

後根神経節における電位依存性 Na⁺ チャネルの機能解析 ~痛覚伝達における役割~

技術センター 医学部等部門

医学科技術班 柿村 順一

KAKIMURA Jun-ichi : Functional roles of voltage gated Na⁺ channels in pain sensation.

1. はじめに

痛みは、私たちが健康を維持していく上で重要な生体内の警告信号である。過剰な痛み、慢性的な痛みは肉体的のみならず、精神的・心理的にも苦痛をもたらすものであり、それそのものが疾患であると言っても過言ではない。

近年、医療の現場では患者の Quality of life (QOL)が重視されるようになってきた。その一つとして、これまでは耐えるべきものとして軽視されてきた「痛み」を積極的にコントロールするべきであるという考え方が強くなってきている。実際、ペインクリニックといった痛みを取り除くことを専門的に行う診療科も一般的になりつつある。しかし、神経因性疼痛などの慢性痛の中には非ステロイド性鎮痛薬(NSAIDs)など従来用いられてきた鎮痛薬に抵抗性を示すものも少なくない。このような難治性疼痛は、その発症機序が未だ十分には解明されておらず、患者はその長期にわたる痛みを耐えるしかないのが現状である。

このような「痛み」に苦しんでいる患者の数は膨大である。さらに、高齢化に伴う今後の患者数の増加は十分予想されうることである。患者が苦痛から解放された質の高い生活を送るためには、原因の究明および治療薬の開発は急務である。

大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 病態探求医科学講座 神経生理学では痛覚伝達について電位依存性ナトリウムチャンネルに着目し、電気生理学的手法を用いて研究を遂行している。

本稿では、電気生理学的手法の技術的な事項、およびこれまでに得られた知見について概説したい。

2. 痛みとは

痛みは外部からの侵害的要因や体内の病的状態に対する警告反応としての役割を持ち、免疫系と並ぶ重要な生体防御機構である。しかし、痛みは「不快な感覚性・情動性の体験であり、それには組織損傷を伴うものと、そのような損傷があるように表現されるものがある」(国際疼痛学会による)と定義されるように、非常に複雑なものであり、それ自身が身体に有害な病態をもたらすという二面性を持つ。

皮膚感覚を受容する一次知覚神経はその細胞体を後根神経節(dorsal root ganglion, 以下 DRG)に持ち、末梢・中枢の両側に軸索を伸ばす、感覚情報の伝達に最初にかかわっている神経である。一次知覚神経は伝導速度、軸索線維の太さおよび髄鞘の有無などにより、A β 線維、A δ 線維、C線維の三種類に分類され、これらはそれぞれに異なる感覚を伝えている。

通常、触、圧覚などの非侵害性刺激は有髄の太い A β 線維を介して伝達されるのに対し、痛みなどの侵害性の刺激は有髄の細い A δ 線維と無髄の細い C線維を介して伝達される。さらに A δ 線維は鋭く識別性の高い一次痛を、C線維は焼け付くような、鈍く持続的な二次痛を伝達すると考えられており、慢性痛など臨床的に問題になる痛み

