

# NCS-1 は神経障害性疼痛の新規治療標的となるか

和歌山県立医科大学医学部薬理学講座  
西谷 友重

## 1. 研究目的

1.1. 神経障害性疼痛は日本では数十万人規模の患者数が推定されているが、従来の鎮痛薬に抵抗性であることから分子基盤に基づいた新規の治療戦略が必要とされている。痛み受容・伝達の機構については多くのイオンチャネル (TRP チャネル、電位依存性  $\text{Na}^+$ チャネルなど) が関与している。この中で、これらチャネルが活性化されると膜の脱分極が生じ、これが活動電位の発生および細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇をひきおこす。細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度の上昇は、グルタミン酸や神経ペプチドの放出を促し、痛みの伝達および感知に重要な役割を果たす。特に慢性疼痛の際は、神経炎症が惹起され痛覚過敏となる。したがって、これらのシグナルのいずれかを抑制すれば痛みは緩和される。

1.2 一方、生体には内因性の痛み緩和系として電位依存性  $\text{K}^+$ チャネル電流 (A タイプ電流/ $I_{\text{SA}}$ ) が存在する。 $I_{\text{SA}}$  は活動電位発火直後に活性化され、 $\text{K}^+$ 流出により膜を過分極させ神経の興奮抑制を引き起こす。研究代表者らは以前、 $I_{\text{SA}}$  (心臓では  $I_{\text{to}}$  電流) の分子実体が電位依存性  $\text{K}^+$ チャネル Kv4 であることを報告した[1]が、近年この Kv4 チャネルが疼痛緩和の分子標的となるという報告が数多くある。例えば Kv4 (Kv4.1-Kv4.3) のうち、特に Kv4.3 チャネルは痛み受容に関わる脊髄後根神経節 (DRG) に高発現しており[2]、Kv4.3 チャネルを DRG 特異的にノックダウンしたマウスは痛覚過敏になる[3]。

1.3 ところで研究代表者らはこれまでに、イオンの通り道を形成する①Kv4 チャネルの分子内制御因子として  $\text{Ca}^{2+}$ センサー-NCS-1 (Neuronal  $\text{Ca}^{2+}$  sensor-1/frequenin)を同定してきた[4]。NCS-1 は、カルモジュリンに代表される小さな EF ハンド  $\text{Ca}^{2+}$ 結合タンパク質であり、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度変化により活性化され下流のシグナルのスイッチとして働く。NCS-1 は Kv4 チャネルと神経において結合し、発現系で Kv4 チャネル電流を増大させる。しかし、NCS-1 が Kv4 チャネルと共役して神経障害性疼痛の緩和に寄与するかに関しては今のところ報告が無い。そこで本研究の目的は、 $\text{Ca}^{2+}$ センサー-NCS-1 が神経障害性疼痛の新規治療標的となり得るか、NCS-1 の遺伝子欠損 ( $\text{Ncs1}^{-/-}$  または NCS-1 KO) マウスを用い、分子メカニズムを含めて明らかにすることである。

## 2. 研究方法

### 2.1 実験動物

全ての動物実験の手法は、NIH ガイドライン (実験動物の愛護と使用に関するガイド) および「和歌山県立医科大学における動物実験等の実施に関する規程」に従って実施され、和歌山県立医科大学動物実験委員会によって承認されている (承認番号: 1032)。  $\text{Ncs1}^{-/-}$ マウス (C57BL / 6-NCR) は、以前の報告[5]に従って作製、維持した。コントロールグループは、NCS-1 KO マウスと先祖が同じであり且つ年齢を一致させた  $\text{Ncs1}^{+/+}$ マウスを用いた。全てのマウスは、温度 (23- 24°C) 及び湿度 (60- 70%) 制御下、12 時間の明暗サイクルで維持されたものを用いた。

### 2.2 免疫蛍光法

マウスをイソフルランで麻酔し、4% (w/v) パラホルムアルデヒド/PBS で灌流した後、脊髄後根神経節 (DRG) を取り出し、後固定、30% (w/v) スクロース/PBS 処理後、OCT compound に包埋した。クライオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて厚さ 30  $\mu\text{m}$  の連続切片を作製した。各切片をブロッキング後、一次抗体として抗 Kv4.3  $\text{K}^+$ チャネル抗体 (Alomone labs, APC-017, Jerusalem, Israel) または抗 NCS-1 抗体 (Gifted from Andreas Jeromin) で 4°C、一晩、蛍光標識二次蛍光体として Alexa Fluor488 conjugated goat anti-rabbit antibody (Abcam, Cambridge, UK) で 15~25°C、2 時間、インキュベートした。PBS で洗浄後、

