

K⁺チャネル制御因子 NCS-1 (細胞内 Ca²⁺センサー) による 新規痛み調節機構の解明

西谷 友重¹, 雑賀 史浩¹, 安田 純平¹, 陳 以珊¹, 木口 倫一²

¹ 和歌山県立医科大学医学部薬理学講座, ² 和歌山県立医科大学薬学部生体機能解析講座

概要【研究の目的】 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である。痛み受容・伝達の機構については電位依存性 Na⁺チャネルや TRP チャネルなど多くのイオンチャネルが関与しているが、この中で脱分極による活動電位の発生および細胞内 Ca²⁺濃度の上昇がキーとなっている。これに対し、生体では痛みを抑制する系も存在する。脱分極により活性化される電位依存性 K⁺チャネル電流 (ISA) は、過分極により活動電位の発火を抑え神経の興奮性を抑制する。実際、ISA の分子実体として知られる Kv4 チャネルが疼痛緩和の分子標的となりうることが示唆されている。

一方、申請者らはこれまでに ISA の分子構成因子である Kv4 チャネルの制御因子として Ca²⁺センサー NCS-1 が存在することを明らかにしてきた。NCS-1 は Kv4 チャネルと脳において結合・共局在し、Kv4 チャネル電流を増大させる。しかし、NCS-1 と疼痛緩和との関連については全く不明である。本研究の目的は、Ca²⁺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、分子メカニズムを含めて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ていることがわかった。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。

【考察】 以上の結果から、NCS-1 は熱刺激ではなく機械刺激による痛みの緩和経路に特異的に寄与している可能性が示唆された。今後の課題は、NCS-1 が DRG において実際 Kv4 チャネルと物理的に結合しているか、また KO マウスにおいて、Kv4 チャネルの発現または活性が低下しているか、細胞内 Ca²⁺動態および膜の興奮性などが変化しているか検討が必要である。これらの解析により、NCS-1 を介する新規痛み緩和経路が解明されれば、それらを治療標的とした鎮痛剤開発の基盤となり得る。

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、**Figure1** 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⁺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 Ca²⁺濃度の上昇をひきおこす。細胞内 Ca²⁺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。

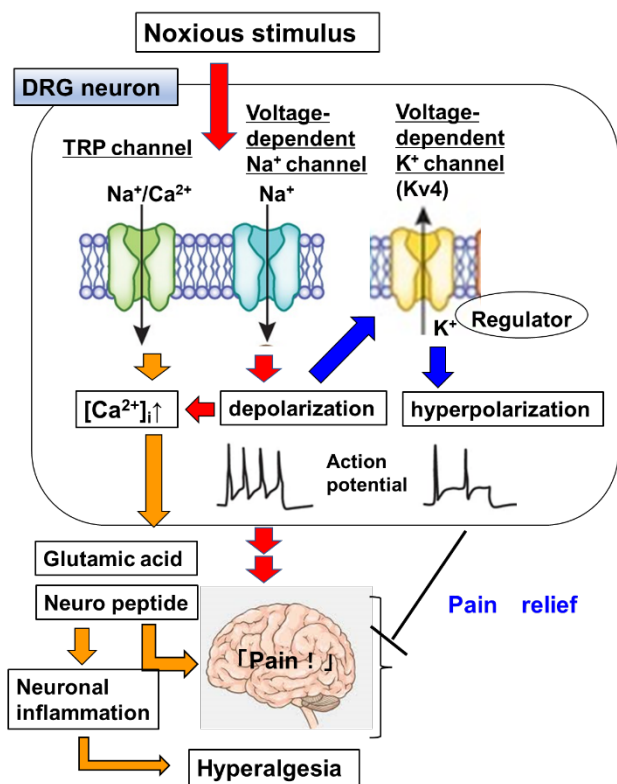


Figure 1. Main pathway of pain perception.

