

令和 6 年 5 月 13 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10394

研究課題名（和文）寒冷により誘発増強される痛みメカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of infantile episodic limb pain mechanism induced by cold exposure

研究代表者

奥田 裕子（Okuda, Hiroko）

京都府立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：30709663

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）：小児四肢疼痛発作症は、ナトリウムチャネルサブタイプの一つであるNav1.9をコードするSCN11A遺伝子変異が疼痛発作の原因である。そこで野生型およびSCN11A変異型を持つノックインマウス（RSマウス）において活動電位を構成するNav1.8、1.9の発現パターンに着目し、発現変化と活動電位の関係を検証した。

Nav1.8/Nav1.9変異の神経細胞での発現変化を検討するため免疫染色を行ったが、各抗体の特異性が乏しく、現在、交差性を検討中である。一方で、寒冷暴露によって疼痛誘発をしたRSマウスに新規Nav1.7-1.9阻害剤を投与し、疼痛行動および疼痛経路の過興奮が抑えられるという結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

「小児四肢疼痛発作症」は、寒冷による疼痛増悪という特徴を持つ。この特徴はモデルマウスでも再現され、本特徴を解析することは疾患患者の疼痛緩和、薬剤開発につながると考えた。疼痛経路に発現するナトリウムチャネル亜型であるNav1.9原因変異とともに疼痛伝達に関与するNav1.8の相互作用を検討したが、抗体交差性について引き続き検討の余地がある。一方でNav1.7-1.9を阻害する新規疼痛阻害薬の薬効を本疾患モデルマウスで調べたところ、寒冷暴露による疼痛行動、および疼痛経路の神経活動の過興奮が抑えられた。よって寒冷暴露による患者の発作性疼痛増悪は本薬剤で抑制される可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：It has been shown that the cause of familial episodic pain syndrome is some mutations in the SCN11A, which encoding one of sodium channel subtype Nav1.9. Mutations of Nav1.9 contribute the repetitive firing, which induces the hypersensitivity of pain. Nav1.9 and Nav1.8 are component of the action potential of pain pathway, therefore, we investigated changes in Nav1.8 and Nav1.9 mutation expression and cooperative relationships in action potentials. We tried the immunohistochemistry of Nav1.8 and Nav1.9 (WT and p. R222S mutation) and are in the process of trying to determine the antibody cross reactivity. While we tried to investigate the effects of the novel inhibitor, which has the effects on Nav1.7, 1.8, and 1.9 on mice harboring p. R222S mutation. This drug was reduced the pain response to pain induced by cold exposure behavioral tests, and also suppressed the repetitive firing of pain pathway of these mutant mice.

研究分野：生理学

キーワード：小児四肢疼痛発作症 疼痛 寒冷 SCN11A SCN10A

1. 研究開始当初の背景

我々は、乳幼児期から周期性四肢大関節疼痛を生じる、思春期以降に緩和する、寒冷曝露によって誘発・増悪するという特徴的な症状を示す日本人家系を対象に原因遺伝子の探索を行い、*SCN11A* 遺伝子の変異 (p.R222SH/S, F814C, F1146S) を原因として特定し [,], 本症を「小児四肢疼痛発作症」として疾患概念を確立した。2016-2018年の疫学調査 []により、本症は全国に分布し、本疾患患者の約8割は寒冷によって疼痛が誘発され、疼痛発作時は就学が困難となるほど小児のQOLを著しく損なう要因となっていることが分かってきた。

また、小児四肢疼痛発作症の Nav1.9 変異モデルマウス (*SCN11A* p.R222S マウス、以下 RS マウス) を寒冷曝露することで、疼痛閾値の低下を行動実験によって示した []。このことは神経細胞の過興奮が寒冷曝露により誘発され疼痛経路が活性化していることを示すと考えられる。疼痛経路に存在する神経細胞の活動電位はナトリウムチャネル (Nav1.7, 1.8, 1.9) が関与する。ヒトでの疼痛疾患において、Nav1.7 発現は疼痛の有無で変化がない [] が、Nav1.8, 1.9 および Nav1.9 変異の寒冷曝露時における発火活動への寄与や発現変化に関しては未だ不明である。

2. 研究の目的

小児四肢疼痛発作症の原因である Nav1.9 変異は、寒冷曝露で疼痛経路が過興奮していることがわかっている []。よって、疾患原因遺伝子である Nav1.9 変異を持つモデルマウス (RS マウス) を用い、疼痛経路の後根神経節 (DRG) 細胞の活動電位を構成する Nav1.8, 1.9 に着目し、寒冷時における発現パターンや活動電位の構成成分の変化を検討することを目的とした。一方で、寒冷曝露時のみに疼痛発作が生じることから、非オピオイド薬として新規に開発された Nav1.7-1.9 阻害薬である ANP-230 についても、寒冷で疼痛誘発したモデルマウスの疼痛発作時においての薬効を調べた。

