みを伴わない神経再生への活路が見出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的なオピオイドパンデミックなどの諸問題で新規鎮痛薬の開発の必要性が叫ばれる中、神経成長因子(nerve growth factor: NGF)は古くから鎮痛標的として注目されてきた。しかしながら、大きな脚光を浴びた抗NGF抗体治療は、感覚障害や骨破壊の促進などの重篤な副作用の出現により行き詰まりを見せている。これに対し本研究での知見は多彩なNGFの生理作用のなかでより痛みの特異的な経路の選択的阻害により、安全かつ有効な鎮痛薬の開発につながる知見となる。また、痛みを取り除くことでNGFの強力な神経再生作用を活かすことで、安全な神経再生治療への発展も期待できる。

研究成果の概要(英文):We have attempted to develop a novel analgesic by targeting pain-specific nerve growth factor-mediated signal pathways. We produced F(ab')<sub>2</sub> fragments from anti-NGF monoclonal antibody NGF30 that reportedly specifically inhibits NGF-p75 interactions. The NGF30-F(ab')<sub>2</sub> fragments facilitated the NGF-induced internalization of NGF cognate receptor TrkA in PC12 cells. In vivo model, in which NGF was injected into the plantar area of hindpaw in mice, revealed that the addition of F(ab')<sub>2</sub> fragments significantly attenuated the NGF-induced mechanical hypersensitivity induced by NGF injection. Furthermore, the addition of F(ab')<sub>2</sub> fragments also suppressed NGF-induced abnormal sympathetic innervation in the NGF-injected planter skin. These findings suggest that the F(ab')<sub>2</sub> fragment can be a promising candidate for analgesic and painless nerve regeneration therapies.

研究分野：麻酔学

キーワード：痛み 慢性痛 神経成長因子 神経再生 p75

### 1. 研究開始当初の背景

世界的なオピオイドパンデミックなどの諸問題で新規鎮痛薬の開発の必要性が叫ばれる中、神経成長因子(nerve growth factor: NGF)は古くから鎮痛標的として注目されてきた。しかしながら、大きな脚光を浴びた抗 NGF 抗体治療は、感覚障害や骨破壊の促進などの重篤な副作用の出現により行き詰まりを見せている。多彩な生理作用を有する NGF を鎮痛標的とするためには、より痛み感作機構に特異的な NGF シグナリングの解明が必要不可欠である。

これに対し、我々は NGF の点変異により骨・関節に特異的な痛み感覚の欠落を呈する先天性無痛無汗症 V 型 (hereditary sensory and autonomic neuropathy type V: HSAN-V)に着目し、そのモデルマウスの作成・解析を進めてきた。事実、NGF に点変異を加えたノックインマウス(R100E NGF マウス)では、HSAN-V 患者と同様、健常時の触覚・温痛覚は保たれる一方、関節炎症時において骨破壊を伴うことなく無痛様行動を呈することを見出した (Kato, et al. IASP, Yokohama, 2016)。この HSAN-V モデルマウスから得られる NGF は神経成長作用が保たれる一方、痛み感作作用を欠如した“無痛型” NGF であると考えられる。この無痛型 NGF による神経細胞内のシグナリングを野生型 NGF と比較することで、痛み特異的な NGF シグナリングの同定が可能であると考えた。

また、NGF は名の通り強力な神経成長作用から神経再生・保護への応用が考えられてきたが、その強烈な痛み感作作用のため臨床応用には至っていない。一方で、この無痛型 NGF の痛み感作を伴わず神経成長作用を発揮できるユニークな特性は、種々の末梢・中枢神経の欠落による神経障害に対して、痛みを引き起こさず臨床応用可能な安全かつ効率的な神経再生・保護治療に活用できる可能性がある。本研究では、HSAN-V モデルマウスと無痛型 NGF を活用して、「病的疼痛に特異的な NGF シグナリングは存在するのか」と「無痛型 NGF は末梢・中枢神経機能障害に対して臨床応用可能な治療効果を発揮できるのか」という学術的問いに答えるべく研究を計画した。