Sensory neurons receive noxious stimuli via activation of voltage-dependent Na⁺ channels and TRP channels, resulting in membrane depolarization. This induces increase in intracellular Ca²⁺ 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⁺ channel Kv4 (molecular component of I_{SA} current) and this results in membrane hyperpolarization, and relief pain.

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 K⁺チャンネル電流(A タイプ電流/I_{SA})が存在する。I_{SA}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 (Figure 1)。研究代表者らは以前、I_{SA}(心臓では I_o 電流)の分子実体が電位依存性 K⁺チャンネル Kv4 であることを報告した¹⁾が、近年この Kv4 チャン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 チャン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 チャンネルを 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 チャンネルの分子内制御因子として Ca²⁺セ

ンサー-NCS-1 (Neuronal Ca²⁺ 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 Ca²⁺結合タンパク質であり (Figure 2A)、細胞内 Ca²⁺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 チャンネルと神経において結合し (Figure 2C&2D)、発現系で Kv4 チャンネル電流を増大させる (Figure 2B)。しかし、NCS-1が Kv4 チャンネルと共役して神経障害性疼痛の緩和に寄与するかについては今のところ報告が無い。そこで本研究の目的は、Ca²⁺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 (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)。Ncs1^{-/-}マウス (C57BL / 6-NCR) は、私たちの以前の報告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 Ncs1^{+/+}マウスを用いた。全てのマウスは最大 6 匹のケージで飼育され、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、自由に飲食させたものを用いた。

2. 2 免疫蛍光法

以前の報告に従って、DRG 神経の切片を作製し、免疫染色を行った⁶⁾。簡単に説明すると、マウスをイソフルランで深く麻酔し、氷冷リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、続いて 4% (w/v) パラホルムアルデヒド/PBS で経心的に灌流した。次に、実体顕微鏡下で自律神経節 (DRG) を取り出し、4%パラホルムアルデヒド/PBS で後固定した後、凍結保護のため 4°C の 30% (w/v) スクロース/PBS 溶液に一晩入れ、翌日、組織を OCT compound に包埋した (Sakura, 東京, 日本)。続いて、クライオスタット (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を使用して厚さ 30 μm の切片を作製した。切片をスライドガラスにマウントし、0.1% Triton X-100 (PBST) で 1 時間処理した後、Block One Histo (Nacalai Tesque, Inc., Kyoto, Japan) で 15~25°C、5~10 分ブロッキングした。連続切片を、それぞれ抗 Kv4.3 K⁺チャンネル抗

体 (Alomone labs, APC-017, Jerusalem, Israel)あるいは抗 NCS-1 抗体 (Gifted from Andreas Jeromin) およびインレクチン B4 (IB4) で 4°C で一晩インキュベートした。切片を PBST でリンスした後、蛍光標識二次蛍光体 (Alexa Fluor488 conjugated goat anti-rabbit antibody, Abcam, Cambridge, UK) と 15~25°C で 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。切片を PBS で 10 分間洗浄したのち、封入剤 PermaFluor (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いてカバーガラスで封入した。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)

以前、研究代表者らが報告した方法^{6,7}に従って von Frey テストを行った。簡潔に説明すると、生後 7-9 ヶ月

齢の NCS-1 KO マウスおよび同月齢の 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 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校正された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⁸。