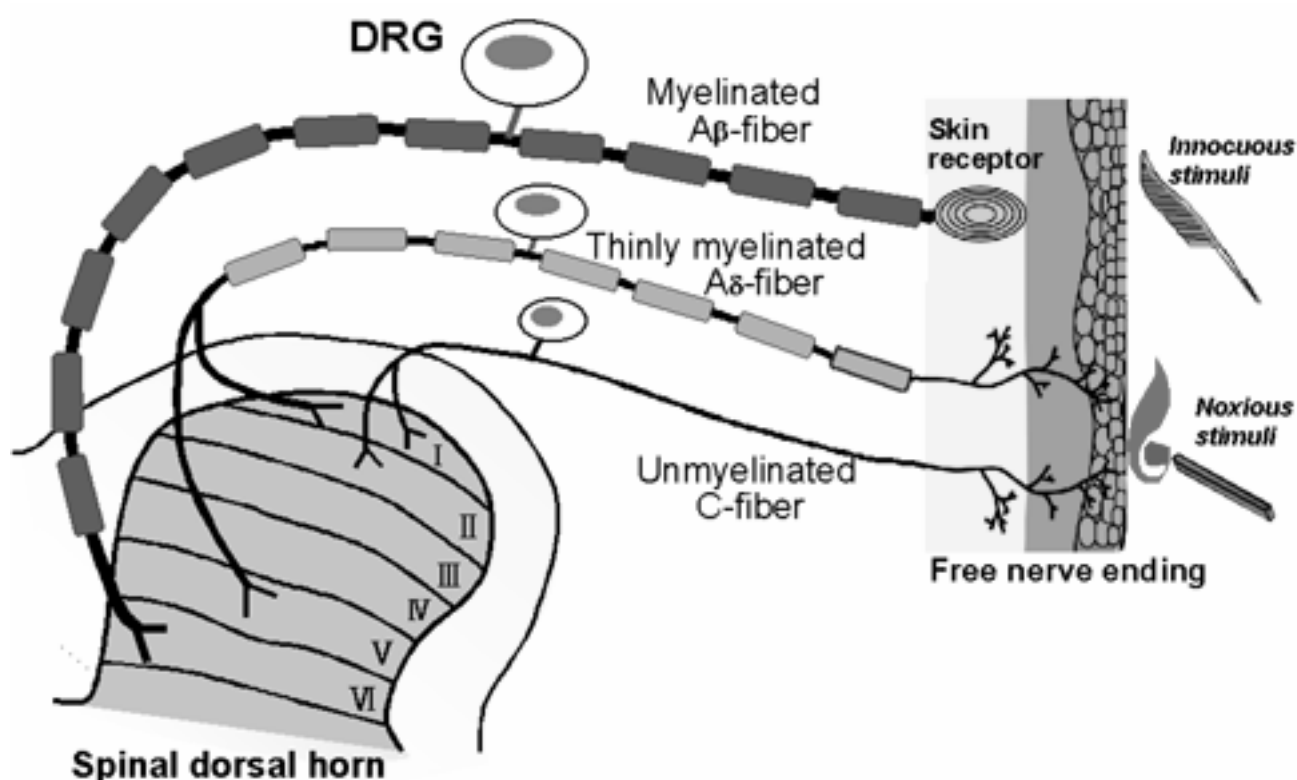


図1. 一次知覚神経による皮膚感覚伝達の模式図。一次知覚神経によって受容された皮膚感覚は脊髄後角から入力し、シナプスでの神経伝達物質の遊離を介して二次知覚神経に伝達されたあと、最終的に大脳皮質に達して、触覚、痛覚として認識される。

重要であるのはC線維である^{1),2)} (図1)。

3. 電位依存性ナトリウムチャンネルと痛み

神経細胞の情報伝達の基本である活動電位は細胞膜のイオンチャンネルを介したイオンの移動により生じる。電位依存性ナトリウムチャンネル(以下、Naチャンネル)はその名のとおり、電位に依存して開口し、Naイオンを選択的に透過させるイオンチャンネルである。神経細胞、骨格筋細胞、心筋細胞といった興奮性細胞に発現し、電位依存性カリウムチャンネルと共に活動電位の発生および伝播を担う膜機能分子である。

活動様式の側面から見ると、Naチャンネルには活性化ゲート(mゲート)と不活性化ゲート(hゲート)という二つのゲートが存在し、両者がそれぞれ膜電位に依存して開閉することから、Na

イオンの透過、すなわちNa電流の発生は両者の開口バランスによって決定される(図2A)。さらに、脱分極により開口(活性化)したチャンネルは再び活性化できる状態に戻るまでに不活性化という状態を経る一連のサイクルを取ると考えられている(図2B)。

静止膜電位ではNaチャンネルはmゲートが閉じ、hゲートが開いた待機状態(resting state)にある。この状態ではmゲートが閉じているためNaイオンは通過しない。膜が脱分極するとmゲートが開きNaイオンが細胞内に流入する。この大量のNaイオンの流入により活動電位が発生する。これに続き、hゲートが閉じるため、Naイオンの流入が停止する。その後、電位依存性カリウムチャンネルの活性化に伴い、膜電位が再び静止膜電位に戻されるとmゲートも閉じる。この時には再び膜が

