

# K<sup>+</sup>チャネル制御因子 NCS-1 の神経障害時における痛み緩和への役割と 関連シグナルの解明

西谷 友重<sup>1</sup>, 木口 倫一<sup>2</sup>, 納富 拓也<sup>1</sup>, 陳 以珊<sup>1</sup>, 安田 純平<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 和歌山県立医科大学医学部, <sup>2</sup> 和歌山県立医科大学薬学部

## 概要

【研究の目的】「痛み」は生物にとって防衛機構であるが、重度の痛みは苦痛であり、その克服は極めて重要である。痛み受容の機構については、TRP や電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルなど多くのイオンチャネルが関与している。一方、生体内には痛み緩和経路も存在しており、I<sub>SA</sub> 電流を構成する電位依存性 Kv4 K<sup>+</sup>チャネルはその一つである。実際、Kv4 チャネルを減少させると、痛み刺激に過敏になることが報告されている。申請者らは以前、Kv4 チャネルの制御因子として Ca<sup>2+</sup>センサー-NCS-1 (Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1)を見出した。NCS-1は脳において Kv4 チャネルと結合・共局在し、Kv4 チャネル電流を増加させる。しかし、NCS-1 が健常時および神経障害時において、Kv4 チャネル電流を介して痛み緩和に寄与するのは全く不明である。

本研究の目的は、NCS-1 が健常時および神経障害時に痛み緩和に寄与するのか、痛みの種類によって作用に差はあるか等を明らかにすることである。

【方法および結果】まずマウス脊髄後根神経節(DRG)における Kv4.3 および NCS-1 の発現を免疫蛍光法により確認したところ、両タンパク質は共に高発現し、共局在している細胞も認められた。また、NCS-1 の欠損(KO)マウスを用いて痛み刺激に関する感受性を野生型(WT)マウスと較べたところ、オス・メス両方において 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。

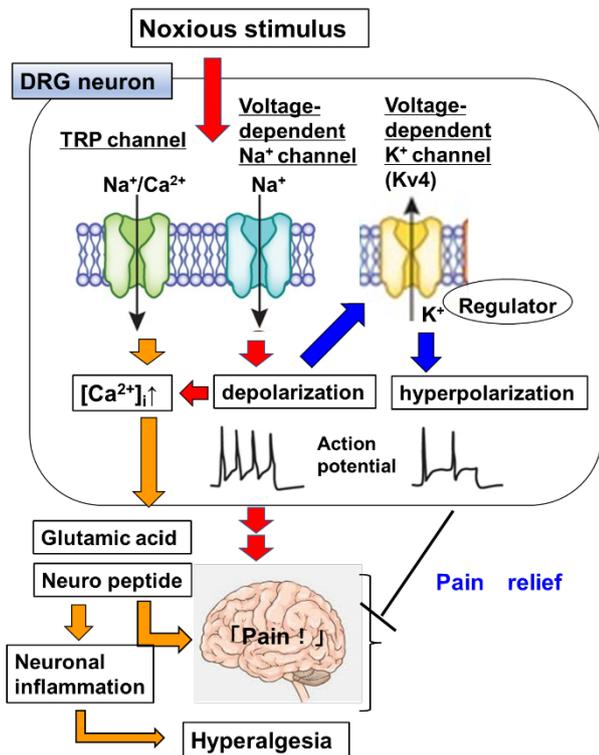
一方、熱刺激に関しては WT と KO で感受性の差は認められなかった。現在、神経障害時の痛みに対しても NCS-1 に鎮痛効果があるか確認するため、坐骨神経部分結紮による神経障害性疼痛モデルマウスを作製し、WT と KO で感受性が異なるか検討中である。また、NCS-1 は脳神経系に高発現していることから、部位特異的 KO マウスを作製するため、NCS-1 の flox マウスを Crispr/Cas9 システムにより作製した。

【考察】上記の結果より、NCS-1は痛み緩和に寄与していることが明らかとなった。さらに、NCS-1 の flox マウスと Nav1.8 Cre マウスと掛け合わせて、侵害受容細胞特異的に NCS-1 を KO したマウスを作製して、同様の効果を確認する予定である。

## 1. 研究目的

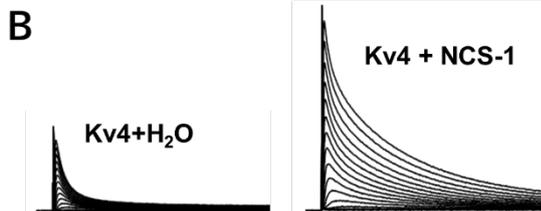
「痛み」は生物にとって防衛機構であるが、重度の痛みはだれにとっても苦痛であり、その克服は極めて重要である。痛み受容の機構については、TRP や電位依存性 Na<sup>+</sup>チャネルなど多くのイオンチャネルが関与している。一方、生体内には痛み緩和経路も存在しており、I<sub>SA</sub> 電流を構成する電

