

令和 6 年 6 月 2 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08938

研究課題名（和文）新規鎮痛薬・鎮痛法開発を目指したNav1.7機能喪失型先天性無痛症の病態機序解明

研究課題名（英文）Elucidation of pathological mechanism of congenital insensitivity to pain with loss of Nav1.7 function for the development of new analgesics and analgesic methods

研究代表者

堀下 貴文（Horishita, Takafumi）

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40369070

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：慢性疼痛に対する新たな鎮痛薬・鎮痛法開発に貢献するために、先天性無痛症患者の病態を分子レベルで解明することを目的として研究計画を立てたが、野生型Nav1.7と痛み受容体を機能的に共発現させることが困難であり、機能解析を得るに至らなかった。そこで、様々な生理作用を有する漢方薬の一つ、蓮の幼芽の成分であるベンジルイソキノリンアルカロイド、ネフェリンの神経系に発現するNav サブユニットに対する影響を電気生理学的に調べた。その結果、ネフェリンがNav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8機能を濃度依存性に抑制することを発見し、新たな局所麻酔薬としての可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経障害性疼痛や侵害受容性疼痛を成因とする慢性疼痛は、既存の鎮痛薬では治療困難な例が多く、新たな鎮痛薬の開発が進められているが、有効な薬物の開発には至っていない。電位依存性ナトリウムチャネル（Nav）は慢性疼痛発生機序に重要な役割を持っており、ネフェリンが神経系に発現するNav サブユニット機能を抑制するという本研究の成果は、新たな鎮痛薬としての可能性を示している。さらに、ネフェリンは従来の局所麻酔薬とは異なる作用機序を持つことが示されており、この新たな抑制機構はNavをターゲットにした新たな鎮痛薬・鎮痛法開発への有用な手がかりになることが期待される。

研究成果の概要（英文）： In order to contribute to the development of new analgesics and analgesic methods for chronic pain, we set up a research plan to elucidate the pathogenesis of congenital insensitivity to pain patients at the molecular level. However, it was difficult to functionally co-express wild-type Nav1.7 and pain receptors, and we could not obtain functional analysis. Therefore, we investigated electrophysiologically the effects of neferine, a benzyloquinoline alkaloid, a component of lotus juvenile buds, a Chinese herb with various physiological effects, on the Nav subunit expressed in the nervous system. We found that neferine inhibits Nav1.2, Nav1.3, Nav1.6, Nav1.7, and Nav1.8 functions in a concentration-dependent manner, indicating its potential as a new local anesthetic.

研究分野：麻酔科学、疼痛関連

キーワード：慢性疼痛 電位依存性ナトリウムチャネル 先天性無痛症 機能喪失型Nav1.7 局所麻酔作用

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経障害性疼痛や侵害受容性疼痛を成因とする慢性疼痛は、その複雑な病態のため既存の鎮痛薬では治療困難な例が多く、がんの終末期と同等とも言われる慢性疼痛による QOL の低下は経済損失にも多大な影響がある。慢性疼痛発症の病態に重要な多くの分子が発見され、これらをターゲットにした新たな鎮痛薬の開発が行われてきたが、未だ有効な鎮痛薬開発には至っていない。

(2) 電位依存性ナトリウムチャネル (Na_v) α サブユニット、 $Na_v1.7$ も慢性疼痛発症に関与する重要な分子の一つである。 $Na_v1.7$ の機能喪失を伴う遺伝子異常を成因とする先天性疾患、先天性無痛症は生涯にわたり痛覚が消失する疾患であり、この病態をモデルとした新たな鎮痛薬として選択的 $Na_v1.7$ 阻害薬が開発され臨床試験が行われてきたが、期待された鎮痛効果は得られなかった。従って、この疾患の病態は完全には解明されておらず、 $Na_v1.7$ 機能喪失以外にもメカニズムが存在すると考えられている。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、痛みを苦しむ多くの難治性慢性疼痛患者に対する新たな鎮痛薬・鎮痛法開発に貢献するために、未だ不明な点が多い $Na_v1.7$ 機能喪失型先天性無痛症の病態を分子レベルで解明することである。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的手法 (アフリカツメガエル卵母細胞発現系) を用いた野生型 $Na_v1.7$ と共発現した痛み受容体の機能解析

