

長寿医療研究開発費 2025年度 総括研究報告

加齢に伴う慢性疼痛の病態解明と鎮痛薬開発（25-31）

主任研究者 田中 達英 国立長寿医療研究センター 神経免疫システム研究部（部長）

研究要旨

本研究では、慢性疼痛の形成および慢性化における神経免疫連関の役割に着目し、特に NGF およびその上流制御因子 **SNX25** を中心とした疼痛制御機構の解明と、新規治療標的としての可能性を検討した。これまでに我々は、**SNX25** が免疫系細胞において **Nrf2** のユビキチン化・分解を抑制し、NGF 発現を制御すること、さらに疼痛感受性の調節に重要な役割を果たすことを見出している。本研究では、**SNX25** 中和抗体を新たに作製し、炎症性疼痛モデルマウスを用いてその効果を検証した結果、特に炎症・感作相における疼痛行動が有意に抑制されることを明らかにした。また、中和抗体が真皮マクロファージに取り込まれることを確認し、免疫系細胞を介した鎮痛メカニズムの可能性を示した。さらに、**SNX25-Nrf2** 相互作用部位の同定を目的として、ドメイン欠損体を用いた分子解析および **AlphaFold3** を用いた構造予測解析を進め、相互作用候補領域に関する新たな知見を得た。加えて、老化に伴う慢性疼痛の増加に着目し、若齢および老齢マウスを用いて **SNX25-NGF** シグナルの変化を解析した。その結果、老齢マウスでは NGF 発現が低下傾向を示し、加齢に伴う神経免疫シグナル変調の可能性が示唆された。今後、蛋白レベルや組織局在解析を進めることで、老化関連疼痛の分子基盤解明を目指す。また、糖尿病性神経障害性疼痛に関しても、関連マウス系統の再構築を完了し、今後、NGF シグナル、炎症性メディエーター、および老化関連因子との関連解析を進める予定である。本研究により、**SNX25-NGF** シグナルが慢性疼痛形成に重要な役割を果たすこと、さらに老化や糖尿病に伴う免疫系変調が疼痛慢性化に関与する可能性が示された。これらの成果は、神経免疫連関を標的とした新規鎮痛薬開発や老年性慢性疼痛の病態理解につながることを期待される。

主任研究者

田中 達英 国立長寿医療研究センター 神経免疫システム研究部（部長）

A. 研究目的

神経成長因子 NGF (nerve growth factor) が、炎症性・神経因性疼痛などの慢性疼痛に深く関与することが明らかになってきた。我々は NGF やその上流因子として同定した **SNX25**

が痛みの形成に重要であることを見出している。本研究で NGF や SNX25 が痛みの慢性化にどのように寄与するかを詳細に検証した上で、これら因子の阻害薬開発を目指す。また、慢性疼痛の有病率は高齢になるほど上昇し、特に 75 歳以上で急激に高くなる。老化に伴う慢性炎症が高齢者の慢性疼痛に寄与することが示唆されているが、この観点からの研究は少ない。我々はこれまで免疫系細胞の変調が疼痛惹起に深く関わることを見出してきており、免疫系細胞の NGF シグナルが加齢に伴いどのように変化し、また慢性化する痛みの形成に寄与するかを検証する。

B. 研究方法

1. SNX25 を中心とした痛覚制御機構の解明

これまで SNX25 が疼痛制御に大きく関わることを明らかにしてきた。SNX25 中和抗体を作成し、その機能を詳細に検討して SNX25 抗体医薬を想定した新規治療戦略を探索する。また、SNX25 は転写因子 Nrf2 と相互作用して、Nrf2 のユビキチン化と分解を抑制し、NGF の組織含量を調節していることを明らかにしており、本項目では両者が相互作用する部位を特定し、さらに SNX25, Nrf2 の阻害活性化物質の探索を行なう。

2. 加齢に伴う NGF シグナルの変化と慢性疼痛病態に及ぼす影響の解明

老化に伴い慢性疼痛の有病率は上昇する。免疫系細胞の NGF シグナルが加齢に伴いどのように変化し、また慢性化する痛みの形成に寄与するかを検証する。本項目では、野生型マウスにおいて、若齢マウスと老齢マウスの SNX25-NGF シグナルの強度や時空間様式の相違を明らかにした上で、老齢マウスにおける SNX25 KO および NGF KO マウスで痛覚の表現型が軽減するかを明らかにする。

3. 糖尿病に伴う免疫系細胞変調が慢性疼痛病態に及ぼす影響の解明

老化に伴い糖尿病の罹患率は上昇し、患者の 3 割で神経障害が生じる。この神経障害に神経免疫クロストークが強く示唆されている。慢性疼痛の病態理解において「糖尿病性末梢神経障害」の視点から、免疫系細胞がどのような機序で慢性化する痛みの形成に寄与するかを検証する。本課題では糖尿病モデルにおける NGF シグナル変化、各 cKO マウスの疼痛行動評価、加齢に伴う炎症性メディエーター(SASP)の定量、病理学的特徴から「老化」との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、「動物の愛護及び管理に関する法律」および所属機関の動物実験規程に従い、動物実験委員会の承認を得て実施した。実験に際しては、苦痛の軽減、使用動物数の最小化、適切な飼育環境の維持など、3Rs (Replacement, Reduction, Refinement) の原則を遵守する。疼痛モデル作製や組織採取時には適切な麻酔・鎮痛処置を行い、動物福祉