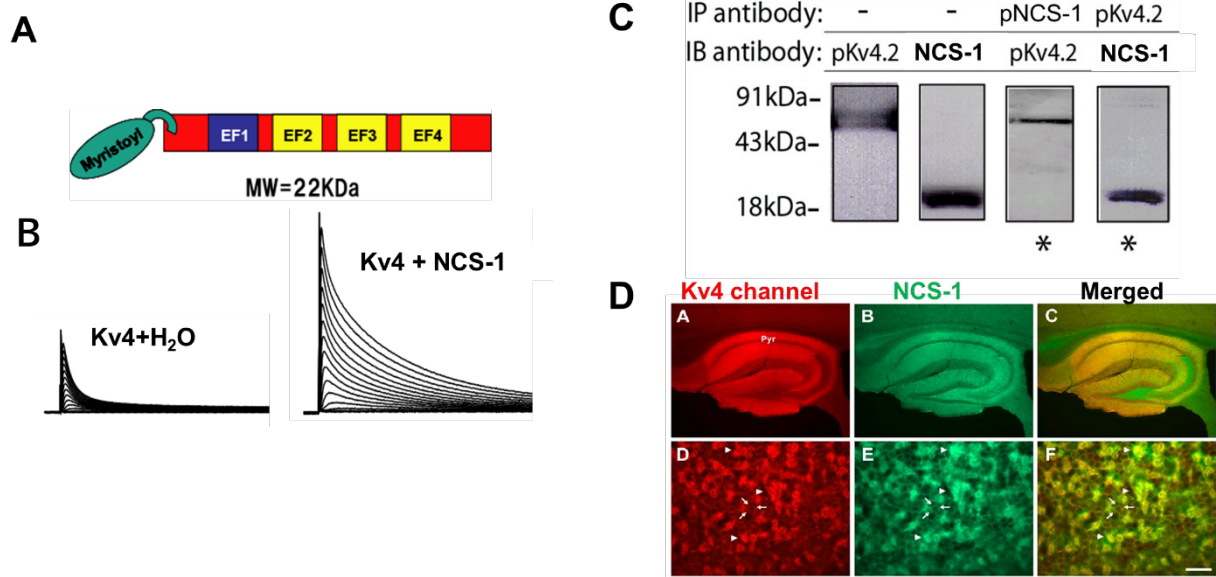


Figure 2. Neuronal Ca²⁺ sensor NCS-1 interacts with Kv4 channels in mouse brain, and increases Kv4 current.

A: The structure of NCS-1, which is an EF-hand Ca²⁺-binding protein

B: Kv4 current with or without NCS-1. NCS-1 increases current amplitude and slows inactivation kinetics.

C: NCS-1 co-immunoprecipitates with Kv4 channel protein

D: NCS-1 co-localized with Kv4 channel protein in mouse hippocampus and cortex.

(B-D are cited from "Nakamura et al PNAS 2001")

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⁹⁾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

以下の研究結果を得た。

3. 1 Kv4 チャンネルおよび 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 チャンネルおよび 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。

Figure 3A に示すように、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 (**Figure 3B**)。一方、マウス DRG には、Kv4 チャンネル (Kv4.1 - Kv4.3) のうち Kv4.3 チャンネルが主に発現していることが報告されている²⁾。実際、研究代表者らが行った場合でも、Kv4.3 チャン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 (**Figure 4C**)。

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。**Figure 4** に示すように、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 (**Figure 5**)。

4. 考察

4. 1 NCS-1 と Kv4 チャン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 (**Figure 3**),
- 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 (**Figure 4**),
- 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 (**Figure 5**) 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⁶⁾。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 (naive) で比較したためか、あるいは別の時期に実験をしたためか、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。同日に実験をして比較する必要がある。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 チャンネルを介して) 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 チャンネルは近年、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 チャン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⁾、神経の障害により Kv4.3 チャンネルタンパク質の量が低下し、また Kv4.3 チャンネルを 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 チャンネル活性を大きく増大させることから (**Figure 2**)⁴⁾、NCS-1 KO マウスでは Kv4 チャンネル活性が低下している可能性がある。