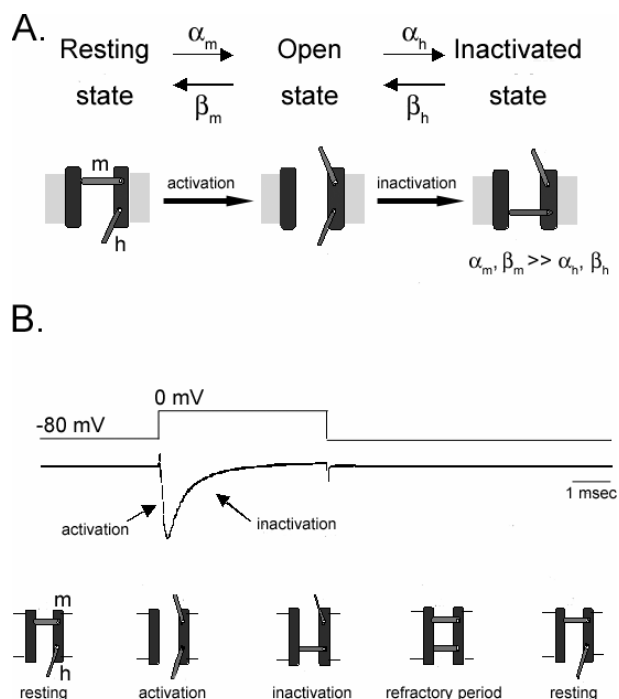


図 2. Na チャネルの基本的活動様式 A: ゲート開閉の基本的概念. B: Na 電流の時間経過と活性化および不活性化ゲートの関係

再分極してhゲートが開いてもmゲートが閉じているためNaイオンは透過できない。この状態は不応期 (refractory period) と呼ばれる。さらに時間が経過するとhゲートが再び開いて待機状態に戻り (再賦活; repriming), 新たな脱分極に対して反応が可能となる。個々のNaチャネルは以上を示した3つの状態 (活性化状態⇔不活性化状態⇔待機状態) の平衡状態にあり, すべてのチャネルが同じ状態をとるわけではないが, 脱分極により平衡が活性化状態に傾くことにより大量のNaチャネルが一度に開口し, 活動電位を発生させるほどの大きなNa電流が流れる^{3), 4)}。

構造的側面から見ると, Naチャネルはナトリウムイオンが通過するポアを形成し, チャネル機能のほとんどを担う α サブユニット (約 260 kDa) と補助的役割を果たす β サブユニットからなる。 α サブユニットにおいてはNav1.1 からNav1.9 まで

の9種類が同定されている (表 1)。これらはアミノ酸配列で50%以上の相同性を持ち, 唯一のサブファミリーからなる。しかしながら, 各サブタイプは組織, また発生時期に応じて異なる発現パターンを持ち, 性質や機能においても多様性を示す^{3), 5), 6)}。

これらNaチャネルを大まかに分類すると, ナノモルオーダーのフグ毒テトロドトキシン (TTX) によってブロックされ, 極めて早いゲート開閉機構を持つTTX感受性Naチャネルと, TTXに対する感受性が低いTTX非感受性Naチャネルに分けられる。これらの内, DRGにおいてTTX感受性NaチャネルではNav1.6, Nav1.7 が豊富に発現している。また, TTX非感受性NaチャネルであるNav1.8, Nav1.9 は小型侵害受容ニューロン (C線維を持つ) に主に発現し, 痛覚伝搬に関与していると考えられている^{7), 8), 9), 10)}。

Nav1.8 はそのノックアウトマウスを用いた研究により, 機械的侵害刺激, 熱侵害刺激, 炎症刺激に対する反応性が野生型に比べ鈍くなっていることが示され, 痛覚伝達機構における役割が直接明らかになされた¹⁰⁾。さらに, 炎症モデルラットにおいてNav1.8 mRNAの発現が増加すること, TTX非感受性Na電流が増加すること¹¹⁾などから, 炎症時の神経の異常興奮に関与することが強く示唆されている。

一方, Nav1.9 は神経因性疼痛モデルラットのDRGにおける発現が著しく減少していることが報告されている⁸⁾。Nav1.9はGDNFによりその発現が調節されていることから, このNav1.9の発現の減少は神経損傷による末梢からのGDNFの供給不足が原因であると予想される^{12), 13)}。実際, 神経因性疼痛モデルラットにGDNFを投与することによりNav1.9 mRNAの発現低下が抑制され, さらに疼痛行動が抑制されることが示されており¹⁴⁾, Nav1.9 が神経因性疼痛の発症に関与しているものと考えられる。

名前	遺伝子名	TTX 感受性	主な発現組織	DRG 局在	ゲート開閉
Nav1.1	SCN1A	有 (nM)	中枢, 末梢神経	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.2	SCN2A	有 (nM)	中枢神経	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.3	SCN3A	有 (nM)	中枢神経 (胎児期)	軸索切断後に発現	速い(数ミリ秒)
Nav1.4	SCN4A	有 (nM)	骨格筋	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.5	SCN5A	抵抗性 (μM)	心筋	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.6	SCN8A	有 (nM)	中枢, 末梢神経, グリア等	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.7	SCN9A	有 (nM)	末梢神経, シュワン細胞	+	速い(数ミリ秒)
Nav1.8	SCN10A	無	末梢神経	+	遅い(数十ミリ秒)
Nav1.9	SCN11A	無	末梢神経	+	著しく遅い(数百ミリ秒)