野生型 $Na_v1.7$ と痛み受容体 (TRP 受容体、ATP 受容体、ブラジキニン[BK]受容体、酸感受性イオンチャネル[ASIC]、プロスタグランジン[PG]受容体) の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にイオンチャネル・受容体を共発現させ、野生型 $Na_v1.7$ と共発現した状態での痛み受容体の機能を解析する。

(2) 電気生理学的手法 (アフリカツメガエル卵母細胞発現系) を用いた機能喪失型 $Na_v1.7$ と共発現した痛み受容体の機能解析

現在までに報告されている先天性無痛症の変異を有するいくつかの遺伝子変異型 $Na_v1.7$ を作成し、細胞膜表面に発現させ、実際に機能喪失しているかどうかを確認する。機能喪失の確認された遺伝子変異型 $Na_v1.7$ と (1) の痛み受容体の cRNA をアフリカツメガエル卵母細胞に注入し、細胞膜表面にイオンチャネル・受容体を発現させ、機能喪失型 $Na_v1.7$ と共発現した状態での痛み受容体の機能を電気生理学的に解析する。

(1) で得られた野生型 $Na_v1.7$ と共発現した痛み受容体の機能と、(2) で得られた機能喪失型 $Na_v1.7$ と共発現した痛み受容体の機能を比較することにより、機能喪失型 $Na_v1.7$ の痛み受容体機能へ与える影響を解析する。これにより、機能喪失型 $Na_v1.7$ が侵害受容に与える影響全貌が明らかとなり、先天性無痛症の病態解明に繋がるのが期待される。

(3) 慢性疼痛モデルマウスに対する選択的 $Na_v1.7$ 阻害薬と痛み受容体選択的阻害薬の併用療法の影響解析

(1) (2) の結果から、機能喪失型 $Na_v1.7$ の影響によって機能減弱あるいは消失する痛み受容体を同定することによって、先天性無痛症患者の病態が推定された後、薬物によって先天性無痛症の状態が再現できるかどうかを、慢性疼痛モデルマウスを用いて確認する。

炎症性疼痛モデルマウスと神経障害性疼痛モデルマウスを作成し、(1) (2) で得られた機能喪失型 $Na_v1.7$ によって機能減弱あるいは消失する全ての痛み受容体に対する選択的阻害薬、及び選択的 $Na_v1.7$ 阻害薬を併用し、作成した慢性疼痛モデルマウスに投与することによって、先天性無痛症の状態が再現できるかどうかを行動薬理的解析によって確認する。

(1) ~ (3) の結果により、 $Na_v1.7$ の機能喪失以外の先天性無痛症の病態全貌が明らかとなり、難治性慢性疼痛に有効な選択的 $Na_v1.7$ 阻害薬と選択的痛み受容体阻害薬併用療法の開発及び、新たな鎮痛薬開発への手がかりになることが期待される。

4. 研究成果

(1) アフリカツメガエル卵母細胞発現系を用いた $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.7$ 、 $Na_v1.8$ に対するベンジルイソキノリンアルカロイド、ネフェリンの影響解析

ネフェリンによる神経系に発現する 5 つの Na_v サブユニットの抑制効果

$Na_v1.7$ と痛み受容体を卵母細胞に共発現させることが難しく、機能的解析が困難であった。そこで、 $Na_v1.7$ 以外にも神経系に発現する サブユニット、 $Na_v1.2$ 、 $Na_v1.3$ 、 $Na_v1.6$ 、 $Na_v1.8$ を卵母細胞に発現させ、これらに対する局所麻酔作用など様々な生理作用を持つ漢方薬の一つ、蓮の幼芽の成分であるベンジルイソキノリンアルカロイド、ネフェリンの影響解析を電気生理学

的に行った。

ネフェリンは、開口状態（最大カレントの得られる保持電位 V_{max} からの脱分極）及び不活性化状態（半分のカレントの得られる保持電位 $V_{1/2}$ からの脱分極）における脱分極性ナトリウムカレントを抑制した。Nav1.2 以外のサブユニットに対しては、開口状態、不活性化状態への影響に有意差はなかったが、Nav1.2 に対しては、開口状態への影響が有意に強い結果であった ($n=6$, $p < 0.05$) (図1)。従来の局所麻酔薬は不活性化状態の Nav への親和性が高く抑制作用が強く表れるのに対して、ネフェリンの Nav1.2 に対する影響は逆の結果を示した。

