

令和 3 年 5 月 7 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08852

研究課題名(和文) 分子進化工学的手法を用いたNav1.7阻害薬の開発

研究課題名(英文) Development of novel Nav1.7 antagonist by using molecular pharmacological methods

研究代表者

石田 高志 (Ishida, Takashi)

信州大学・学術研究院医学系(医学部附属病院)・講師

研究者番号：60531952

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)：無痛症患者では痛みの知覚がない。無痛症患者では電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav1.7)の変異が認められることから痛みの知覚にNav1.7が強く関与している可能性が高い。今回の研究では無痛症患者のDNAを解析し新たなNav1.7の変異を見つける事ができた。この患者と同様の変異をもつ遺伝子組み換えマウスを作成し、痛み刺激への応答と脊髄後根神経節細胞の電気活動を記録したところ、機械刺激と熱刺激に対する反応性が低下しており、脊髄後根神経節細胞での電流も低下していることが明らかとなった。この結果よりNav1.7は鎮痛薬の重要なターゲットであることが再確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

痛みは体の異常や危険を察知するために重要な感覚であるが、手術や疾患による過剰な痛みは不快感を与えるだけでなく日常生活に支障をきたすこともある。今回、新しい鎮痛薬のターゲットを見つけるにあたって無痛症患者が痛みを感じない機序を調べた。無痛症患者では電位依存性ナトリウムチャンネル(Nav1.7)の機能が低下していることが明らかとなり、このNav1.7をターゲットとすれば安全かつ効果的な鎮痛薬の開発が行える可能性があることが示された。

研究成果の概要(英文)：Congenital insensitivity to pain is a rare autosomal-recessive disorder. Congenital insensitivity to pain is caused by mutations in the gene encoding for the Nav1.7 channel. We analyzed the DNA from the patient who had no pain perception and a novel mutation in SCA9A was detected. The mutation of SCA9A encoded the pore of Nav1.7 channel. We investigated the mutated Nav1.7 function by electrophysiological method. The result suggests decreased ramp current might contribute to insensitivity to pain. We also created the point mutation knock in mice and investigated the behavior to nociceptive stimuli and the channel function of mutated Nav1.7 at dorsal root ganglion. The knock in mice had reduced pain perception to heat and mechanical stimuli and the amplitude of the current produced by mutated Nav1.7 was decreased.

研究分野：麻酔科学

キーワード：痛み

1. 研究開始当初の背景

電位依存性ナトリウムチャンネル 1.7(Nav1.7)は末梢神経の侵害受容神経に特異的に存在し、運動神経や中枢神経に存在しない。このため Nav1.7 阻害薬は、局所投与や全身投与により運動や他の感覚障害を起こさず、中枢神経系への副作用もなく痛みのみを抑制できる理想的な鎮痛薬となる可能性がある。国内では年間 250 万人の患者が手術を受け、その全ての患者が急性術後痛を経験する。術後痛の管理にはオピオイド、非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs)、アセトアミノフェン、局所麻酔薬による神経ブロックなどが用いられるが、これらの薬物のみでは十分な鎮痛が得られないことがある。また、神経障害性疼痛による慢性痛患者は、慢性腰痛だけでも 1000 万人以上の患者がいるとされるが、NSAIDs やオピオイドでは有効な鎮痛を得られない患者も多い。また、これらの薬物は副作用により長期間の投与が出来ないことがある。近年、プレガバリンなどの新規薬剤が市販されたが、有効でない患者も多く、副作用も少なくない。このように既存の薬物療法では急性・慢性痛患者に対し十分な治療が行えないため、有効かつ安全な鎮痛薬の開発が期待されている。

電位依存性ナトリウムチャンネル 1.7(Nav1.7)のミスセンス遺伝子変異による無痛症患者が報告されて以来、Nav1.7 は新規鎮痛薬のターゲットとして注目を集めている(Coxet al. Nature 2006)。Nav1.7 は主に末梢神経細胞に分布していることから Nav1.7 阻害薬は非選択的なナトリウムチャンネル阻害薬と比べ中枢神経毒性や心毒性の少ないと考えられている。今回、我々は長野県で無痛症患者の遺伝子解析を行い、過去の報告と異なる新たな部位(ポア周囲)での SCN9A のミスセンス変異(F382V)を発見した(右図)。この変異をもつ Nav1.7 を強制発現させた細胞に対しホールセルパッチクランプ法を用いて解析を行ったところ電位-電流曲線を移動されることなく、Na⁺電流の流入の低下を認めた。この結果からチャンネルが存在しない(ノンセンス変異)や電位センサー異常がなくても、ポア周囲の構造変化により Na⁺流入が低下することで無痛状態が起こりうる事が明らかとなった。