表 1. 電位依存性 Na チャネル α サブユニットの基本的性質

神経における情報伝搬の基本は活動電位の発生および伝搬であることから、感覚神経において Na チャネルの発現や活性を調節する物質が鎮痛薬として機能することが期待される。これまでの研究から Nav1.8, Nav1.9 は痛覚に関与する A δ , C 線維に特異的に発現し、炎症性疼痛や神経因性疼痛で見られる痛覚過敏や自発痛など異常な痛みの発症に関与することが考えられる。そこで、これら TTX 非感受性 Na チャネルのみに特異的に作用し、その発現や活性を調節する物質は副作用の無い効果的な鎮痛薬になる可能性があり、その開発が待ち望まれるところである。

4. パッチクランプ法

パッチクランプ法は細胞膜における単一もしくは複数個のイオンチャネル分子の活動を、それを通るイオン電流として記録する方法で、1976年に Neher と Sakmann によって開発された手法である¹⁵⁾。その原理は、細胞膜にガラス微小ピペット（パッチ電極またはパッチピペットと称す）をギガオーム ($10^9 \Omega$) 以上の高抵抗で密着（ギガシール）させ、その先端開口部の微小膜（パッチ膜）を電的に他の領域と隔離した状態で電位固定し、そこに含まれるイオンチャネルを通るイオン電流 (pA オーダー) を計測するというものである。

ギガシール法の確立といくつかのバリエーションの追加開発により、1980年以降、多くの細胞系に用いられるようになり、イオンチャネルの機能解析には欠くことのできない方法となっている。本研究では、ギガシールを形成した後パッチ膜に穴をあけるホールセル法¹⁶⁾による電位固定記録を行い、パッチ膜以外の全細胞膜を流れるイオン電流を測定した（図3）。

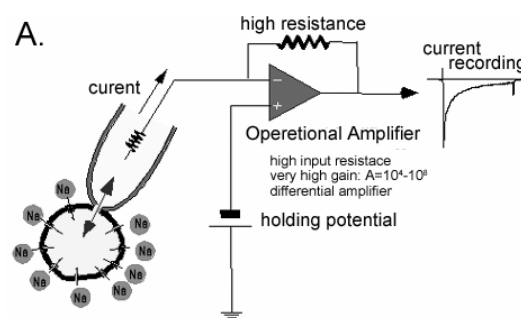


図 3. ホールセルパッチクランプ法。A：電位固定法の概念図。B：実験に使用している機器群。

5. Na_v1.9の電気生理学的性質の検討

本研究ではDRGに発現している各種Naチャンネルのうち、Na_v1.9に着目し、検討を進めていった。前述のとおり、DRGにはNa_v1.8, Na_v1.9と言った2種類のTTX非感受性Naチャンネルが発現している。Na_v1.9の電流を明確に記録し、解析するために、Na_v1.8-KOマウス¹⁰から培養DRG神経細胞を調整し、それらのうち、小型細胞（直径30 μm以下のもの）を用いて実験を行った。保持電位（V_h）を-80mVとし、200ミリ秒の脱分極パルス（V_t）を与え、Na電流を記録した。

TTXを含まない通常外液を用いた場合、数ミリ秒のカイネティクスを持つ速い内向き電流と共に持続性内向き電流が記録される（図4A）。この持続性内向き電流は200 nMのTTX存在下でも記録される（図4B）。この電流がNa_v1.9による電流であることが1999年にはじめて報告された¹⁷。

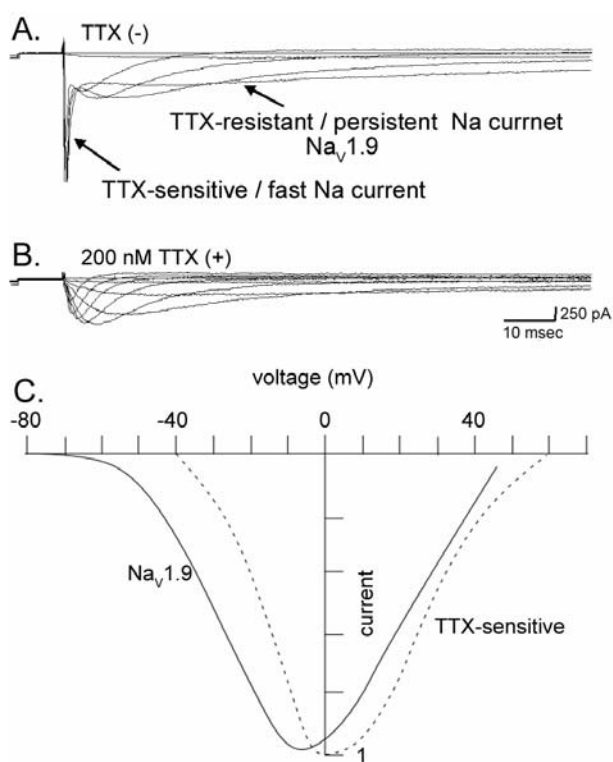


図4. Na_v1.8-KOマウスDRG神経細胞からのNa電流の記録。A: TTX非存在下におけるNa電流。B: 200 nM TTX存在下におけるNa電流。C: Na_v1.9の電流-電圧曲線。性質比較のため、電流値は標準化したものを示す。

