

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19517

研究課題名（和文）クライオ電顕を用いたNaチャンネルの構造解析による鎮痛特異的な局所麻酔薬の開発

研究課題名（英文）Development of Adverse Events-free Local Anesthetics in Cryo-EM Structural Determination of Sodium Channels

研究代表者

山内 正憲（Yamauchi, Masanori）

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号：00404723

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：けいれんや循環虚脱を特徴とする局所麻酔薬中毒は局所麻酔薬の重篤な合併症である。現在臨床で使用されている局所麻酔薬はすべてのNaチャンネルを無差別に遮断するため、中枢神経や心臓で副作用を惹起する。一方、電位依存性Naチャンネルのうち、末梢神経に局在し、疼痛伝達に関与するのはNav1.7, Nav1.8, Nav1.9の3種であることが判っている。本研究の目的はクライオ電子顕微鏡を用いてこの3つのチャンネルだけに選択的に結合する分子を探索することであった。われわれは先天性無痛症患者のゲノム解析から、Nav1.8チャンネルに注目することにした。しかし、研究は思うように進まず、当初の目標を断念せざるを得なかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

良質の局所浸潤麻酔や神経ブロックは患者だけではなく、外科医療からの早期回復に必須である。近年は超音波ガイドによる神経ブロックの技術向上とPatient Controlled Analgesiaなどによる局所麻酔薬の投与方法の工夫で、区域麻酔は確実性と安全性は飛躍的に向上した。しかし、局所麻酔薬は痺れ、感覚低下、さらに運動麻痺を伴うため、リハビリテーションの妨げや患者の医療に対する満足度を下げてしまう。さらにけいれんや循環虚脱を特徴とする局所麻酔薬中毒は重篤な合併症である。本研究ではこのような合併症とは無縁な局所麻酔薬分子を探索・創薬する予定であったが、期待した結果は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：Local anesthetic systemic toxicity characterized by convulsions and circulatory collapse is a serious complication of local anesthetics. Local anesthetics currently used in clinical practice indiscriminately block all Na channels, producing adverse effects in the central nervous system and heart. The previous basic studies have revealed that there are nine isoforms of voltage-gated Na channels (Nav channels), and three of them, Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9, are localized in peripheral nerves and involved in pain transmission. The purpose of this study was to obtain structural information using cryo-EM, and to search for molecules that selectively bind to only three channels, Nav1.7, Nav1.8, and Nav1.9, leading to the discovery of new local anesthetic drugs. We focused on the Nav1.8 channel based on exome analysis of patients with congenital indifference to pain. However, our research did not progress as expected, and we had to abandon our initial goal.

研究分野：麻酔科学・疼痛医学

キーワード：局所麻酔薬 ナトリウムチャンネル 構造生物学

## 1. 研究開始当初の背景

良質の局所浸潤麻酔や神経ブロックは患者だけではなく、外科医療からの早期回復に必須である。近年は超音波ガイドによる神経ブロックの技術向上と Patient Controlled Analgesia などによる局所麻酔薬の投与方法の工夫で、区域麻酔は確実性と安全性は飛躍的に向上した。しかし、局所麻酔薬は鎮痛作用以外にも、痺れ、感覚低下、さらに運動麻痺を伴うため、リハビリテーションの妨げや患者の医療に対する満足度を下げてしまう。さらにけいれんや循環虚脱を特徴とする局所麻酔薬中毒は重篤な合併症である。

現在臨床で使用されている局所麻酔薬は脂質親和性が高いため、すべてのニューロンに入り込み、Na チャネルを無差別に遮断する。一方、過去の基礎研究から電位依存性 Na チャネル (Nav チャネル) には 9 つのアイソフォームがあり、末梢神経に局在し、疼痛伝達に参与するのは Nav1.7 Nav1.8 Nav1.9 の 3 種であることが判っている。(Physiol Rev 2019;99:1079) しかしこれら 3 つの Nav チャネルを選択的に阻害する分子はまだ同定されていない。

## 2. 研究の目的

そこで私はクライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) を用いた構造生物学的研究アプローチに着目した。cryo-EM による立体構造解析は、従来の X 線結晶構造解析と異なり、試料の結晶化の必要がないことから、自然な状態のチャネル構造の評価が可能である。また 3 次元構造の計算で異なる状態構造を同時に明らかにすることが可能で、チャネル構造の動的変化を短時間で明らかにすることができるため、イオンチャネルの形態・機能研究には最適である。本研究の目的は 9 つの Nav チャネルの cryo-EM を用いた構造情報の取得であり、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9 の 3 つのチャネルだけに選択的に結合する分子を探索することで、新しい局所麻酔薬の創薬に繋げることである。