### 2. 研究の目的

HSAN-V モデルマウスを種々の臨床的に重要な病的疼痛モデルに応用して、また同モデルマウスから得られる無痛型 NGF を活用して、in vitro/vivo 両系により多角的かつ網羅的に解析することで、各病的疼痛において新たな鎮痛標的となり得る痛み感作機序に特異的な NGF シグナリングを同定することである。また、無痛型 NGF による痛み感作を伴わない末梢・中枢神経保護効果を探査する。

### 3. 研究の方法

#### 研究 I) 無痛型 NGF を用いた in vitro 系による痛み特異的な NGF シグナリングの同定

当初は HSAN-V モデルマウスから無痛型 NGF を抽出して活用することを計画していたが、共同研究先での HSAN-V モデルマウスの供給の問題が生じた。これに対し、抗 NGF モノクローナル抗体の一つである NGF30 と結合した NGF が無痛型 NGF と類似の挙動、すなわち NGF 受容体のうち TrkA との結合は保たれるが p75 との結合が抑制されるという特性(J Biol Chem. 1998;273(52):34933-34940)に着目し、NGF-NGF30 複合体を用いて、痛み特異的な NGF シグナルの同定を試みることにした。ラット IgG である NGF30 をマウスにも投与できるようにするため、papain や ficin を用いて Fab フラグメント化を試みた。銀染色およびウエスタンブロットにより NGF30 の Fab フラグメント化を確認した。

得られた NGF30-Fab の NGF シグナリングへの効果を検証するため、ラット褐色細胞腫由来の培養細胞である PC12 細胞を用いて、ウエスタンブロットおよび免疫細胞染色を行なった。

#### 研究 II) マウスモデルでの NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による鎮痛効果の評価

NGF はマウスの足掌に皮下投与すると 1 週間程度継続する機械性疼痛過敏を呈する。NGF をあらかじめ NGF30-F(ab')<sub>2</sub> と混合し、NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体をマウス足掌に皮下投与し、von Frey 試験により経時的に機械性疼痛過敏を検査することで、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 添加による鎮痛効果を検証した。

#### 研究 III) NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による痛みを伴わない神経再生・保護効果の探索

上記の NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体をマウス足掌に投与し、8 日目にマウスを灌流固定

後、足掌皮膚を採取し、ScaleS 法により組織を透明化し、AbScale 法により免疫組織染色を施行し、3 次元的に蛍光シグナルを検出することで、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 添加による神経再生効果を検証した。

#### 4. 研究成果

研究 I) 無痛型 NGF を用いた in vitro 系による痛み特異的 NGF シグナリングの同定  
 NGF30 はラット由来 IgG であり、マウスに投与するためには Fab フラグメント化する必要があった。これに対し、ficin を用いた Fag フラグメント化により、NGF30 より純度の高い F(ab')<sub>2</sub> フラグメントを得ることに成功した (図 1)。

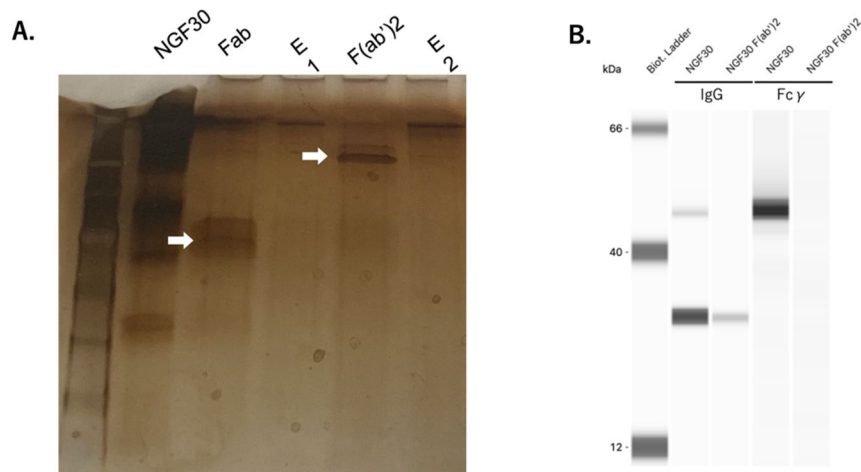


図 1 ficin による NGF30 の Fab フラグメント化. (A) 銀染色. 矢印は Fab, F(ab')<sub>2</sub> をそれぞれ示す. (B) ウェスタンブロット. NGF30 および NGF-F(ab')<sub>2</sub> をそれぞれ抗ラット IgG 抗体、抗ラット Fc $\gamma$  抗体で検出した。