位依存性 Kv4 K<sup>+</sup>チャネルはその一つである (Fig. 1)。実際、Kv4 チャネルをノックダウンすると、痛みへの感受性が増加することが報告されている<sup>[1]</sup>。申請者らは以前、Kv4 チャネルの制御因子として Ca<sup>2+</sup>センサー-NCS-1 (Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1)を見出したが<sup>(2)</sup>, Fig. 2), NCS-1 の痛み緩和への寄与については不明である。

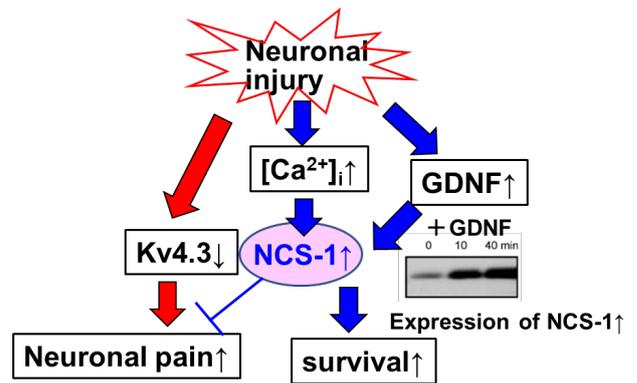


**Fig. 1** Main pathway of pain perception. Sensory neurons receive noxious stimuli via activation of voltage-dependent Na<sup>+</sup> channels and TRP channels, resulting in membrane depolarization. This induces increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> level that triggers release of glutamic acid, and then brain feels “painful”. If neuronal inflammation occurs, hyperalgesia may occur. On the other hand, there is a pain relief pathway in the living body. Membrane depolarization activates voltage-dependent K<sup>+</sup> channel Kv4 (molecular component of I<sub>SA</sub> current) and this results in membrane hyperpolarization, and relief pain.

**A** **NCS-1**  
(Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1/Frequenin)



**Fig. 2** Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor NCS-1 interacts with Kv4 channels in mouse brain, and increases Kv4 current.  
A: The structure of NCS-1, which is an EF-hand Ca<sup>2+</sup>-binding protein  
B: Kv4 current with or without NCS-1. NCS-1 increases current amplitude and slows inactivation kinetics.  
(B is cited from “Nakamura TY et al PNAS 2001”)



**Fig. 3** Possible mechanism of novel pain relief mediated by NCS-1.

Neuronal injury decreases the expression of Kv4.3 channels that increases neuronal pain. However, injury may increase the expression level or activity of NCS-1 via increasing intracellular Ca<sup>2+</sup> levels. This may be able to relieve pain. It is known that neuronal injury increases neurotrophic factor GDNF, and we have previously reported that GDNF increases NCS-1. GDNF is known to a powerful pain relief factor. Thus, NCS-1 can also be a pain relief factor.

私達は以前、NCS-1 が神経障害時に発現上昇することを見出している<sup>[3]</sup>。しかし、NCS-1 が健常時および神経障害時に、痛み緩和に寄与するのか、またその場合、痛みの種類によって作用に差はあるかは全く不明である。

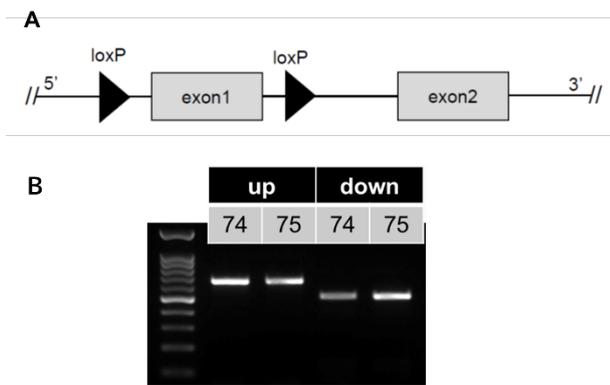
一方、神経障害により神経栄養因子 GDNF の発現が上昇し強力な鎮痛効果をもたらすが<sup>[4]</sup>、申請者らはこれまでにラット脳において、NCS-1 は GDNF の下流に存在することを見出している<sup>[3]</sup>。これらの知見は、痛み緩和シグナルに関しても、神経障害→GDNF 発現上昇→NCS-1 発現上昇→鎮痛作用という新規シグナルの存在の可能性を示唆している(**Fig. 3**)。しかし、GDNF, NCS-1, 鎮痛作用との相互作用、また他の関連因子については全く不明である。

そこで、本研究では K<sup>+</sup>チャンネル制御因子 NCS-1 の神経障害時における痛み緩和への役割と関連シグナルの解明を目的とした。

**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。



**Fig. 4** Creation of NCS-1 Flox mouse

A: We created NCS-1-Flox knock-in mice by combining genome editing using the Crispr/Cas9 system with synthetic oligos containing loxP sites in the 5' and 3' sides of Exon 1, as well as in Intron 1 and Intron 2 of the NCS1 gene (NM\_019681.3).