3. 研究の方法

疼痛発作メカニズムを検討するため、小児四肢疼痛発作症の原因遺伝子変異をもつ RS マウスについて (1) CRISPR/Cas9 で Nav1.8 を欠損させ、Nav1.8 欠損 (Nav1.8null) かつ Nav1.9 (WT・RS) を作出し、(2) 寒冷曝露下での各チャネル発現分布についての免疫染色を行った。また (3) 野生型マウス (WT マウス) と RS マウスを用い、ANP-230 の鎮痛効果を行動実験及び電気生理学の実験で検討した。

- (1) Nav1.8null/Nav1.9(WT・RS) マウスを寒冷条件 (4 で 16 時間以上) で飼育し、Nav1.8 の欠損と疼痛行動の再現を検討した。
- (2) 疼痛伝達経路である DRG および足底末梢神経を摘出し凍結切片を作成、WT、Nav1.8null/Nav1.9 (WT・RS) を用いて発現パターンの違いについて検討を試みた。
- (3) ANP-230 投与群とプラセボ群で投与後一時間における疼痛抑制効果を行動実験 (Hot/Cold plate 法、von fry 法) で検討した。また同群を用い、DRG ニューロンの過興奮への抑制効果を電気生理学的に解析した。

4. 研究成果

(1) Nav1.8null/Nav1.9 (野生型 (WT)・変異 (RS)) の作出

Nav1.8null/Nav1.9 (WT・RS) のそれぞれのマウスについて、疼痛の表現型以外の変化がないかを検討するため、4 週から 10 週まで体重測定、および産仔状況の確認を行い、Nav1.8 欠損による顕著な表現型の変化はないことを確認した。また、それらマウスにおいて、Nav1.8 が欠損していることを western blot 法で確認した (図 1)。

それらマウスを用い、6-8 週齢のマウスを寒冷条件 (4 で 16 時間以上) で飼育し、疼痛行動の解析として von Frey 法を行ったところ、Nav1.8null/Nav1.9 変異マウスにおいて、疼痛行動の再現が確認できた (図 2)。

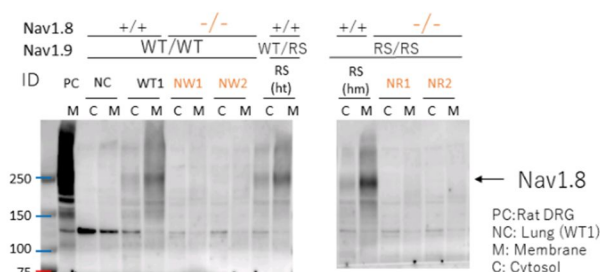


図 1

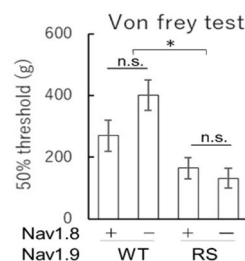


図 2

(2) Nav1.8null/Nav1.9 (WT・RS) の DRG ニューロンの免疫染色

作出した Nav1.8null/Nav1.9 (WT・RS) を、寒冷曝露による疼痛惹起が確認されている 4 O/N で飼育後、4% PFA で還流固定した DRG を採取し、切片標本を作成した。一方で、使用す

る Nav1.8、1.9 抗体の交差性を調べるため、単離した DRG で染色条件を検討した。しかし、Nav1.8 と Nav1.9 はアミノ酸配列の相同性が高く、抗体の非特異的染色像が得られたため、染色法、および交差性の検討が必要となった。

(3) ANP-230 の鎮痛効果の検討

疼痛行動の抑制

行動実験では、RS マウスにおいて熱冷感刺激、機械刺激に対する ANP-230(3, 10, 30ng/kg) 投与による濃度依存的疼痛抑制効果が見られた。また、鎮痛対照薬として用いた Ca チャネルブロッカーのプレガバリン (PGB) と比較し、熱刺激、機械刺激においては ANP-230 が有意な鎮痛効果があることを示した(図 3)。