次に、PC12 細胞を用いて、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による NGF シグナリングへの影響を評価した。仮説では、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> は NGF-p75 シグナル経路を選択的に阻害することから p75 の下流にある JNK のリン酸化が選択的に阻害されると予想していたが、TrkA の下流である ERK や Akt のリン酸化も阻害されることが示された (図 2)。これは TrkA と p75 のシグナル経路間の cross-talk が存在することを示唆する。

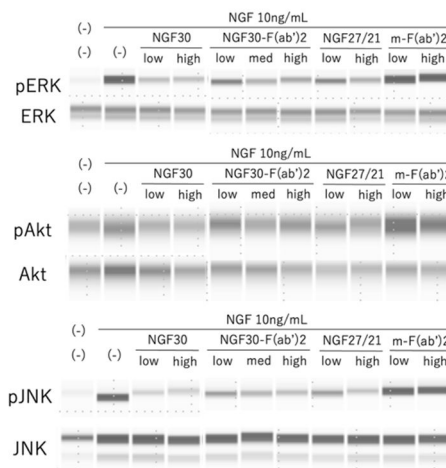


図 2 NGF と各抗体の混合液による PC12 内シグナル分子リン酸化への影響に関するウェスタンブロット。[m-F(ab')<sub>2</sub> は非特異的なマウス F(ab')<sub>2</sub>].

さらに免疫細胞染色の結果では、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> により PC12 細胞に発現している TrkA の internalization が促進することが明らかとなった (図 3)。一方、NGF と TrkA・p75 両方への結合を阻害する別のモノクローナル抗体 NGF27/21 では、この TrkA の internalization が見

られなかったことから、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による特異的な効果であることが示された。

以上の結果より、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> により、無痛型 NGF と同様の NGF-p75 シグナル経路を選択的に阻害することに成功した。

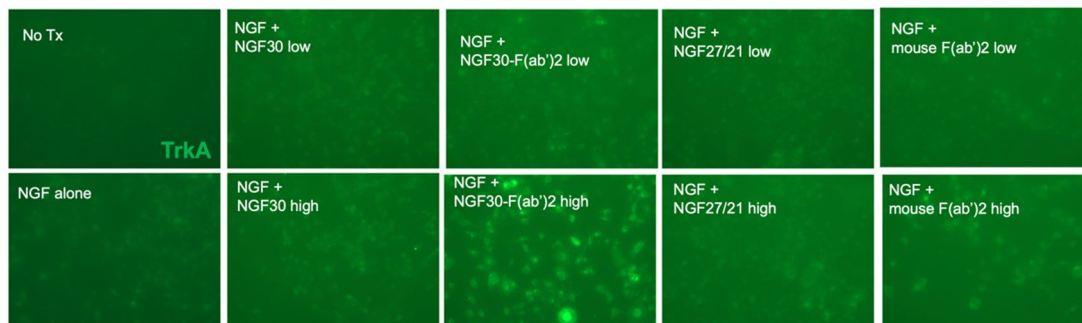


図3 NGFと各抗体の混合液によるTrkAの分布変化. NGF30およびNGF30-F(ab')<sub>2</sub>は用量依存的にTrkAのinternalizationを認める。

## 研究 II) マウスモデルでの NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による鎮痛効果の評価

上記で示された NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による NGF-p75 シグナリングの選択的阻害の in vivo での効果の評価するため、マウス足掌に NGF を投与することで生じる機械性痛覚過敏への効果を調べた。結果、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> の投与により、用量依存的に NGF による機械性痛覚過敏を軽減することが明らかとなった (図 4)。このことにより、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による NGF-p75 シグナリングの選択的阻害が NGF が関与する病的疼痛において鎮痛効果を発揮する可能性が示された。