に十分配慮した。

C. 研究結果

1.SNX25 を中心とした痛覚制御機構の解明

a. SNX25 中和抗体投与による鎮痛作用の実証と鎮痛メカニズムの解明

本項目では、SNX25 に対する中和抗体を 2 種類（AFT18175001 および AFT18175002）作製し（図 1）、これらを用いた *in vivo* 解析により、SNX25 の機能阻害が疼痛行動に及ぼす影響を検証した。SNX25 はこれまでの研究から、マクロファージにおいて疼痛関連因子の制御に重要な役割を果たすことが明らかになっており、その阻害により鎮痛効果が得られる可能性が示唆されていた。まず我々は、中和抗体が標的細胞であるマクロファージに取り込まれるかを

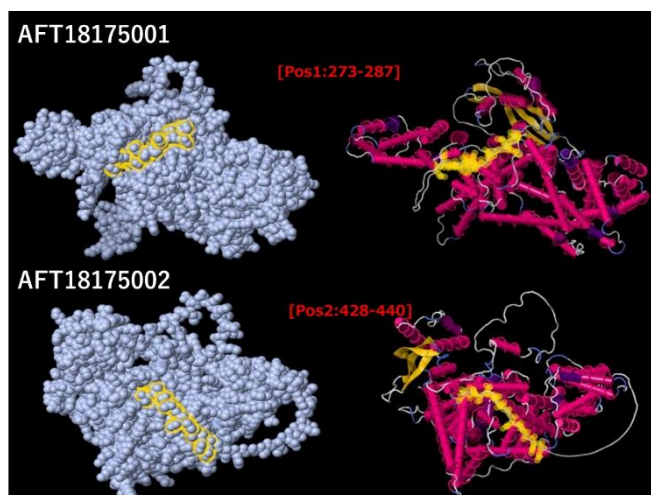


図 1 SNX25中和抗体作製
抗原ペプチド配列を黄色で示す

確認するため、免疫染色および共焦点顕微鏡解析を行った。その結果、両抗体ともに皮下組織のマクロファージに取り込まれることを確認した。これにより、SNX25 の細胞内機能を抗体投与により制御可能であることが示唆された。

次に、マウスの後肢皮下に 5%ホルマリンを投与することで誘導される炎症性疼痛モデルを用い、SNX25 中和抗体の鎮痛作用を行動レベルで評価した。本モデルでは、ホルマリン投与直後から 5 分までに観察される第 1 相（急性疼痛相）と、投与 15 分後から 50 分までの第 2 相（炎症・感作期）の 2 段階の疼痛反応が出現することが知られている。興味深いことに、中和抗体をあらかじめ皮下投与したマウスでは、第 2 相の疼痛行動が有意に減弱し、とくに AFT18175001 投与群で顕著な効果が認められた。この結果は、SNX25 が炎症期の疼痛増強メカニズムに関与しており、その機能を抗体により阻害することで痛覚過敏が抑制されることを示唆している。また、この効果は抗体が真皮マクロファージに取り込まれ、細胞内で疼痛因子の発現や分泌制御に影響を与えた結果である可能性が高いと考えられる。一方で、*in vitro* 解析でマクロファージ内に中和抗体が取り込まれていることは確認しているものの、その効率は決して高くはなかった。そのため、マクロファージ内への取り込み能を亢進させるべく、中和抗体のリポソームによる内包化に取り組んでいる。現時点で、内包化までには至っていないがリポソーム修飾には成功している。

今後は、抗体のリポソームによる内包化を進めるとともに、中和抗体の至適濃度、投与タイミング、投与期間、および組織内動態を詳細に検討し、最も鎮痛効果が得られる条件を明

確化する予定である。また、炎症性疼痛モデルに加え、神経障害性疼痛モデル、内臓痛モデルなど様々な疼痛モデルを用いて、SNX25 中和抗体が幅広い疼痛状態に対して有効かどうかを検証する。これらの解析により、SNX25 が関与する疼痛制御経路の分子基盤を明らかにし、将来的には SNX25 を標的とした新規鎮痛薬開発への応用可能性を探ることを目指す。

b. SNX25-Nrf2 複合体の結合部位特定

これまでの研究により、SNX25 が転写因子 Nrf2 と直接的に相互作用し、Nrf2 のユビキチン化およびその後のプロテアソーム分解を抑制することで、下流の NGF 発現や組織内 NGF 含量を制御していることを明らかにしてきた。こうした SNX25-Nrf2 経路は、細胞内酸化ストレス応答や炎症制御に関わる新たな制御機構であり、痛みや神経再生といった病態にも関与している可能性が高い。