このNa_v1.9によるNa電流の電気生理学的性質を検討したところ、活性化閾値は約-60 mVであり、他のNaチャンネルが-40 mV程度であるのに対し、約-20 mV過分極側にシフトしていた。さらに活性化、不活性化ともに著しく遅く、持続性の電流が発生することが明らかとなった。最大電流はV_t = -20 mVへの脱分極時に得られた（図4C）。

次に、mゲート、hゲートの開口確率を示すsteady-state activation curve（m_∞ curve）およびsteady-state inactivation curve（h_∞ curve）を作成した。m_∞ curveはV_{1/2} = -31.5 ± 1.4 mV, h_∞ curveはV_{1/2} = -42.3 ± 1.7 mVであり、h_∞ curveのV_{1/2}は他のNaチャンネルの値より脱分極側にシフトしていた。このことから、Na_v1.9によるNa電流はより広い電位域で機能しうることが示唆された（図5）。

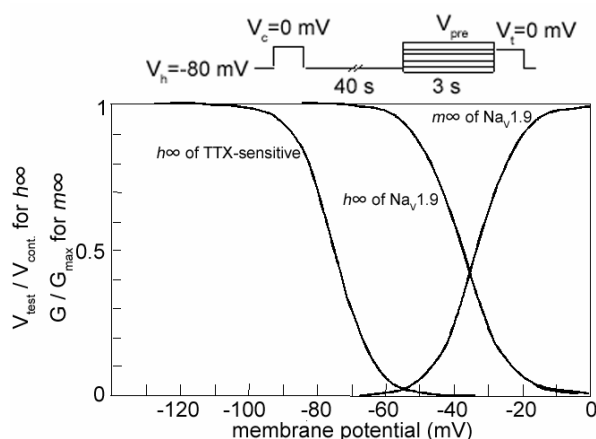


図5. Na_v1.9のh_∞ curveおよびm_∞ curve. 比較のためにTTX感受性Naチャンネルのh_∞ curveも示す。上部の図はh_∞計測の実験プロトコール。

6. Na_v1.9電流量の経時的変化

電位依存性のチャンネルを流れる電流量は文字通り基本的に電位に依存しており、パッチしている細胞が定常状態を保っていると仮定して、実験的に一定の脱分極パルスを与えつづければ電流量は変化しない。しかしながら実際には実験を行