B: We have obtained homozygous mice with loxP sites inserted in both upstream and downstream regions.

### 2. 1. 1 NCS-1 の全身 KO マウス

NCS-1を全身で欠損した  $Ncs1^{-/-}$ マウス(C57BL/6-NCR) (承認番号:1032)は以前の報告<sup>[5]</sup>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  $Ncs1^{+/+}$ マウスを用いた。すべてのマウスは、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. 1. 2 NCS-1-Flox mouse の作製

NCS1 遺伝子(NM\_019681.3)の Exon 1 の 5' 側と 3' 側の Intron 1 および Intron 2 に、Crispr/Cas9 system によるゲノム切断と loxP サイトを含む合成オリゴを組み合わせることにより NCS-1-Flox ノックインマウスを作製した (Fig. 4)。

2 つの LoxP サイトは、NCS-1 の Exon 1 の上流および下流領域に挿入するようデザインした。まず 1 つの LoxP サイトを持つマウスを確立した後、それをバックグラウンドに、もう一つの LoxP サイトを挿入した。かけ合わせにより、現在、上流下流両領域に LoxP サイトが挿入されたホモマウスが得られている。

### 2. 2 神経障害性疼痛モデルの作製

マウスは以前の報告 (Seltzer et al., 1990; Kiguchi et al., 2018)に従って神経障害性疼痛モデルとして部分坐骨神経結紮 (PSL)を行った。具体的には、イソフルラン麻酔下で、各マウスの左側の坐骨神経 (SCN) を中腿部で小さな皮膚切開を通じて露出させた (障害側)。SCN の厚さのおよそ 3 分の 1 の部分を絹糸縫合糸 (No. 1; ナツメ製作所, 東京, 日

本)でしっかりと結紮し、その後、筋肉および皮膚層を縫合して閉じ、手術部位をポビドンヨードで消毒した。未処置の右側肢をコントロール側とした。

### 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 ヶ月齢の NCS-1 KO マウスおよび WT マウス (雄および雌) 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 5 x 5 mm 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 2.0 g) 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<sup>[6]</sup>に従い Hargreaves テストを行った。マウス (生後 7 ヶ月齢の WT および KO の雌マウス) 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れ、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 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  $\mu$ 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 K<sup>+</sup>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, 一晩インキュベートした後, 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。一方, Kv4.3 と NCS-1 の共染色を行った際は, 抗 Kv4.3 K<sup>+</sup>チャネル抗体 (Abcam ab252538, マウス由来)および抗 NCS-1 抗体 (Gifted from Andreas Jeromin, ウサギ由来)で4°C, 一晩インキュベートした後, 蛍光標識二次蛍光体として Alexa Fluor488 conjugated goat anti-rabbit antibody (Abcam, Cambridge, UK)および Alexa Fluor568-conjugated goat anti-mouse 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。

## 2.6 リアルタイム定量 RT-PCR 法

神経障害性疼痛モデルマウスおよびコントロールマウスよりDRGを採取し, TRIzol 試薬 (Invitrogen)を用いてトータルRNAを抽出した。QuantiTect Reverse Transcription キット (Qiagen)を用いて cDNA に逆転写した後, リアルタイム定量 PCR は, メーカーのプロトコルに従って実施した。Kv4.3, NCS-1 および GAPDH のプライマーは Fasmac から購入し, 反応は AriaMx リアルタイム PCR システム (アジレントテクノロジー)で行い, データを収集した。定量化された mRNA は GAPDH mRNA レベルに正規化し, コントロールに対する相対値として表現した。

## 2.7 マウス DRG 神経細胞の急性単離

マウスより神経節を摘出し, DMEM/F12 培養液を持たしたデッシュに入れ, 実体顕微鏡で観察しながら, 神経線維束を神経節に近い部位で切除して除いた。パストールピペットを用いて神経節を15 mL 遠心チューブ1本に移し, チューブ中の組織をDMEM/F12で2回リンスした後, 2 mg/mL コラゲナーゼ溶液中でインキュベーションした [振とう恒温槽中で37°C, 120分]。コラゲナーゼ処理後の神経節を遠心 (180 × g, 3分)し, 上清を捨て, Hanks 液で2回リンス (180 × g, 3分)した後, 2.5 mg/mL トリプシン溶