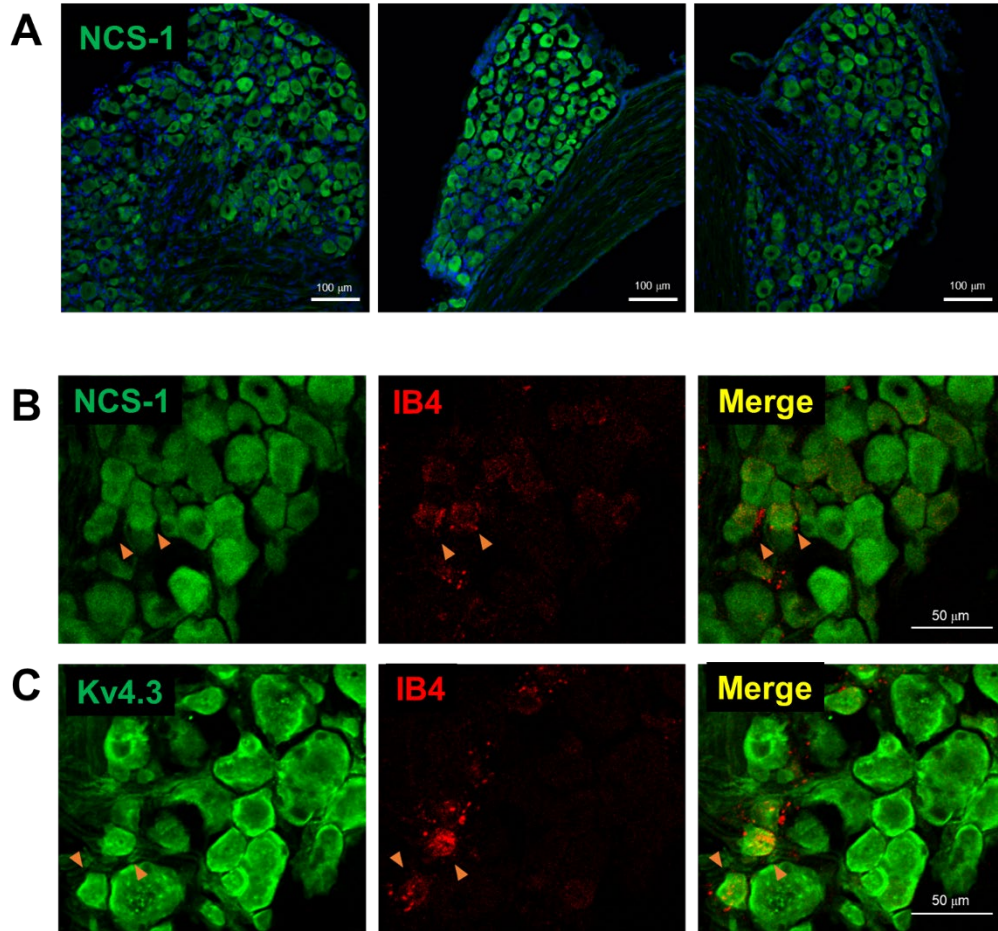


Figure 3. Both NCS-1 and Kv4.3 channels are expressed in mouse DRG.
 A: Expression pattern of NCS-1 in mouse DRG. NCS-1 is expressed in almost all DRG neurons.
 B: A part of NCS-1 expressing cells are IB4(+), small, non-peptide neurons.
 C: Kv4 channels are expressed in the plasma membrane of small cells. Some of them are IB4(+).

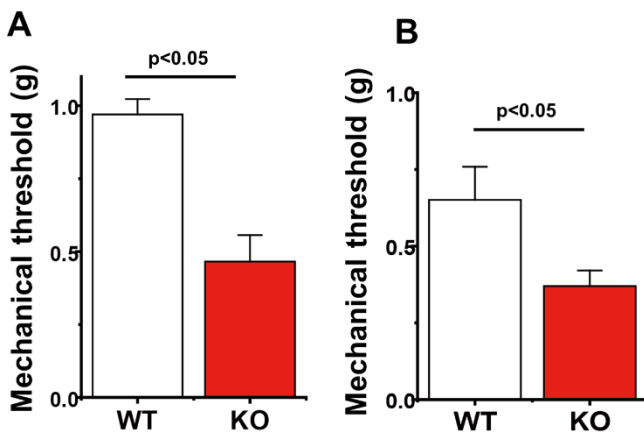


Figure 4. NCS-1 KO mice (both female and male mice, left and right panel, respectively) exhibited more sensitive to mechanical pain. The 50% paw withdrawal threshold was assessed by the up-down method using von Frey test. $P < 0.05$ ($n = 6$ each)