核染色のため Hoechst33342 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と暗室下、室温で 10 分間インキュベートした。封入後、共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用して蛍光画像を取得した。

### 2.3 機械刺激に対する痛覚の測定法(von Frey テスト)

定法に従って von Frey テストを行った。生後 7-9 か月齢の NCS-1 KO マウスおよび WT マウス (オスおよびメス) を、実験を行う環境下で最低 1 日慣れさせた後、実験当日 2-3 時間前に個別に 5x5mm の金属の網の上に置き、ガラス瓶をかぶせて慣れさせた。自発運動が消失したのを確認した後、9 本の異なる圧力 (0.02、0.04、0.07、0.16、0.4、0.6、1.0、1.4 および 2.0g) を与えることができるフォンフィラメントを用いて、マウス後肢足蹠に垂直に曲がるまで押し付け、逃避反応を引き起こすか否かを観察した。最初は 0.4 g のフィラメントから開始し、刺激で逃避反応が認められたら 0.16 g のフィラメントで刺激し、反応が認められない時は 0.6 g のフィラメントの刺激を行った (up - down 刺激法)。最初に閾値の越えた時、すなわち刺激に対して陽性から陰性、あるいは陰性から陽性へと変化した際、その後 4 回同様の up-down 刺激を行った。Dixon らの方法に従って 50% 閾値を求めた。

### 2.4 熱刺激に対する感受性の測定法(Hargreaves テスト)

熱痛覚過敏を評価するために、以前 共同研究者らが報告した方法[6]に従い Hargreaves テストを行った。マウス (生後 7 か月齢の WT および KO のメスマウス) を高架ガラスシート上の透明なプラスチックケージに入、1~2 時間 馴化させた後、輻射熱ソース (IITC 390 Plantar Test Analgesia Meter, Neuroscience) をガラスシートの下に配置し両方の後足の足底表面に当てた。輻射熱に対して後ろ足を逃避するまでの時間 (潜時) を、5 分間隔で各後足について 10 回測定し、データは 10 回の刺激の平均潜時として表した。組織の損傷を避けるために、熱照射は 15 秒を上限に設定した。

### 2.5 統計学的解析

それぞれの実験結果は平均値±標準誤差 (S. E. M. ) で表した。統計計算は対応のない t 検定で解析した。P<0.05 を有意差ありとした。

## 3. 研究結果

### 3.1 Kv4 チャネルおよび NCS-1 タンパク質のマウス DRG 神経における発現パターン。

Kv4. チャネルおよび NCS-1 のタンパク質が実際、マウスの DRG 神経に発現するか否か、またどのような神経細胞に発現しているかについて免疫蛍光法により確認した。NCS-1 はマウス DRG においてほとんどすべての神経細胞に発現していた。また、NCS-1 は IB4 陽性 (小型非ペプチド神経) および陰性 (小型ペプチド神経) の細胞両方に発現が認められ、その細胞内局在は細胞質、細胞膜両方であった。一方、マウス DRG には、Kv4 チャネル (Kv4.1-Kv4.3) のうち Kv4.3 チャネルが主に発現していることが報告されている。実際、研究代表者らが行った場合でも、Kv4.3 チャネルが小型神経の形質膜および細胞質に発現していることが明らかとなった。

### 3.2 NCS-1 KO マウスにおける機械刺激への感受性の変化について。

NCS-1 が痛み感受の緩和に関わっているか確認するため、NCS-1 KO マウスの機械刺激に対する感受性を同月齢の WT マウスと比較した。その結果、メス (左) およびオス (右) 両方において、KO マウスで機械刺激に対する感受性が増加していることがわかった。すなわち、NCS-1 は痛覚感受の緩和に寄与している可能性がある。

### 3.3 NCS-1 KO マウスにおける熱刺激への感受性の変化について。

次に、NCS-1 KO マウスの熱刺激に対する感受性を同月齢の WT マウスと比較した。その結果、熱刺激に対しては WT と KO マウスで感受性の有意な差は認められなかった。