液 (10 mg/mL トリプシン 0.5 mL + Hanks 液 1.5 mL) 中でインキュベーションした [37°C, 15分]。

トリプシンインヒビター (50 µg/mL) 150 µL を加え, バーナー等で先端を細くしたパストールピペットを用いて, 20~30 回程度ゆっくりピペッティングした。回収した神経を血清入りの培養液 (DMEM/F12) で2回リンス, 遠心処理 (180 × g, 3分)した後, 各チューブあたり2 mL のDMEM/F12 にサスペンドして実験に供した。

## 2.8 ホールセルパッチクランプ法による電流測定

ナニオンテクノロジーのオートパッチクランプシステム Port-a-Patch mini を用いて, 室温 (20 ± 2°C) の溶液にて, ホールセルパッチクランプ法による電流測定を行った。細胞のキャパシタンスとピペットの直列抵抗の両方を補正した。ホールセル電流は, 細胞サイズのばらつきを考慮し, 電流密度 (pA/pF) で表した。

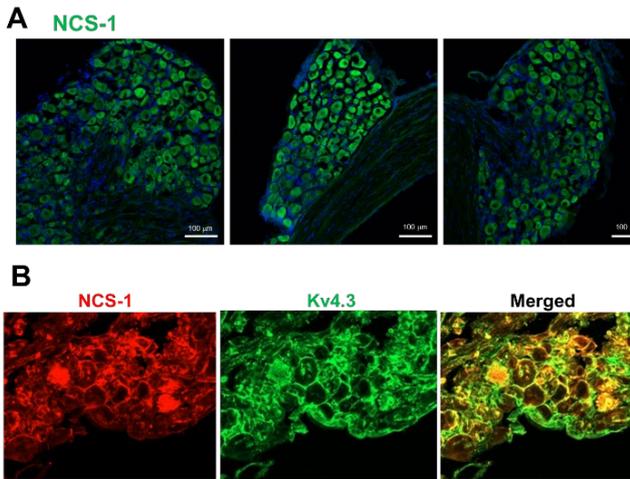
## 2.9 統計学的解析

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, 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。さらに, 共染色の結果, NCS-1 と Kv4.3 チャネルは侵害感覚に関与する小型~中型神経形質膜および小胞体 (ER) において, 共局在していることが明らかとなった (Fig. 5)。



**Fig. 5** Both NCS-1 and Kv4.3 channels are expressed in mouse DRG and Co-localized each other.  
 A: Expression pattern of NCS-1 in mouse DRG. NCS-1 is expressed in almost all DRG neurons.  
 B: Colocalization of NCS-1 and Kv4.3 in mouse DRG neurons

### 3. 2 生理的条件下での痛み感受における NCS-1 の役割について

#### 3. 2. 1 NCS-1 KO マウスにおける機械刺激への感受性の検討

NCS-1 が痛み感受の緩和に関わっているか確認するため、von Frey test により 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、雄の KO マウスにおいて機械刺激に対する感受性が

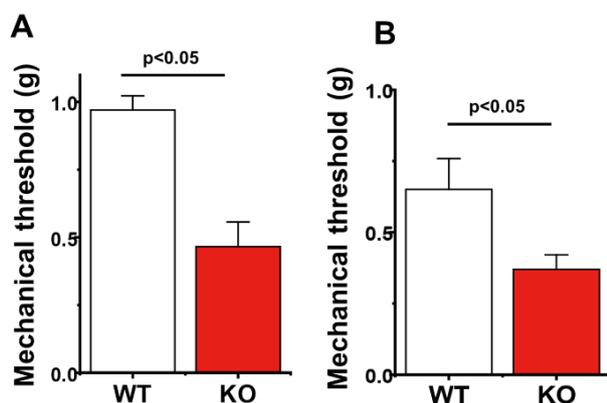
増加していることがわかった。すなわち、NCS-1 は痛覚感受の緩和に寄与している可能性がある。一方、近年、痛み刺激への感受性が雌雄差で異なるという知見が報告されている。そこで、雌マウスにおける NCS-1 欠損の影響を検討した結果、雌の KO マウスでも機械刺激に対する感受性が増加していることが明らかとなった (Fig. 6)。以上の結果は、NCS-1 が雌雄共に痛み軽減に寄与していることを示す。