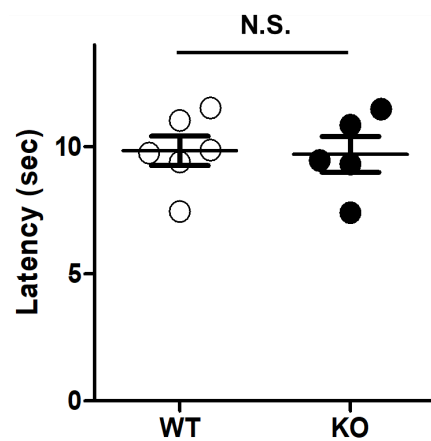


Figure 5. WT and NCS-1 KO mice have similar sensitivity to thermal pain. Thermal allodynia were evaluated by the Hargreaves test.

4. 2 Kv4 チャンネルの制御因子と痛み緩和への寄与

Kv4 チャンネルの制御因子として KChIP1-4(K⁺ channel interacting protein)¹⁰⁾ および dipeptidyl peptidase-like proteins (DPP6 and DPP10)¹¹⁾ が知られている。ラット DRG 神経において、これら制御因子の発現低下は Kv4 チャンネルそのものの発現も低下させ、DRG 神経の興奮性を高めることにより、機械刺激による痛覚への感受性が低下することが報告されている¹²⁾。しかし、NCS-1 と痛み緩和との関係、および NCS-1 と他の Kv4 チャンネル制御因子との関係については不明である。

4. 3 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¹³⁾、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¹⁴⁾。興味深いことに、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¹⁵⁾。しかし、GDNF、NCS-1、鎮痛作用との関連については不明である。

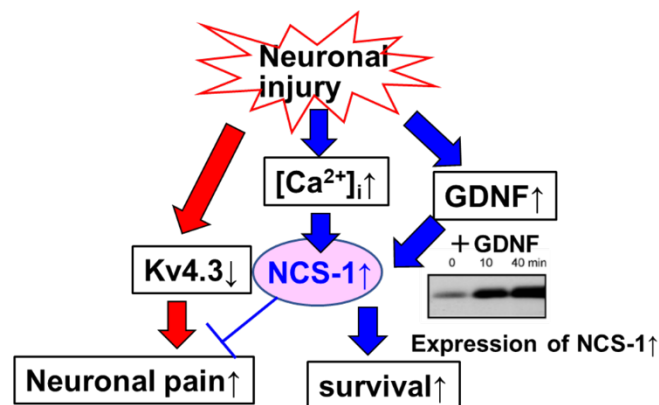


Figure 6. Possible mechanism of novel pain relief mediated by NCS-1. Neuronal injury decreases the expression of Kv4.3 channels that increases neuronal pain. However, injury may increase the expression level or activity of NCS-1 via increasing intracellular Ca²⁺ levels. This may be able to relieve pain. 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.