次に、ネフェリンの抑制効果の濃度反応性について実験を行ったところ、ネフェリンは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8 の脱分極性ナトリウムカレントを濃度依存性に抑制した (図2)。不活性化状態における IC_{50} 値はそれぞれ、 45.4 ± 3.0 、 28.9 ± 3.7 、 30.8 ± 2.3 、 30.3 ± 2.4 、 $22.1 \pm 2.9 \mu\text{mol/L}$ ($n=6$) であった。Nav1.8 に対する抑制効果が最も強く、Nav1.2 に対する抑制効果が最も弱かったが、Nav1.2 の IC_{50} 値は、その他のサブユニットと比べて有意に高い値であった ($n=6$, $p < 0.05$)。

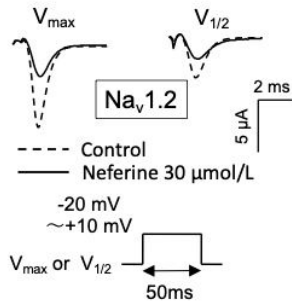


図1 The peak Na⁺ inward current に対するネフェリンの影響

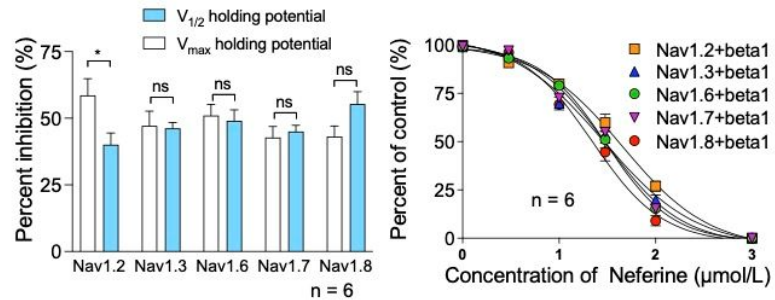


図2 ネフェリンによる抑制効果の濃度反応曲線

ナトリウムチャンネル活性化に対するネフェリンの影響

保持電位から 10mV 間隔で 50mV まで脱分極させて I-V curve を得たのち、これに対するネフェリンの影響を調べた。ネフェリンはナトリウムチャンネルの開口状態、不活性化状態において、全てのサブユニットの脱分極性ナトリウムカレントを抑制した (図3、4)。

その後、I-V curve から activation curve を算出することによって、ナトリウムチャンネル活性化に対するネフェリンの影響を解析した。その結果、ネフェリンはナトリウムチャンネルの開口状態、不活性化状態において、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7 における activation curve の midpoint: $V_{1/2}$ を脱分極方向へそれぞれ 3.7、4.7、7.2、3.5、3.8mV (開口状態) 5.1、4.7、7.0、4.2、3.5mV (不活性化状態) 有意にシフトさせた ($n=6$, $p < 0.05$) (図5、6)。