#### 3. 2. 2 NCS-1 KO マウスにおける熱刺激への感受性の検討

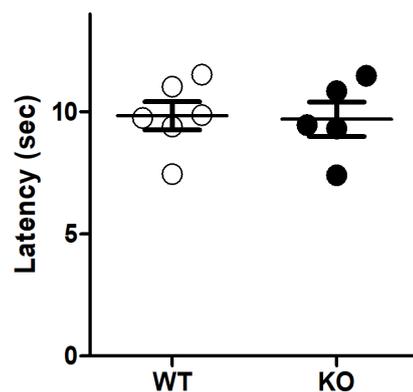
次に、NCS-1 KO マウスの熱刺激に対する感受性を、Hargreaves テストを用いて同月齢の WT マウスと比較した。その結果、熱刺激に対しては WT と KO マウスで感受性の有意な差は認められなかった (Fig. 7)。

#### 3. 3 神経障害による、NCS-1 および Kv4.3 の発現量の変化の検討

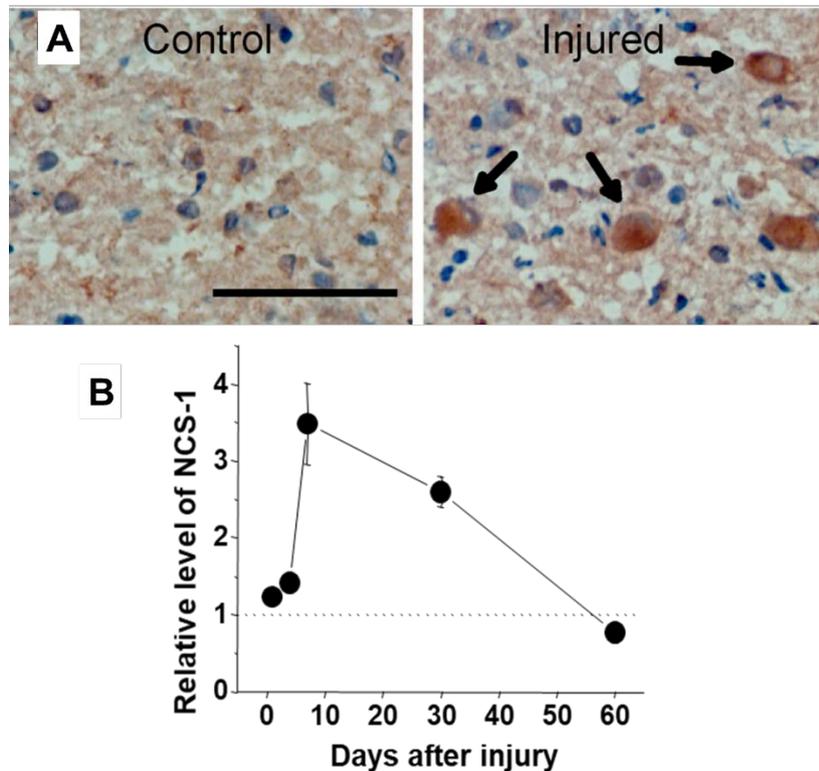
上述のように、神経障害により、NCS-1 の発現量が増加すること<sup>[9]</sup>および Kv4.3 が減少することが報告されている<sup>[1]</sup>。これが DRG でも生じるか確認するため、神経障害性疼痛モデルとして部分坐骨神経結紮 (PSL) を行い、1 週間後の DRG における NCS-1 および Kv4.3 の発現量をリアルタイム定量 RT-PCR 法を用いて測定した。その結果、報告通り Kv4.3 は発現が低下したものの、NCS-1 の発現量に変化は認められなかった (Fig. 8)。



**Fig. 6** NCS-1 KO mice exhibited more sensitive to mechanical pain.  
 A: female mice (n = 6), B: male mice (n = 6)  
 The 50% paw withdrawal threshold was assessed by the up-down method using von Frey test. P < 0.05



**Fig. 7** WT and NCS-1 KO mice have similar sensitivity to thermal pain.  
 Thermal allodynia were evaluated by the Hargreaves test.



**Fig. 8** NCS-1 is up-regulated in the DMV neurons after *in vivo* axotomy.

A: Staining pattern 1 wk after *in vivo* axotomy. The amount of NCS-1 protein increased in the DMV neurons ipsilateral to axotomy (injured side) when compared with control neurons contralateral to axotomy.