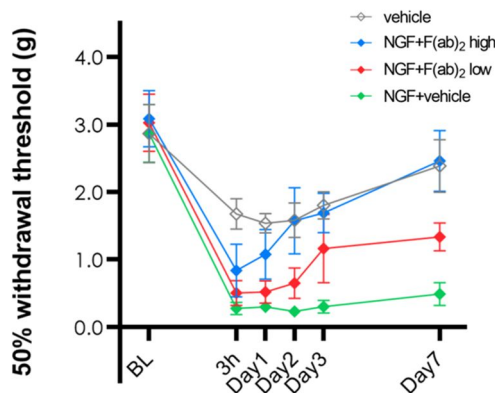


図4 von Frey試験によるNGF30-F(ab')<sub>2</sub>添加によるNGF誘発性機械性痛覚過敏への効果の検証

### 研究 III) NGF30-F(ab')<sub>2</sub> による痛みを伴わない神経再生・保護効果の探索

NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体が、選択的に NGF-p75 シグナル経路を阻害することで、痛みを伴わない神経再生効果を示すかどうかを検討した。NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体を投与したマウス足掌を AbScale 法にて組織透明化し免疫染色を施行したところ、NGF30-F(ab')<sub>2</sub> の添加により、NGF 投与部位において交感神経マーカーである tyrosine hydroxylase (TH) の分布密度が抑制されている知見を得た (図 5)。一方、痛覚神経マーカーである CGRP や神経再生マーカーである GAP43 では有意な差を認めなかった。NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体の神経再生効果は今後さらなる検証が必要である。

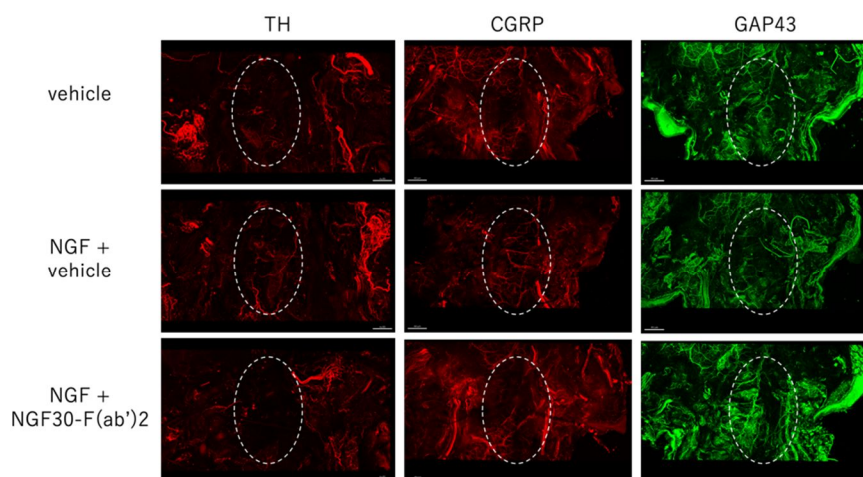


図 5 NGF30-F(ab')<sub>2</sub>添加によるNGF誘発性神経再生への影響の評価. 点線はNGF皮下投与サイトを示す。

### 結論と今後の展望

以上の臨床研究の結果より、NGF-p75 を選択的に阻害するモノクローナル抗体 NGF30 より作成した NGF30-F(ab')<sub>2</sub> は、多彩な生理作用を持つ NGF において痛み特異的シグナリングを選択的に阻害する可能性が示された。今後は実験動物を用いたさまざまな病的疼痛の前臨床モデルにおいて NGF30-F(ab')<sub>2</sub> の鎮痛効果を検証し、臨床への還元性を追究する。また、NGF-NGF30-F(ab')<sub>2</sub> 複合体による痛みを伴わない神経再生効果に関しては、in vivo での末梢神経細胞でのシグナリングの評価など、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------