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(**Figure 6**)。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. 今後の課題

5. 1 NCS-1とKv4.3チャンネルのDRGにおける相互作用と痛み緩和への寄与の確認

今回の実験結果は NCS-1 と Kv4.3 チャンネルが DRG に両方発現していることは明らかとなったが物理的に結合しているか明らかでない。そこで今後は WT マウス DRG を用いて免疫沈降法および免疫組織化学的により確かめる必要がある。

また実際、NCS-1 KO マウスにおいて Kv4 チャンネル遺伝子及びタンパク質が減少しているか、定量 PCR, Western blot 法, 免疫蛍光法により確認する。さらに、KO マウスにおいて I_{SA} 電流が減少しているか、また細胞内 Ca²⁺動態はどうか、膜の興奮性(活動電位発火頻度)はどうかなど、WT および KO マウスより単離した培養 DRG 神経を用いて、電気生理学的に、また蛍光法により確認する。

5. 2 他のKv4チャンネル制御因子との関連について検討

KChIP や DPPs との関連を調べるため、NCS-1 KO マウスにおいて、これらの発現パターンを定量 PCR, Western blot 法, 免疫蛍光法により確認する。

5. 3 GDNF, NCS-1, 鎮痛作用との関連についての検討

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生体防御機構の存在を検証するため、1)NCS-1 が神経障害の際、DRG でも発現上昇するか生化学的方法により確かめる。2)NCS-1 の KO マウスに Kv4 チャンネルまたは GDNF を脊髄くも膜下投与した際、鎮痛作用が発現するかを確認する。これにより NCS-1 が疼痛緩和において GDNF の下流にあるか判定できる。

6. 文献

1. T.Y. Nakamura, W.A. Coetzee, E. Vega-Saenz De Miera, M. Artman, B. Rudy, Modulation of KV4 channels, key components of rat ventricular transient outward K⁺ current, by PKC, *Am J Physiol* 273(4 Pt 2) (1997) H1775-86.

2. T.R. Phuket, M. Covarrubias, Kv4 Channels Underlie the Subthreshold-Operating A-type K-current in Nociceptive Dorsal Root Ganglion Neurons, *Front Mol Neurosci* 2 (2009) 3.
3. L.Y. Chien, J.K. Cheng, D. Chu, C.F. Cheng, M.L. Tsaor, Reduced expression of A-type potassium channels in primary sensory neurons induces mechanical hypersensitivity, *J Neurosci* 27(37) (2007) 9855-65.
4. T.Y. Nakamura, D.J. Pountney, A. Ozaita, S. Nandi, S. Ueda, B. Rudy, W.A. Coetzee, A role for frequenin, a Ca²⁺-binding protein, as a regulator of KV4 K⁺-currents, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(22) (2001) 12808-13.
5. T.Y. Nakamura, A. Jeromin, K. Mikoshiba, S. Wakabayashi, Neuronal calcium sensor-1 promotes immature heart function and hypertrophy by enhancing Ca²⁺ signals, *Circulation research* 109(5) (2011) 512-23.
6. F. Saika, S. Matsuzaki, D. Kobayashi, Y. Ideguchi, T.Y. Nakamura, S. Kishioka, N. Kiguchi, Chemogenetic Regulation of CX3CR1-Expressing Microglia Using Gi-DREADD Exerts Sex-Dependent Anti-Allodynic Effects in Mouse Models of Neuropathic Pain, *Front Pharmacol* 11 (2020) 925.
7. N. Kiguchi, Y. Fukazawa, A. Saika, D. Uta, F. Saika, T.Y. Nakamura, M.C. Ko, S. Kishioka, Chemogenetic activation of central gastrin-releasing peptide-expressing neurons elicits itch-related scratching behavior in male and female mice, *Pharmacol Res Perspect* 9(3) (2021) e00790.
8. W.J. Dixon, Efficient analysis of experimental observations, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 20 (1980) 441-62.
9. N. Kiguchi, Y. Kobayashi, F. Saika, H. Sakaguchi, T. Maeda, S. Kishioka, Peripheral interleukin-4 ameliorates inflammatory macrophage-dependent neuropathic pain, *Pain* 156(4) (2015) 684-693.
10. W.F. An, M.R. Bowlby, M. Betty, J. Cao, H.P. Ling, G. Mendoza, J.W. Hinson, K.I. Mattsson, B.W. Strassle, J.S. Trimmer, K.J. Rhodes, Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors, *Nature* 403(6769) (2000) 553-6.
11. J. Maffie, B. Rudy, Weighing the evidence for a ternary protein complex mediating A-type K⁺ currents in neurons, *The Journal of physiology* 586(23) (2008) 5609-23.
12. Y.L. Kuo, J.K. Cheng, W.H. Hou, Y.C. Chang, P.H. Du, J.J. Jian, R.H. Rau, J.H. Yang, C.C. Lien, M.L. Tsaor, K(+) Channel Modulatory Subunits KChIP and DPP Participate in Kv4-Mediated Mechanical Pain Control, *J Neurosci* 37(16) (2017) 4391-4404.
13. Z.Q. Dong, F. Ma, H. Xie, Y.Q. Wang, G.C. Wu, 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* 376(2) (2005) 143-8.
14. T.J. Boucher, K. Okuse, D.L. Bennett, J.B. Munson, J.N. Wood, S.B. McMahon, Potent analgesic effects of GDNF in neuropathic pain states, *Science* 290(5489) (2000) 124-7.
15. T.Y. Nakamura, A. Jeromin, G. Smith, H. Kurushima, H. Koga, Y. Nakabeppu, S. Wakabayashi, J. Nabekura, Novel role of neuronal Ca²⁺ sensor-1 as a survival factor up-regulated in injured neurons, *The Journal of cell biology* 172(7) (2006) 1081-91.