2. 研究の目的

過去の報告では Nav1.7 の電位感受性部位の変異により無痛症を発症することから電位感受性部位をターゲットとした研究・創薬が行われてきた (Lee et al. Cell 2014)。一方、我々が解析を行った患者ではポア周囲の構造変化によって無痛症を発症していた。この患者で認められた変異部位は Nav1.3 や Nav1.5 などの他の Nav サブタイプと構造が異なるため、この部位をターゲットとして阻害薬を開発すれば Nav1.7 選択的な阻害薬を開発できる可能性がある。

本研究では今回変異のみられたポア周囲蛋白に結合するペプチドのスクリーニングを進化工学的手法である PERISS 法を用いて行なう。PERISS 法を用いれば細胞膜表面に発現する Nav1.7 に結合するペプチドを効率よく探索・精製することができる。

本研究により安全かつ有効な Nav1.7 阻害薬が開発できれば従来の鎮痛薬では十分な鎮痛を得られなかった急性痛・慢性痛患者に対し有用な治療法を提供できるようになると考えられる。

3. 研究の方法

① SCA9A 変異マウスの作成、行動評価

当施設で解析を行った無痛症患者と同様の遺伝子変異をもつ遺伝子組み換えマウスを作成する。作成した SCA9A 変異マウスを用いて侵害刺激（機械刺激、熱刺激）に対する応答を評価し、痛みの感受性の変化を評価する。また、SCA9A 変異マウスと野生型マウスを用いて術後痛モデルの作成を行い、術後痛モデルの作成後に機械性痛覚過敏と熱性痛覚過敏の評価を行う。

② 変異 Nav1.7 の電気生理学的評価

SCA9A 変異マウスを用いて全身麻酔下に脊髄後根神経節を取り出し、脊髄後根神経節細胞の単離を行う。単離された神経細胞に対してパッチクランプを行い細胞膜に発現する変異型 Nav1.7 の電流を測定する。

4. 研究成果

① SCA9A 変異マウス行動評価

無痛症患者と同じ遺伝子変異をもつ遺伝子組み換えマウスを作成した。作成したマウスを用いて測定部に機械的刺激を加えたところ SCA9A 変異マウスでは野生型マウスと比較し足底部への機械刺激に対する逃避閾値が上昇しており機械刺激に対する応答性が低下していた。また同様に熱刺激逃避潜時を評価したところ SCA9A 変異マウスは野生型マウスよりも逃避時間が長く熱刺激に対しても感受性が低下していることが明らかとなった。

SCA9A 変異マウスと野生型マウスを用いて術後痛モデルの作成を行った。術後痛モデルの作成後に機械性痛覚過敏と熱性痛覚過敏の評価を行ったところ、野生型マウスと比較し SCA9A 変異型マウスでは術後も機械刺激に対する逃避閾値が高く、熱刺激に対する潜時も長く術後痛覚過敏が起こりにくいことが明らかとなった。

これらの結果から本研究で導入された SCA9A の変異によりマウスでも痛みが減弱していることが示された。

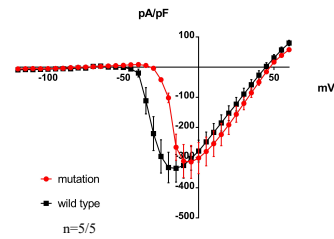
②変異 Nav1.7 の電気生理学的評価

SCA9A 変異マウスと野生型マウスの脊髄後根神経節を取り出し、脊髄後根神経節細胞の単離を行いパッチクランプを行った。

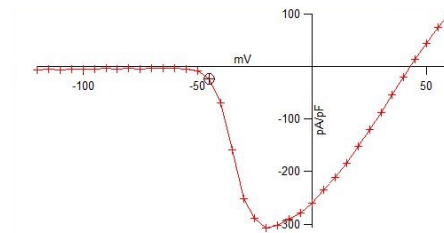
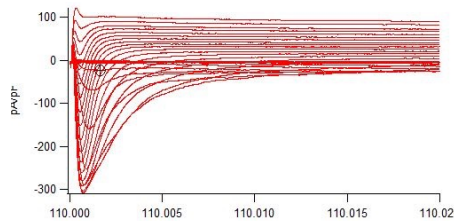
SCA9A 変異マウスでは野生型マウスと比較し Nav1.7 の電流が減少傾向にあり、チャンネル開口閾値が高い傾向にあった。