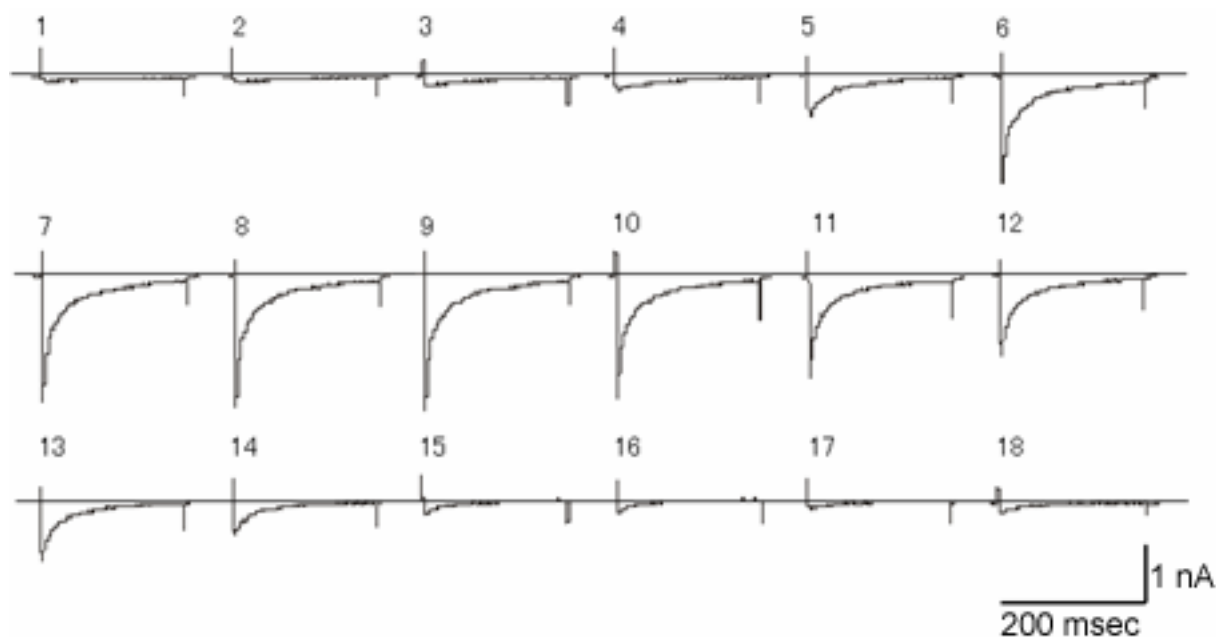


図 6. $\text{Na}_v1.9$ の電流量の経時変化. 30 秒ごとに記録された電流のトレースを順番に(1→18)示す.

っている細胞が常に一定の環境におかれているとは言い難く、細胞内物質の電極内への漏出 (washout) が起こるなど、細胞内環境は時間と共に変化している。例えばカルシウム電流ではこの washout による細胞内 ATP 濃度の減少が原因で電流量が次第に減少する run-down と呼ばれる現象が観られる。これは、カルシウムチャンネルにはリン酸化部位が存在し、この部分がリン酸化されていることが機能維持に必要であり、ATP 濃度が減少すると脱リン酸化の方向に平衡シフトが起こるためであることが知られており、電極内液に ATP を補うことによりその速度を減少させることができる^{18), 19)}。

細胞のおかれている環境は、生体内でも常に変化しており、様々なイオンチャンネルはその変化に対応するためプロテインキナーゼ A (PKA) やプロテインキナーゼ C (PKC) によるリン酸化部位などが存在し、細胞内情報伝達系によりその活性が制御されている。Naチャンネルにおいてもこのことは例外ではなく、 $\text{Na}_v1.8$ が cAMP 依存性のリン酸化を受けること²⁰⁾、炎症性メディエーターの一つである PGE_2 による TTX 非感受性 Na 電流のコン

ダクタンス増加に PKA, PKC の活性化が関与していることなど²¹⁾、数多く報告されている。これらることより、 $\text{Na}_v1.8$ が組織損傷や炎症などにより産生される種々の物質によって活性化され、疼痛の発症に関与している可能性が示唆される。 $\text{Na}_v1.9$ についても、変化が起こる可能性が十分に考えられる。今回、これらの検討を始めるための基礎検討をすすめている際に、 $\text{Na}_v1.9$ の電流量に経時変化が起こることが観察されたので、この点についても報告したい。

保持電位を $V_h = -80 \text{ mV}$ に保ち、30 秒ごとに $V_t = -20 \text{ mV}$ のテストパルスを与え、 $\text{Na}_v1.9$ の電流量を経時的に記録し、そのピーク電流を測定した。図 6 に示すように $\text{Na}_v1.9$ のピーク電流は初めは小さいが、徐々に増加し始めて最終的に初期値の 10 倍以上にまで達し、その後減少した。この変化はイオノフォアを用いる perforated 法で電流を記録した場合には認められない (データ示さず)。そのため、細胞内環境の変化、すなわち何らかの物質が細胞内から流出し濃度が低下することが電流量変化の原因である可能性が考えられた。そこで、細胞内のリン酸化の基質として重