Novel Regulatory Mechanisms Mediated by a K⁺ Channel Interacting Protein NCS-1 (an Intracellular Ca²⁺ Sensor)

Tomoe Nishitani¹, Fumihiro Saika¹, Jumpei Yasuda¹, Isen Chen¹, Norikazu Kiguchi²

¹ Department of Pharmacology, Wakayama Medical University,

² School of Pharmaceutical Sciences, Wakayama Medical University

Summary

[Purpose] The number of patients with neuropathic pain is more than hundreds of thousands in Japan. However, conventional analgesics is not effective enough, thus, a new therapeutic strategy is required. Many ion channels such as voltage-gated Na⁺ channels and TRP channels are involved in the mechanism of pain reception and transmission. Among them, the generation of action potentials due to depolarization and the increase in intracellular Ca²⁺ concentration induce pain. On the other hand, there is a system that suppresses pain in the living body. The voltage dependent A-type K⁺ current (ISA) suppresses the firing of action potentials by hyperpolarization and suppresses neural excitability. In fact, it has been suggested that the Kv4 channel, known as the molecular component of ISA, may be a target for pain relief. On the other hand, we have previously identified the Ca²⁺ sensor NCS-1 as a regulator of the Kv4 channel. NCS-1 physically interacts with the Kv4 channel in mouse brain and increases the Kv4 channel current amplitude. However, the relationship between NCS-1 and pain relief is completely unknown. The purpose of the present study is to clarify whether the Ca²⁺ sensor NCS-1 can be a novel therapeutic target for neuropathic pain, including its molecular mechanism.

[Methods and results] We first confirmed that both Kv4.3 and NCS-1 proteins are highly expressed in mouse dorsal root ganglion (DRG) by immunofluorescence. In addition, when NCS-1 deficient (KO) mice were compared with wild-type (WT) mice, it was found that KO mice were more sensitive to mechanical stimuli in both males and females. On the other hand, no difference was detected regarding the sensitivity to thermal stimulation between WT and KO mice.

[Discussion] The above results suggest that NCS-1 may specifically contribute to the pain relief pathway by mechanical stimulation rather than thermal stimulation. It is necessary to consider whether NCS-1 physically binds to Kv4 channels in DRG, whether the expression/activity of Kv4 channels is reduced, and whether membrane excitability and intracellular Ca²⁺ dynamics are changed in KO mice. If new pain relief pathways mediated by NCS-1 are elucidated, they can be specific targets for the development of new analgesics for neuropathic pain.