このことから本研究で注目した変異が脊髄レベルでも活動電位が発生しにくくなり痛みを感じにくくする原因となりうるということが明らかとなった。今後、同部位をターゲットとすれば有効な鎮痛薬の開発が行える可能性があることが示された。

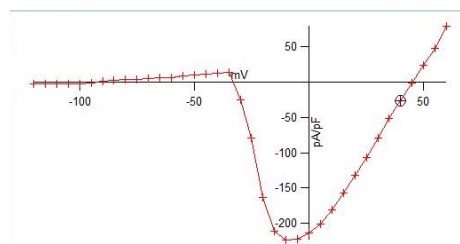
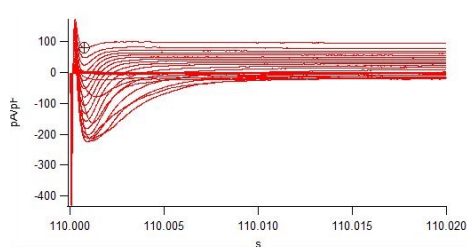
Current-voltage curve of sodium channels (total)



Wild type



Mutation



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wakabayashi R, Ide S, Ishida T, Tanaka S, Kawamata M	4. 巻 5
2. 論文標題 Severe mitral regurgitation due to geometric changes in the mitral valve after surgical aortic valve replacement.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JA Clin Rep	6. 最初と最後の頁 59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40981-019-0277-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ishida Takashi, Tanaka Satoshi, Sakamoto Akiyuki, Hirabayashi Takanobu, Kawamata Mikito	4. 巻 Volume 11
2. 論文標題 Plasma ropivacaine concentration after TAP block in a patient with cardiac and renal failure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Local and Regional Anesthesia	6. 最初と最後の頁 57～60
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2147/LRA.S173877	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Katsumi, Tanaka Satoshi, Fuseya Satoshi, Ishida Takashi, Zhang Hao, Kawamata Tomoyuki, Kawamata Mikito	4. 巻 14
2. 論文標題 Knockdown of TRPV2 channels in sensory neurons increases limb use and weight bearing but does not affect spontaneous flinching behavior in a mouse model of bone cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Pain	6. 最初と最後の頁 1～11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1177/1744806918819942	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ichino Takashi, Tanaka Satoshi, Tanaka Ryusuke, Tanaka Naruaki, Ishida Takashi, Sugiyama Yuki, Kawamata Mikito	4. 巻 33
2. 論文標題 Transcranial motor-evoked potentials of laryngeal muscles for intraoperative neuromonitoring of the vagus nerve during thyroid surgery	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 221～229
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00540-018-2601-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka R, Tanaka S, Ichino T, Ishida T, Fuseya S, Kawamata M	4. 巻 34
2. 論文標題 Differential effects of sevoflurane and propofol on an electroretinogram and visual evoked potentials	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Anesthesia	6. 最初と最後の頁 298-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00540-020-02733-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ide S, Kawamata T, Ishida K, Fuseya S, Ishida T, Sugiyama Y, Kawamata M, Tanaka S	4. 巻 13
2. 論文標題 Phospholipase C 3 Expressed in Mouse DRGs is Involved in Inflammatory and Postoperative Pain.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pain Research	6. 最初と最後の頁 3371-3384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2147/JPR.S280565	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Nakamura H, Yamamoto K, Wakabayashi R, Murakami I, Ishida T, Kawamata M
2. 発表標題 Successful anesthetic management during dual stenting of the esophagus and trachea for a tracheo-esophageal fistula: a case report.
3. 学会等名 Euroanaesthesia (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takekoshi M, Wakabayashi R, Kodaira T, Tanaka R, Ishida T, Kawamata M
2. 発表標題 Estimation of Systemic Vascular Resistance by Photoplethysmographic Analysis during General Anaesthesia: A Pilot Study.
3. 学会等名 Euroanaesthesia
4. 発表年 2019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
研究分担者	清澤 研吉 (Kiyosawa Kenkichi) (50624772)	信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用) (13601)	
研究分担者	木村 忠史 (Kimura Tadashi) (60344214)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626)	
研究分担者	中田 勉 (Nakata Tsutomu) (70452141)	信州大学・学術研究院総合人間科学系・准教授 (13601)	

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