B: Time course of the expression levels of NCS-1 in injured DMV neurons relative to uninjured DMV neurons. (This figure is cited from “Nakamura TY et al. JCB 2006”)

### 3. 4 DRG 神経細胞における電流測定

私たちの仮説が正しければ、NCS-1 KO マウスにおいて、Kv4 チャネル電流 (A-タイプ電流) が低下している可能性が高い。そこで、WT マウスより DRG 神経を急性単離してホールセルパッチクランプ法により全電流を測定した。マウス DRG からコラゲナーゼ処理により神経細胞を多く含む画分を回収した。まず、ヘルシーな神経細胞が得られたか確かめるため、全電流を測ったところ、電流は測定できた。今後は、A-タイプ電流以外の他の電流の阻害剤などを加え、A-タイプ電流のみを測定し、WT と KO マウスで較べる必要がある。

### 3. 5 NCS-1 の Flox マウスの作製

NCS-1 は脳、神経系のみならず様々な臓器に発現している。そこで痛み軽減に対する NCS-1 の寄与をより明確にするため、侵害受容性ニューロン特異的な NCS-1 KO マウスを作製する目的で NCS-1 の Flox マウスを作製した (Fig. 4)。今後は、侵害受容性ニューロン特異的に発現

する Nav1.8—Cre リコンビナーゼマウスとのかけ合わせるにより、侵害受容性ニューロン特異的に NCS-1 を欠損したマウスを作製し、上記で認められた痛みに対し感受性が増加する確認する予定である。

### 4. 考察

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、Fig. 1 に示すように多くのイオンチャネル (TRP チャネル、電位依存性 Na<sup>+</sup> および Ca<sup>2+</sup> チャネルなど) が関与している。この中で、脱分極による活動電位の発生および細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度の上昇、引き続くグルタミン酸、神経ペプチドの放出が痛みの伝達、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 (Fig. 1)。したがって、これらの系のいずれかを抑制すれば痛みは緩和される。

一方、生体には内因性の痛み緩和系として電位依存性  $K^+$ チャネル電流(Aタイプ電流/ISA)が存在する。ISAは活動電位発火直後に活性化され、 $K^+$ 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(Fig. 1)。実際、ISAの分子実体として知られる  $Kv4$ チャネルが、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脊髄後根神経節(DRG)に高発現しており<sup>[7]</sup>、 $Kv4.3$ 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<sup>[1]</sup>。

私達はこれまでに、イオンの通り道を形成する  $Kv4$ チャネルの分子内制御因子として  $Ca^{2+}$ センサーNCS-1を同定してきた<sup>[2]</sup>。NCS-1は、カルモジュリンに代表される小さなEFハンド  $Ca^{2+}$ 結合タンパク質であり(Fig. 2A)、細胞内  $Ca^{2+}$ 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(Fig. 2B)。

以上の知見を合わせると、DRGにおいてもNCS-1が  $Kv4$ チャネルを活性化して、痛み抑制に働く可能性がある。そこで今回、NCS-1と  $Kv4$ チャネルのDRGにおける発現パターンを確認し、NCS-1 KOマウスを用いて様々な種類の刺激による痛みへの感受性を検討した。さらに、生理的条件下のみならず、病態的条件下である神経障害時においても検討を行った。

#### 4. 1 NCS-1と $Kv4$ チャネルのDRG神経における発現パターン

本研究により、NCS-1は  $Kv4.3$ 同様、マウスのDRGに高発現し、侵害感覚に関与する小型～中型神経において互いに共局在していることが分かった(Fig. 5)。このことは、NCS-1がDRG神経においても  $Kv4$ チャネルを制御し、痛み緩和にも寄与し得ることを示唆している。今後は、 $Kv4.3$ およびNCS-1発現細胞の大きさ毎の細胞数(ヒストグラム)を作製し、 $Kv4.3$ とNCS-1発現細胞の特徴を確認する予定である。

#### 4. 2 DRG神経におけるNCS-1の生理的条件下での痛み受容に対する役割と下流のメカニズム

NCS-1のKOマウスは、雌雄共に機械刺激に対し野生型(WT)マウスよりも過敏であることが分かった。私達は以

前の研究で、機械刺激による痛覚過敏のメカニズムが雌雄で異なることを報告した<sup>[8]</sup>。一般に、雌は雄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で比較したためか、雌が雄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KOマウスの方が痛み刺激に関し感受性が高く、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<sup>[7]</sup>、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<sup>[1]</sup>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<sup>[2]</sup>、NCS-1 KO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。今後は、NCS-1 KOマウスにおける  $Kv4$ チャネルのサイズ毎の発現パターン(ヒストグラムで解析)、発現量および細胞内局在を比較する必要がある。さらに、KOマウスDRGにおける  $Kv4$ チャネル活性、細胞の興奮性を確認するため活動電位や細胞内  $Ca^{2+}$ 動態なども測定する必要がある。これらがKOマウスで変化していれば、( $Kv4$ 電流が小さくなり、活動電位発火率および細胞内  $Ca^{2+}$ シグナルが増加していれば)、NCS-1が  $Kv4$ チャネル活性化を介して痛み抑制に寄与していると考えられる。