以上より、ネフェリンは全てのサブユニットに対して開口状態及び不活性化状態においてナトリウムチャンネルの活性化を抑制することが示された。

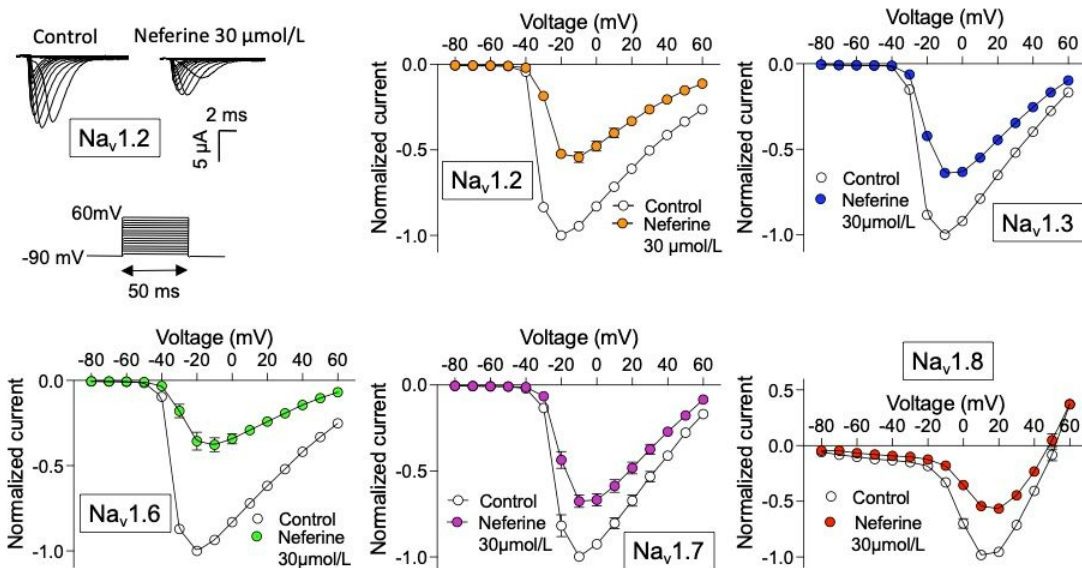


図3 ナトリウムチャンネル (開口状態) の I-V curve に対するネフェリンの影響

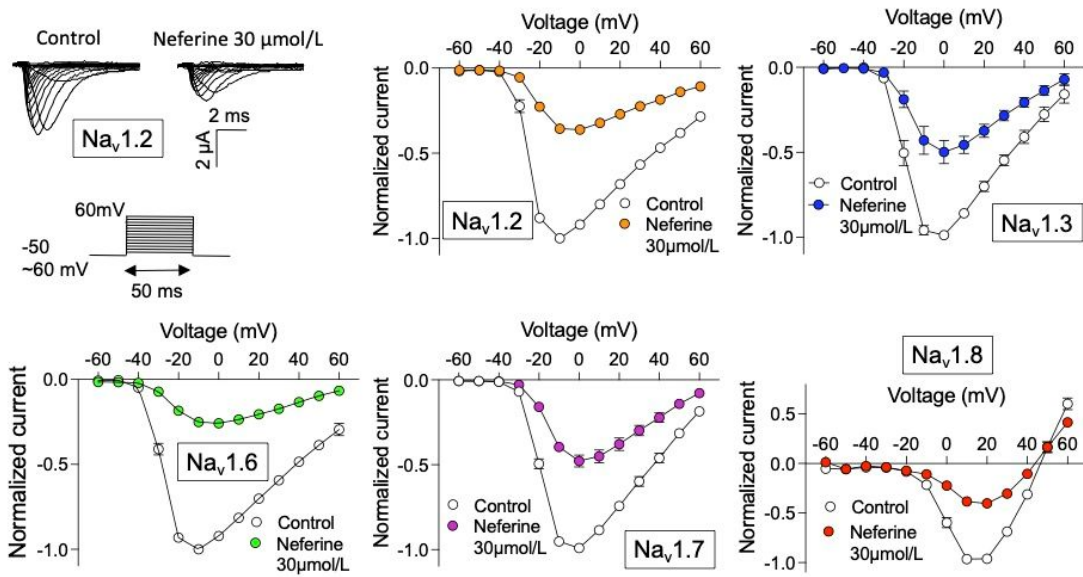


図4 ナトリウムチャンネル（不活性化状態）のI-V curve に対するネフェリンの影響

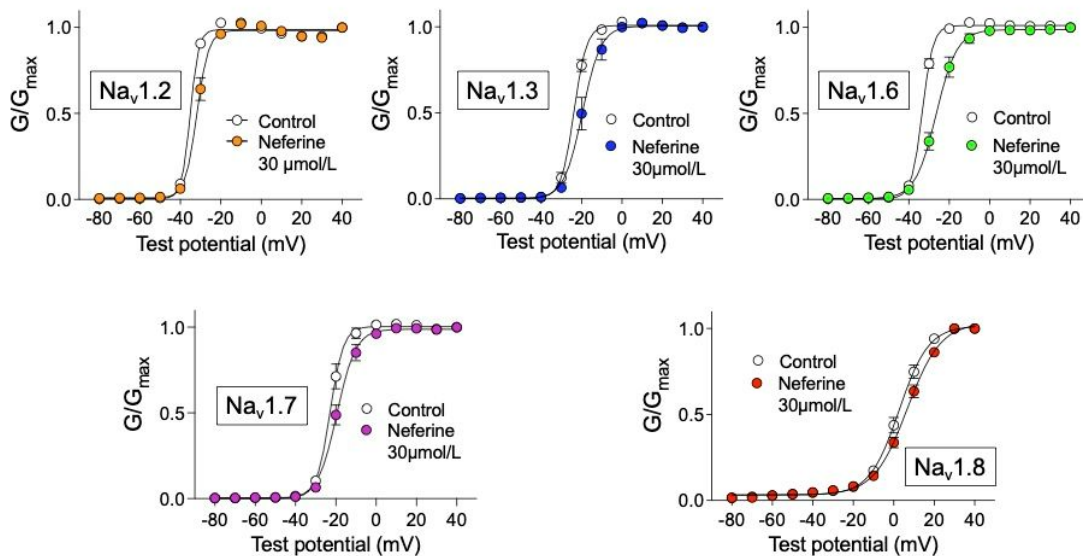


図5 ナトリウムチャンネル（開口状態）の activation curve に対するネフェリンの影響

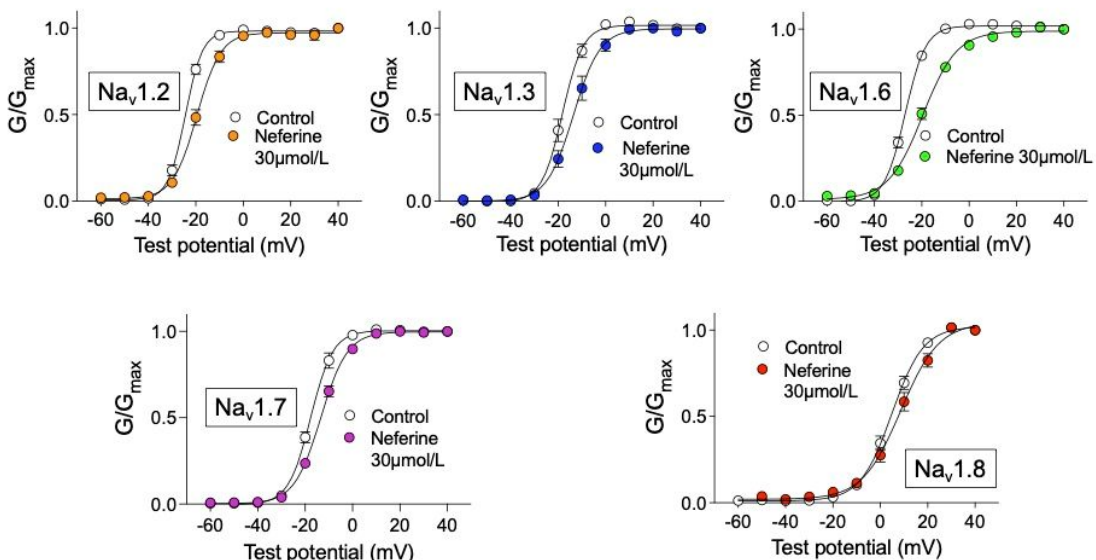


図6 ナトリウムチャンネル（不活性化状態）の activation curve に対するネフェリンの影響

ナトリウムチャンネル不活性化に対するネフェリンの影響

ネフェリンのナトリウムチャンネル不活性化に対する影響を調べるため、-140mV から 0mV までのプレパルス 200ms を与えた後、-20mV ~ +10mV まで脱分極させて inactivation curve を得た。ネフェリンは、Nav1.6 における activation curve の midpoint : $V_{1/2}$ を脱分極方向へ 2.8mV 有意にシフトさせ ($n=6, p < 0.01$) Nav1.7、Nav1.8 における activation curve の $V_{1/2}$ を過分極方向へそれぞれ 3.2 ($n=6, p < 0.05$)、7.5mV ($n=6, p < 0.001$) 有意にシフトさせた。一方、Nav1.2 及び Nav1.3 における activation curve の $V_{1/2}$ には有意な影響は与えなかった (図 7)。

これらの結果は、サブユニットの違いによって、ネフェリンのナトリウムチャンネル不活性化に与える影響は様々であることを示している。Nav1.7、Nav1.8 に対する影響は不活性化を促進する方向へ働いており、そのナトリウムチャンネル抑制効果のメカニズムの一つであると考えられた。