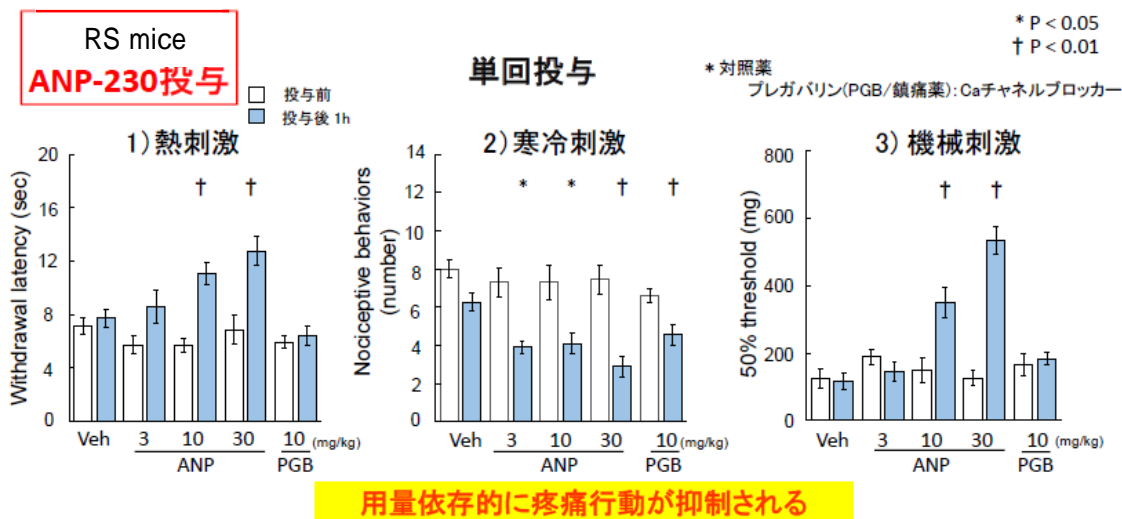


図 3

疼痛経路の神経活動の解析

寒冷暴露した RS マウスでは、疼痛経路の DRG ニューロンの静止膜電位 (RMP) が脱分極側にシフトし、活性化しやすい状態になっている。また、WT に比べて有意に活動電位の発火頻度が高いことが分かっている[]。本研究では WT および RS マウスの DRG ニューロンを単離し、パッチクランプ法を用い、RMP と活動電位について ANP-230 (10, 30uM) を投与、解析を行った。ANP-230 投与後、RMP は過分極側にシフトし、さらに細胞の過興奮を示す活動電位の発火頻度は用量依存的に有意に抑制された(図 4)。このことは ANP-230 が Nav1.9 変異による RMP 過分極シフトと過興奮に抑制効果があることを示唆した。

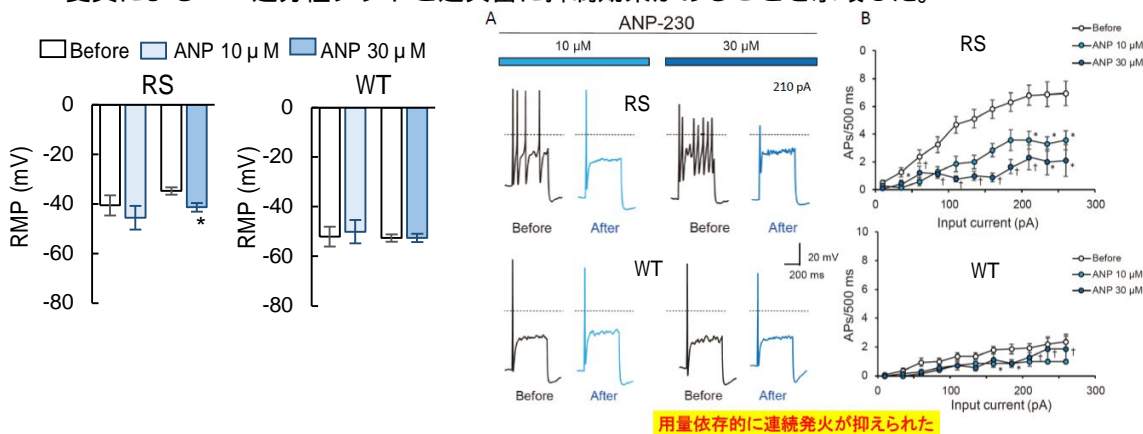


図 4

また、活動電位の各パラメータについても計測したところ、閾値を超えた活動電位発生後の上昇、降下(overshoot)が抑制された(表 1)。この結果により、ANP-230 が DRG ニューロンの Overshoot の構成成分である Nav1.7, 1.8 を抑制する作用があることを示した。