## 4. 考察

### 4.1 NCS-1 と Kv4 チャネルの痛み緩和に関する生理的役割

本研究により、

- 1) NCS-1 は Kv4.3 同様、マウスの DRG に高発現すること、
- 2) NCS-1 の KO マウスは、雌雄に関係なく機械刺激に対し野生型 (WT) よりも過敏であること、
- 3) しかし NCS-1 の KO マウスは、機械刺激に対しては WT と較べて感受性に違いが認められないことが明らかとなった。

研究代表者らは以前の研究で、機械刺激による痛覚過敏のメカニズムがオス・メスで異なることを報告した[7]。一般に、メスはオスに較べて障害による痛覚過敏が起こりやすい。しかし今回、障害を与えていない系と比較したためか、メスがオスより痛覚に対し感受性が高いという結果は得られなかった。しかし、いずれにおいても K0 マウスの方が痛み刺激に対し感受性が高く、NCS-1 が (Kv4 チャネルを介して) 機械刺激の緩和に寄与する可能性を強く示唆している。Kv4 チャネルは近年、疼痛緩和の分子標的となるという報告が数多くある。例えば Kv4 (Kv4.1-Kv4.3) のうち、特に Kv4.3 チャネルは痛み受容に関わる DRG に高発現しており[2]、神経の障害により Kv4.3 チャネルタンパク質の量が低下し、また Kv4.3 チャネルを DRG 特異的にノックダウンしたマウスでは痛覚過敏に陥る[3]ことが報告されている。NCS-1 は、Kv4 チャネル活性を大きく増大させることから[4]、NCS-1 K0 マウスでは Kv4 チャネル活性が低下している可能性がある。

#### 4.2 NCS-1 および GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor) による痛み緩和への寄与

神経障害による慢性疼痛の際には、神経細胞内で様々な変化が生じている。例えば興奮性シグナルが増強する一方で抑制性シグナルが減弱し、神経炎症が増大して痛覚過敏に陥る。これに対し、神経傷害により神経栄養因子 GDNF の発現が上昇し[8]、さらなる投与で強力な鎮痛効果をもたらすことが報告されている[9]。研究代表者らはこれまでに NCS-1 が神経障害の際に発現が上昇すること、そのメカニズムとして NCS-1 が GDNF の下流に存在するためである可能性を見出している[10]。しかし、GDNF、NCS-1、鎮痛作用との関連については不明である。研究代表者らは、神経障害→GDNF 発現上昇→NCS-1 発現上昇→鎮痛作用という痛みに対する新規生体防御機構の存在を仮説として持っている。今後、これらのシグナルの存在を明らかにすることは、NCS-1 および関連タンパク質がいまだ十分でない神経性疼痛治療薬の標的になる得る可能性を示唆している。

#### 5. 文献

1. Nakamura, T.Y., et al., Modulation of Kv4 channels, key components of rat ventricular transient outward  $K^+$  current, by PKC. *Am J Physiol*, 1997. **273**(4 Pt 2): p. H1775-86.
2. Phuket, T.R. and M. Covarrubias, Kv4 Channels Underlie the Subthreshold-Operating A-type  $K^+$ -current in Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neurons. *Front Mol Neurosci*, 2009. **2**: p. 3.
3. Chien, L.Y., et al., Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci*, 2007. **27**(37): p. 9855-65.
4. Nakamura, T.Y., et al., A role for frequenin, a  $Ca^{2+}$ -binding protein, as a regulator of Kv4  $K^+$ -currents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(22): p. 12808-13.
5. Nakamura, T.Y., et al., Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing  $Ca^{2+}$  signals. *Circ Res*, 2011. **109**(5): p. 512-23.
6. Kiguchi, N., et al., Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*, 2015. **156**(4): p. 684-693.
7. Saika, F., et al., Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 925.
8. Dong, Z.Q., et al., Changes of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor in dorsal root ganglions and spinal dorsal horn during electroacupuncture treatment in neuropathic pain rats. *Neurosci Lett*, 2005. **376**(2): p. 143-8.
9. Boucher, T.J., et al., Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*, 2000. **290**(5489): p. 124-7.
10. Nakamura, T.Y., et al., Novel role of neuronal  $Ca^{2+}$  sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *J Cell Biol*, 2006. **172**(7): p. 1081-91.