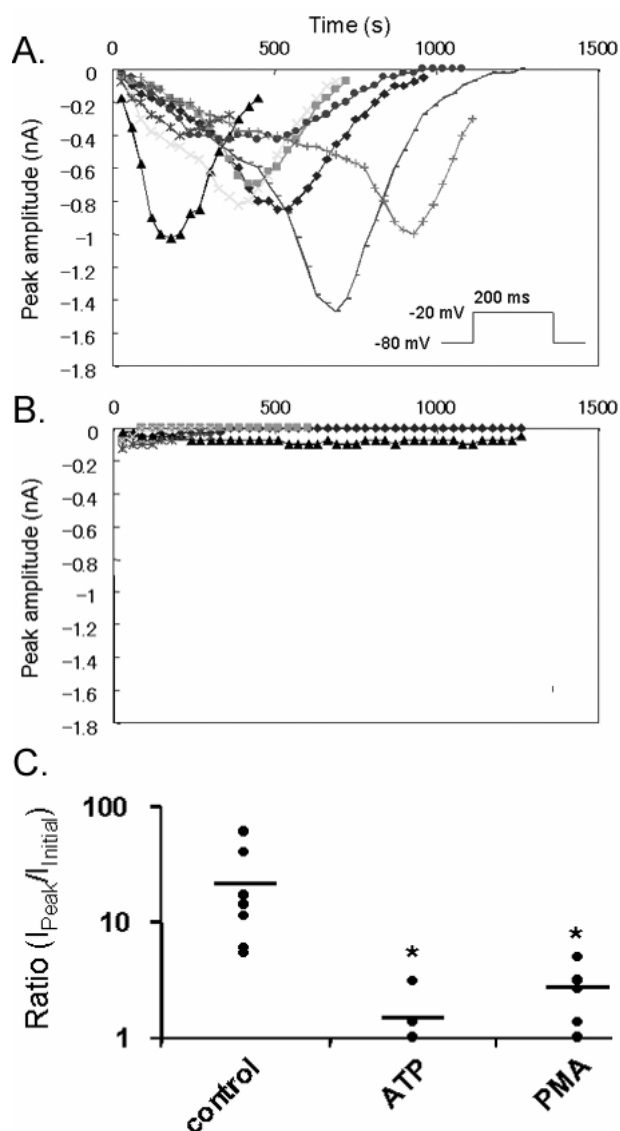


図7. $Na_v1.9$ ピーク電流変化に対するATP, PKC活性化薬PMAの効果. A: 対照群, B: 3 mM ATP存在下におけるピーク電流の経時変化. C: ピーク電流初期値に対する最大値の倍率. ●は各細胞における値, —は各群の平均値を示す. * $P < 0.05$.

要であるアデノシン3リン酸(ATP)に着目し, 3 mMのATPを添加した電極内液を調製し, $Na_v1.9$ のピーク電流の経時変化を測定した. その結果, ATP存在下では電流量の増加は認められなかった. よって, パッチ形成による細胞内ATP濃度の減少が電流量変化の一因となっていることが示唆された. さらに, PKCの活性化薬であるPMAを細胞内液に添加して検討を行った. 100 nM PMA存在

下では, ピーク電流値の増加は有意に抑制された.

7. まとめ

今回の検討により, $Na_v1.9$ は数百ミリ秒にもおよぶ非常に遅いゲーティングカINETIKSを持つ持続性Na電流を発生すること, $Na_v1.9$ の活性化閾値は約-60 mVであり, 他のNaチャンネルと比較すると20 mV程度過分極側にあること, $Na_v1.9$ のピーク電流は時間依存的に増大すること, この増大はATPおよびPKC活性化薬PMA存在下では有意に抑制されることが示唆された.

病態時には, 細胞外で様々な物質的, 気質的な変化が起こり, その結果, 細胞内情報伝達系の活性が変化する. 疼痛時においても例外ではなく, トロピックファクターの量的変化が起こっていること^{12), 13)}が報告されており, 細胞内情報伝達系の活性が変化する事が示唆される.

ピーク電流の変化はパッチを形成し, 記録を始めてからまもなく起こる. このことから電流値の変化は新しいチャンネルタンパク質の合成によるものではなく, 機能せず, “眠っている”状態のチャンネルタンパク質の活性化, 細胞膜へのトランスロケーションの調節など, 転写後の調節によるものである可能性が考えられる. また, PKCは様々な細胞外からの刺激に应答して活性化する. このため, 病態時には活性化したPKCが, $Na_v1.9$ の機能調節にかかわっている可能性が考えられる. $Na_v1.9$ の機能的発現は厳格に制御されており, わずかな細胞内環境の変化に伴う情報伝達系の活性化および不活性化によって, その制御機構のバランスが崩れ, 短時間でその性質が大きく変化することが示唆された. このため, 疼痛時における異常な痛みが発生の一因となる可能性がある.

8. 謝辞

本研究は大学院 医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻 病態探求医科学講座 神経生理学にて行われました. ご指導を賜りました緒方宣邦