Genotype	Parameter	ANP-230							
		n	Before	10 uM	p value	n	Before	30 uM	p value
RS	Amplitude (pA)	7	88.66 ± 2.48	79.08 ± 4.44	< 0.05	6	82.14 ± 7.55	68.56 ± 4.83	< 0.05
	Maximum rate of rise time (mV/ms)	7	39.24 ± 4.33	28.65 ± 3.88	< 0.05	6	49.51 ± 14.35	19.98 ± 7.24	< 0.05
	Maximum rate of fall time (mV/ms)	7	-10.14 ± 2.16	-8.37 ± 2.40	n.s.	6	-17.42 ± 6.94	-10.99 ± 4.66	< 0.05
	Width (ms)	7	7.25 ± 0.58	7.16 ± 0.74	n.s.	6	6.48 ± 1.28	7.45 ± 1.36	< 0.05
	Threshold (mV)	7	-9.60 ± 0.79	-8.53 ± 1.74	n.s.	6	-9.78 ± 1.21	-11.28 ± 1.36	n.s.
WT	Amplitude (pA)	7	79.68 ± 10.55	68.17 ± 14.19	n.s.	5	83.01 ± 11.5	69.79 ± 12.21	< 0.01
	Maximum rate of rise time (mV/ms)	8	34.87 ± 8.52	20.17 ± 5.14	< 0.01	5	51.24 ± 5.53	27.08 ± 6.75	< 0.01
	Maximum rate of fall time (mV/ms)	7	-15.87 ± 2.54	-13.13 ± 1.57	n.s.	4	-18.77 ± 2.27	-14.80 ± 2.76	n.s.
	Width (ms)	7	5.87 ± 0.84	6.04 ± 0.83	n.s.	5	5.12 ± 0.77	5.03 ± 0.61	n.s.
	Threshold (mV)	7	-8.50 ± 0.89	-7.66 ± 0.70	n.s.	4	-10.03 ± 0.71	-7.99 ± 0.86	n.s.

Table 1. Parameters of action potential at current threshold. *p < 0.05, †p < 0.01; two-sided Student's t test.

表 1

以上の結果から、ANP-230 は小児四肢疼痛発作症のモデルマウスの疼痛行動を抑制し、疼痛経路の神経細胞に発現する Nav1.7, 1.8, 1.9 を抑制することで変異による過興奮を抑制することを示した。このことから、ANP-230 は小児四肢疼痛発作症の疼痛抑制効果を有することが示唆された。

これらの結果について 2023 年に論文としてまとめ、発表した[]。

< 引用文献 >

Okuda H, Noguchi A, Kobayashi H et al., Infantile pain episodes associated with novel Nav1.9 mutations in familial episodic pain syndrome in Japanese families. *PLoS One* 2016, 11. e0154827. DOI: 10.1371/journal.pone.0154827

Kabata, R, Okuda H, Noguchi A et al., Familial episodic limb pain in kindreds with novel Nav1.9 mutations. *PLoS One* 2018, 13, e0208516. DOI: 10.1371/journal.pone.0208516

E.V. Bird, P.P. Robinson, F.M. Boissonade, Nav1.7 sodium channel expression in human lingual nerve neuromas. *Mol Pain*. 2013, 9. DOI: 10.1186/1744-8069-9-52.

Hiroko Okuda, Sumiko Inoue, Yoshihiro Oyamada et al., Reduced pain sensitivity of episodic pain syndrome model mice carrying a Nav1.9 mutation by ANP-230, a novel sodium channel blocker. *Heliyon*. 2023, 14;9. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e15423.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Okuda Hiroko, Inoue Sumiko, Oyamada Yoshihiro, Koizumi Akio, Youssefian Shohab	4. 巻 9
2. 論文標題 Reduced pain sensitivity of episodic pain syndrome model mice carrying a Nav1.9 mutation by ANP-230, a novel sodium channel blocker	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e15423 ~ e15423
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.heliyon.2023.e15423	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 H. Okuda, S. Inoue, Y. Oyamada, A. Koizumi, S. Youssefian
2. 発表標題 Analgesic effects of a novel sodium channel blocker on a mouse model of episodic pain syndrome
3. 学会等名 Neuroscience 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田 裕子、井上 純子、小山田義博、Shohab Youseffian、小泉 昭夫
2. 発表標題 Naチャンネル阻害薬ANP-230の小児四肢疼痛発作症に対する疼痛抑制効果の検証
3. 学会等名 第93回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 奥田 裕子、井上 純子、小山田義博、Shohab Youseffian、小泉 昭夫
2. 発表標題 新規のナトリウムチャンネル阻害薬であるANP-230は小児四肢疼痛発作症のモデルマウスの疼痛発作を抑制する
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 1. 奥田裕子、竹谷朱、小林果、土生敏行、原田浩二、ショハブ ユーセフィアン、小泉昭夫
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症の神経過興奮メカニズム解明のためのNav1.8欠損マウスの作出
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

2022/10/10 2:00 日本経済新聞 電子版「武田薬品などからスタートアップが独立」 NOMURA Health care note No.22-9 https://www.nomuraholdings.com/nhs-a/services/publication/data/healthcare_188.pdf
--

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	S Youssefian (Youssefian shohab) (00210576)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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