## 3. 研究の経過

### (1) 先天性無痛症患者のエクソーム解析

まずわれわれは先天性 Nav チャネル遺伝子異常である先天性無痛症 (HSAN4) の患者ゲノム検体から、次世代 DNA シークエンサーでエクソーム解析を行った。この疾患は原因遺伝子変異が NTRK1 遺伝子のサイトゾーン欠失 (rs80356675) とそれによるアミノ酸コドンのフレームシフトであることが明らかになっているが、われわれはその欠失を確認の上、Nav1.8 チャネルをコードする SCN10A 遺伝子のエキソン 27 に、新たな一塩基変異 (rs772484960) を同定した。この変異は Nav1.8 チャネルのドメイン 4 の S3-S4 間にあり、クモ毒の作用部位でもある (Mol Pharmacol 2015;88:141)。電位センサーとして機能するこの部位は、Nav1.8 チャネルの機能を変える可能性があるかと予想された。

### (2) Nav1.8 チャネルをコードする SCN10A 遺伝子のクローニング

上記の実験から 3 つのチャネルのうち、重要なのは Nav1.8 と考え、次に Nav1.8 チャネルをコードする遺伝子 SCN10A を人工合成し、クローニングを行った。また対照として Nav1.3 をコードする SCN3A と SCN3B もクローニングすることにした。しかし研究遂行上、大腸菌を用いた可溶性タンパクの発現精製系を用いず、ヒト細胞由来の HEK293 培養細胞を用いた Nav チャネルの発現精製を行うことが必要となった。そこでわれわれは HEK293 培養細胞を用いた cryo-EM 試料作成に秀でた東北大学多元物質科学研究所の渡部聡を新たに研究分担者に迎え、研究計画を修正することにした。

### (3) 別な研究室からの Nav1.8 チャネルの構造情報の報告

ベクターを用いた HEK293 細胞への遺伝子導入とチャネル発現実験は順調に進んでいた。しかし 2022 年 7 月に北京の Tsinghua 大学の研究室から、Nav1.8 イオンチャネルと特異的拮抗薬 A-803467 の結合についての cryo-EM を用いた構造解析が報告された (PNAS 2022;119:e2208211119)。加えてこの論文では、Na チャネル電流がパッチクランプ法によって測定されており、機能解析も行われている点が、本研究より優れていると思われた。

### (4) 局所麻酔薬中毒の動物モデルの開発

残念ながら本研究では新規性が失われたため、私の研究室での鎮痛特異的な局所麻酔薬の開発は実現性が小さくなった。そこで本プロジェクトでは麻酔下の動物 (ラット) に局所麻酔薬を過剰投与し、その危険性、すなわち局所麻酔中毒の性状を脳機能レベルで確認する実験を行うことにした。プロジェクトの最終年度に in vivo の脳波測定システムを研究室に導入した。現在、実験は軌道に乗り始めたところである。

#### 4. 研究成果

##### (1) 先天性無痛症(HSAN4)の患者における新規の遺伝子変異と疾患の関連

SCN10A 遺伝子のエキソン 27 に、新たな一塩基変異(rs772484960)を同定した。

##### (2) Nav チャネルの構造解析は断念した。

現在、上記(4)の実験が進行中である。科研費の支援は終了したが、我々の研究室では2024年中に最初のデータを出し、次の創薬のプロジェクトへ繋げてゆく予定である。

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
研究分担者	杉野 繁一  (Sugino Shigekazu)  (00423765)	東北大学・大学病院・准教授   (11301)	
研究分担者	渡部 聡  (Watanabe Satoshi)  (50432357)	東北大学・多元物質科学研究所・助教   (11301)	
研究分担者	木下 賢吾  (Kinoshita Kengo)  (60332293)	東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・教授   (11301)	
研究分担者	鈴木 隆史  (Suzuki Takafumi)  (70508308)	東北大学・医学系研究科・准教授   (11301)	

	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	吉田 典史  (Yoshida Norifumi)	東北大学・医学系研究科・大学院生   (11301)	

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
---------	---------