教授に厚く御礼申し上げます。また、多大なるご協力いただきました同講座の大学院生 鄭泰星様、松富智哉様、中本千泉様に深く感謝いたします。

9. 参考文献

- 1) Millian M. J. (1999) The introduction of pain: an integrative review. *Prog. Neurobiol.*, **57**: 1-164.
- 2) Mayer R. A., Campbell J.N., and Raja S.N. (1994) Peripheral neural mechanism of nociception. *Textbook of pain*, 13-43, Edited by Patrick D. Wall and Ronald Melzack, Churchill Livingstone.
- 3) Catterall W.A. (2000) From ionic currents to molecular mechanisms: the structure and function of voltage-gated sodium channels. *Neuron*. **26**: 13-25.
- 4) Yellen G. (1998) The moving parts of voltage-gated ion channels. *Q. Rev. Biophys.*, **31**: 239-95.
- 5) Goldin A. L., Barchi R.L., Caldwell J. H., Hofmann F., Howe J.R., Hunter J. C., Kallen R. G., Mandel G., Meisler M. H., Netter Y. B., Noda M., Tamkun M. M., Waxman S.G., Wood J. N., and Catterall W. A. (2000) Nomenclature of voltage-gated sodium channels. *Neuron*, **28**: 365-368.
- 6) Goldin A. L. (2001) Resurgence of sodium channel research. *Ann. Rev. Physiol.*, **63**: 871-894.
- 7) Ogata N, and Tatebayashi H. (1993) Kinetic analysis of two types of Na⁺ channels in rat dorsal root ganglia. *J. Physiol.*, **466**: 9-37.
- 8) Dib-Hajj S. D., Tyrell L., Black J. A., and Waxman S. G. (1998) NaN, a novel voltage-gated Na channel is expressed preferentially in peripheral sensory neurons and down regulated after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **95**: 8963-8968.
- 9) Dib-Hajj S. D., Tyrell L., Escayg A., Wood P. M., Meisler M. H., and Waxman S. G. (1999) Coding sequence, genomic organization, and conserved chromosomal localization of mouse gene Scn11a encoding the sodium channel NaN., *Genomics*, **59**: 309-318.
- 10) Akopian A. N., Souslova V., England S., Okuse K., Ogata N., Ure J., Smith A., Kerr B. J., McMahon S. B., Boyce H., Hill R., Stanfa L. C., Dickerson A. H. and Wood J. N. (1999) The tetrodotoxin-resistant sodium channel SNS has a specialized function in pain pathways. *Nat. Neurosci.*, **2**: 541-548.
- 11) Tanaka M., Cummins T. R., Ishikawa K., Dib-Hajj S. D., Black J. A. and Waxman S. G. (1998) SNS Na⁺ channel expression increase in dorsal root ganglion neurons in the carrageenan inflammatory pain model. *Neuroreport*, **9**: 967-972.
- 12) Fjell J., Cummins T. R., Dib-Hajj S. D., Fried K., Black J. A. and Waxman S. G. (1999) Differential role of GDNF and NGF in the maintenance of two TTX-resistant sodium channels in adult DRG neurons. *Mol. Bra. Res.*, **67**: 267-282.
- 13) Cummins T. R., Black J. A., Dib-Hajj S. D. and Waxman S. G. (2000) Glial-derived neurotrophic factor upregulates expression of functional SNS and NaN sodium channels and their currents in axotomized dorsal root ganglion neurons. *J. Neurosci.*, **20**: 8754-8761.
- 14) Boucher T.J., Okuse K., Bennett D.L.H., Munson J.B., Wood J.N. and McMahon S.B. (2000) Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states. *Science*, **290**: 124-127.
- 15) Neher E. and Sakmann B. (1976) Single channel currents recorded from membrane of

- denervated frog muscle fibers. *Nature*, **260**: 799-802.
- 16) Hamill O.P., Marty A., Neher E., SAKMANN B. and SIGWORTH F.J. (1981). Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.*, **391**: 85-100.
- 17) Cummins T.R., Dib-Hajj S.D., Black J.A., Akopian A.N., Wood J.N. and Waxman S.G. (1999) A novel persistent tetrodotoxin-resistant sodium current in SNS-null and wild-type small primary sensory neurons. *J. Neurosci.*, **19**: 1-6.
- 18) Kameyama A., Yazawa K., Kaibara M., Ozono K., and Kamayama M. (1997) Run-down of the cardiac Ca^{2+} channel: characterization and restoration of channel activity by cytoplasmic factors. *Pflugers Arch.*, **433**: 547-556.
- 19) Kepplinger K. J., Forstner G., Kahr H., Leitner K., Pammer P., Groschner K., Soldatov N. M., and Romanin C. (2000) Molecular determinant for run-down of L-type Ca^{2+} channels localized in the carboxy terminus of the 1C subunit. *J. Physiol.*, **529**: 119-130.
- 20) Fitzgerald E.M., Okuse K., Wood J.N., Dolphin A.C. and Moss S.J. (1999) cAMP-dependent phosphorylation of tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J. Physiol.*, **516**: 433-446.
- 21) England S., Bevan S. and Docherty R. J. (1996) PGE_2 modulates the tetrodotoxin-resistant sodium current in neonatal rat dorsal root ganglion neurons via the cyclic AMP-protein kinase A cascade. *J. Physiol. (Lond)*, **495**: 429-440.