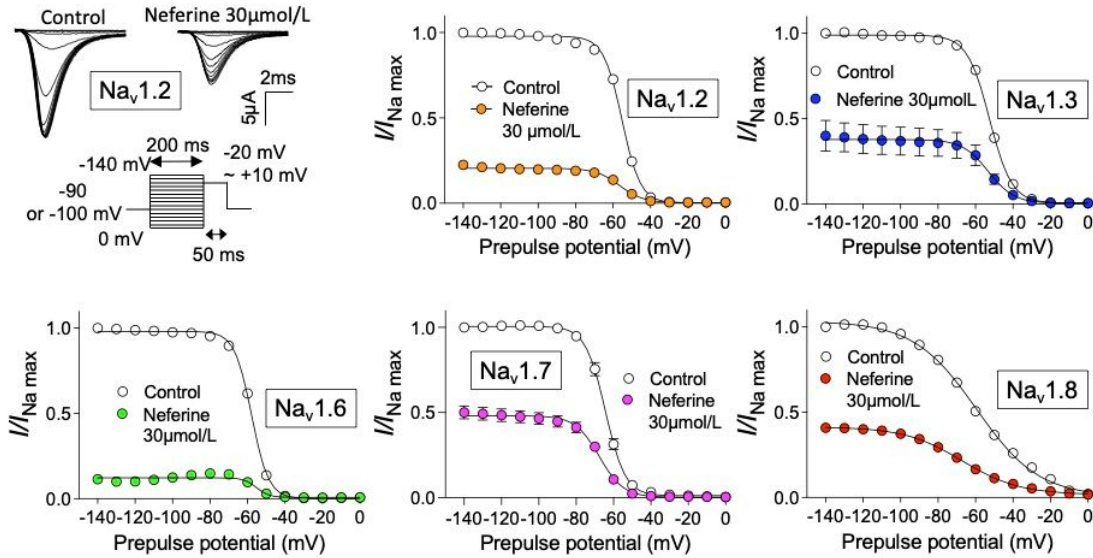


図7 ナトリウムチャンネルの inactivation curve に対するネフェリンの影響

使用依存性ブロックについての解析

10Hz で 60 回、 V_{max} から 20ms 脱分極させて発生させたカレント (開口状態) に対するネフェリンの影響を調べたところ、ネフェリンは全てのサブユニットにおいて、ナトリウムカレントの plateau には影響を与えず、ネフェリンはナトリウムチャンネルに対して使用依存性効果がないことが示された ($n=6, p > 0.05$) (図 8)。

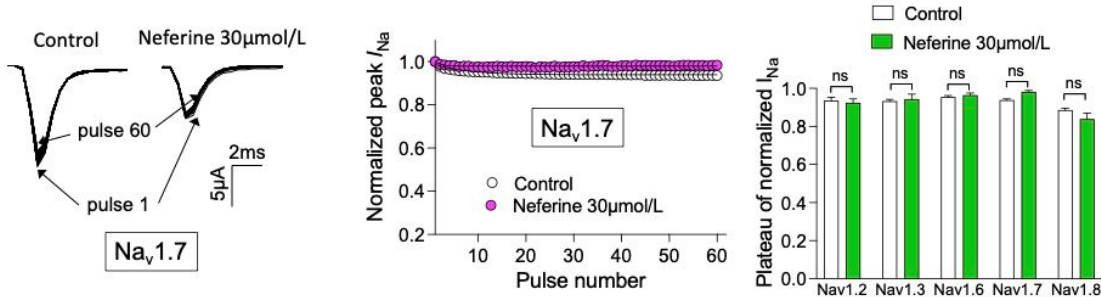


図8 使用依存性に関する検討

①~④の結果より、ネフェリンは、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8 機能を濃度依存性に抑制し、Nav1.8 に対する効果が最も強いことが示された。従来の局所麻酔のナトリウムチャンネル抑制作用のメカニズムは、活性化に影響を与えず、不活性化を促進させることによって効果が発揮され、また使用依存性効果を持つことが知られている。従って、活性化に対する強い抑制効果を持ち、使用依存性効果を持たないネフェリンは、従来の局所麻酔薬の作用とは異なるメカニズムを持ち、さらに、不活性化に対してサブタイプによって異なる影響を持つことから、ナトリウムチャンネルに対して特異的な抑制メカニズム、作用部位を持つと考えられる。ネフェリンのナトリウム抑制効果は従来の局所麻酔と比較しても強力な局所麻酔と同等の効果であり、また、脊髄後根神経節に豊富に発現する Nav1.8 に対する効果が最も強い。さらに、独特な抑制メカニズムを持つことより、難治性慢性疼痛に対する有効な鎮痛薬としての可能性を持つと考えられる。

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
研究協力者	上園 保仁 (Uezono Yasuhito)		
研究協力者	上野 晋 (Ueno Susumu)		

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