今回、KOマウスにおける  $Kv4$ チャネル電流を測定するため、DRG神経を単離して、ホールセル電流を測定した。電流はリークもなく測れていたため、細胞そのものはうまく採れていたと思われる。今後は、さらに培養するなど、よりヘルシーな条件を検討し、 $Kv4$ 以外のチャネル阻害剤存在下でAタイプ電流を測定し、WTとKOで比較したい。

一方、NCS-1のKOマウスは、熱刺激に対しては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(Fig. 7)。これらの現象から、機械刺激および熱刺激に対する痛み緩和経路はそれぞれ異なる可能性が示唆された。

#### 4. 3 神経障害の際の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<sup>[9]</sup>、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<sup>[4]</sup>。私達はこれまでに 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<sup>[3]</sup>。しかし、GDNF、NCS-1、鎮痛作用との関連については不明である。

本研究では、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提唱している。今回、DRG において神経障害により Kv4.3 および NCS-1 の発現量が変化するか確認するため、神経障害性疼痛モデルを作製し検討を行った。その結果、Kv4.3 チャネル遺伝子の発現量は以前の報告通り低下していたが、NCS-1 の発現量は変化していなかった(データ示さず)。この結果は、私達の以前行った研究の中で、迷走神経の切断により NCS-1 発現細胞の数が迷走神経核で1週間後に大きく上昇したという結果 (Fig. 8) とは一致しない。NCS-1 発現細胞は、神経切断後徐々に増え、1 週間後をピークに徐々に減少していった。これらの相違に対して、いくつか理由が考えられる。①まず障害の程度として、以前は神経を切断したが、今回は結紮のみであり、程度が低いこと。②以前は免疫染色における NCS-1 発現細胞の数を比較したが、今回は mRNA を比較しており、NCS-1 発現細胞以外のファクターも含まれているため、差が生じにくい。③またタンパク質と mRNA では発現量変化のタイムコースが異なる可能性がある。④そもそも、迷走神経と坐骨神経で障害を起こした部位が異なる、などである。

## 5. 今後の課題

### 5.1 侵害受容細胞特異的 NCS-1 KO マウスを用いた解析

NCS-1 Flox mouse と侵害受容性ニューロン特異的に発現する Nav1.8—Cre リコンビナーゼマウスとのかけ合わせるにより、侵害受容性ニューロン特異的に NCS-1 を欠損したマウスを作製する。これらマウスを用いて、全身 KO マウスで認められた痛み緩和や遺伝子・タンパク質発現に関し、各種フェノタイプが再現できるが確認する。これらが明らかになれば、NCS-1 が痛み緩和の新規標的となる。神経障害性

疼痛は日本では数十万規模の患者数が推定されており、創薬基盤となり得る本研究の社会的ニーズは高い。

### 5.2 「神経障害→GDNF 発現上昇→NCS-1 発現上昇→鎮痛作用」という新規痛み緩和経路の同定

GDNF を脊髄くも膜下投与した際、神経障害に対し強力な鎮痛作用を示すことが報告されていることから、この現象を WT で確認後、KO マウスにおいて GDNF による鎮痛効果が消失するか、個体レベルで確認する。

### 5.3 他の Kv4 チャネル制御因子との関連

Kv4 チャネル制御因子として、NCS-1 以外に dipeptidyl peptidase-like proteins (DPPLs) や KChIPs などが報告されている<sup>[10]</sup>、<sup>[11]</sup>。それらがどのような関係性をもって Kv4 を調節しているかに関しては未だ不明であり、私達が解明すべき課題と考える。今回、神経障害の際、発現が変化する Kv4 制御因子の中で、どの因子がどのような条件下で Kv4 を制御するのかを明らかにできれば、痛み研究領域のみならず、イオンチャネル研究の科学的新展開に貢献できる。

## 6. 文献

- Chien LY, Cheng JK, Chu D, Cheng CF, Tsaur ML. Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity. *J Neurosci.* 2007;27(37):9855-65. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0604-07.2007. PubMed PMID: 17855600; PubMed Central PMCID: PMC6672648.
- Nakamura TY, Pountney DJ, Ozaita A, Nandi S, Ueda S, Rudy B, et al. A role for frequenin, a Ca<sup>2+</sup>-binding protein, as a regulator of Kv4 K<sup>+</sup>-currents. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2001;98(22):12808-13. PubMed PMID: 11606724.
- Nakamura TY, Jeromin A, Smith G, Kurushima H, Koga H, Nakabeppu Y, et al. Novel role of neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons. *The Journal of cell biology.* 2006;172(7):1081-91. Epub 2006/03/22. doi: 10.1083/jcb.200508156. PubMed PMID: 16549499; PubMed Central PMCID: PMC2063765.

4. Boucher TJ, Okuse K, Bennett DL, Munson JB, Wood JN, McMahon SB. Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*. 2000;290(5489):124-7. doi: 10.1126/science.290.5489.124. PubMed PMID: 11021795.
5. Nakamura TY, Jeromin A, Mikoshiba K, Wakabayashi S. Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca<sup>2+</sup> signals. *Circulation research*. 2011;109(5):512-23. Epub 2011/07/09. doi: CIRCRESAHA.111.248864 [pii] 10.1161/CIRCRESAHA.111.248864. PubMed PMID: 21737792.
6. Kiguchi N, Kobayashi Y, Saika F, Sakaguchi H, Maeda T, Kishioka S. Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain. *Pain*. 2015;156(4):684-93. doi: 10.1097/j.pain.000000000000097. PubMed PMID: 25630024.
7. Phuket TR, Covarrubias M. Kv4 Channels Underlie the Subthreshold-Operating A-type K-current in Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neurons. *Front Mol Neurosci*. 2009;2:3. Epub 20090707. doi: 10.3389/neuro.02.003.2009. PubMed PMID: 19668710; PubMed Central PMCID: PMCPMC2724030.
8. Saika F, Matsuzaki S, Kobayashi D, Ideguchi Y, Nakamura TY, Kishioka S, 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;11:925. Epub 2020/07/09. doi: 10.3389/fphar.2020.00925. PubMed PMID: 32636748; PubMed Central PMCID: PMCPMC7318895.
9. Dong ZQ, Ma F, Xie H, Wang YQ, Wu GC. 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. *Neuroscience letters*. 2005;376(2):143-8. Epub 20050118. doi: 10.1016/j.neulet.2004.11.044. PubMed PMID: 15698937.
10. An WF, Bowlby MR, Betty M, Cao J, Ling HP, Mendoza G, et al. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. *Nature*. 2000;403(6769):553-6. doi: 10.1038/35000592. PubMed PMID: 10676964.
11. Maffie J, Rudy B. Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K<sup>+</sup> currents in neurons. *The Journal of physiology*. 2008;586(23):5609-23. Epub 20081009. doi: 10.1113/jphysiol.2008.161620. PubMed PMID: 18845608; PubMed Central PMCID: PMCPMC2655395.

## Role of K<sup>+</sup> Channel Regulator NCS-1 in Pain Relief during Neuropathy and Related Signals during Neuropathy

Tomoe Nishitani<sup>1</sup>, Norikazu Kiguchi<sup>2</sup>, Takuya Notomi<sup>1</sup>, Chen I-Shan<sup>1</sup>, Jumpei Yasuda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Wakayama Medical University,

<sup>2</sup>Department of Physiological Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University

### Summary

"Pain" serves as a defense mechanism for living organisms, but severe pain is a source of suffering, making its alleviation extremely important. Many ion channels are involved in the mechanisms of pain perception. On the other hand, pain relief pathways also exist within the body, with the voltage-dependent Kv4 K<sup>+</sup> channels, which constitute the I<sub>SA</sub> current. In fact, it has been reported that reducing Kv4 channels results in hypersensitivity to painful stimuli. We previously identified NCS-1 (Neuronal Ca<sup>2+</sup> sensor-1) as a regulatory subunit of Kv4 channels. NCS-1 binds to and co-localizes with Kv4 channels in the brain, increasing Kv4 channel currents. However, it is unknown whether NCS-1 contributes to pain relief through Kv4 channel currents under normal and neuropathic conditions. The aim of this study was to elucidate whether NCS-1 contributes to pain relief under normal and neuropathic conditions and to determine whether its effects vary depending on the type of pain.

Immunofluorescence analysis confirmed the expression of Kv4.3 and NCS-1 in the dorsal root ganglion (DRG) of mouse spinal cords, revealing high expression and co-localization of both proteins. Using NCS-1 knockout (KO) mice, we compared pain sensitivity to that of wild-type (WT) mice. The results showed that KO mice of both sexes exhibited increased sensitivity to mechanical stimuli compared to WT mice. However, no difference was observed in sensitivity to thermal stimuli. Currently, we are investigating whether NCS-1 has an analgesic effect on neuropathic pain by creating a neuropathic pain model through partial sciatic nerve ligation. Additionally, due to the high expression of NCS-1 in the central nervous system, we created NCS-1 flox mice using the Crispr/Cas9 system to produce site-specific KO mice.

The above results indicate that NCS-1 contributes to pain relief. Furthermore, we plan to generate mice with nociceptive cell-specific KO of NCS-1 by crossing NCS-1 floxed mice with Nav1.8 Cre mice to confirm the same effect.