本項目では、両者の相互作用様式を分子レベルで解明することを目的とし、SNX25 および Nrf2 の全長コンストラクトに加え、各ドメイン欠損型コンストラクトを複数作製中である。これらの発現ベクターを用い、共免疫沈降法 (co-IP) により、どの領域が相互作用に必須であるかを順次検証する予定である。さらに、タグ付きタンパク質を用いたプルダウンアッセイにより、直接結合か間接結合かも評価する。現在、各ドメインの発現効率や安定性の最適化を進めており、初期的な免疫沈降実験の準備段階にある。

近年、AI を用いたタンパク質立体構造予測技術が飛躍的に進展しており、とくに 2024 年に公開された AlphaFold3 は、単一タンパク質のみならず複合体形成や分子間相互作用の予測精度においても顕著な性能向上を示している。こうした技術革新を受け、SNX25 と Nrf2 の分子相互作用を *in silico* 解析により構造レベルで検討することを試みた。

まず、SNX25 単体の立体構造予測を行ったところ、主要なドメイン構成 (PX ドメインおよび BAR ドメインを含む) において非常に高い信頼度 (pLDDT 値 90 以上) のモデルが得られた。このことは、SNX25 が安定した立体構造を有し、膜局在やタンパク質間相互作用に関与するための構造的基盤を持つことを支持している。一方で、Nrf2 については、既報でも知られているように天然変性領域 (intrinsically disordered regions, IDR) が全体の大部分を占めており、構

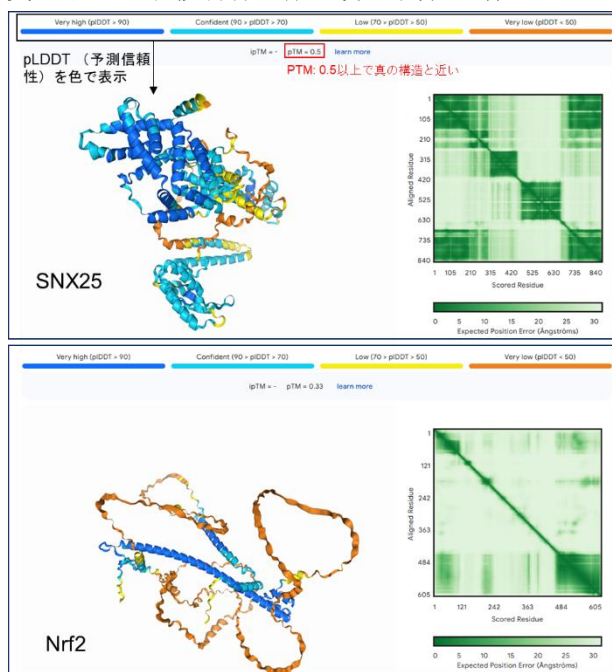


図3 AlphaFold 3によるSNX25とNrf2の立体構造予測
SNX25は信頼性がありそうな構造が得られた
Nrf2は天然変性領域を含むため、予測構造の信頼性が低い

造モデルの信頼度は低く、特に C 末端側の領域で大きな不確定性がみられた（図 3）。このため、Nrf2 単体の安定した立体構造モデル化は困難であることが改めて確認された。

次に、SNX25-Nrf2 複合体の相互作用予測を行ったところ、いくつかの条件下で相互作用が生じ得るクラスタが得られたものの、全体的な信頼スコア（ipTM 値）は低値にとどまった（図 4）。特に、Nrf2 の IDR 領域に由来する柔軟性が高く、特定の結合様式を安定的に再現することが困難であった点が要因として考えられる。ただ

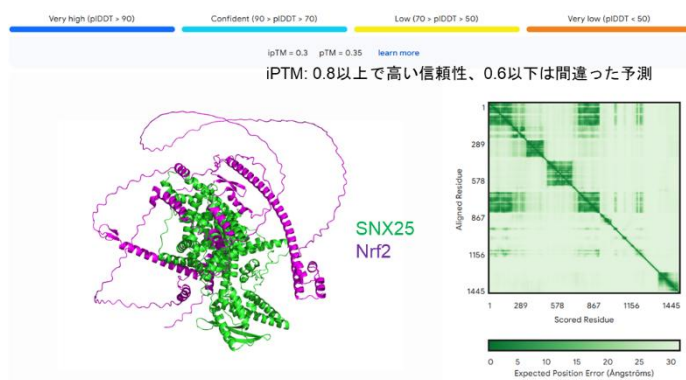


図 4 AlphaFold 3によるSNX25-Nrf2複合体の構造予測
複合体は全体的に信頼性が低い（特にNrf2の信頼性が低い）

し、一部のクラスタでは SNX25 の PX ドメイン近傍に Nrf2 の構造的モチーフが接触しており、結合の可能性を示唆する興味深い結果が得られている。

今後は、この AlphaFold3 解析で得られた構造的示唆をもとに、SNX25-Nrf2 間相互作用の候補領域を同定し、分子ドッキング解析や分子動力学シミュレーションを組み合わせることで相互作用の安定性を検証する予定である。さらに、得られた構造モデルをもとに、SNX25 による Nrf2 分解抑制機構の構造的根拠を実験的に裏付ける計画である。また、構造解析や分子モデリングに精通した研究者との共同研究を推進し、クライオ電子顕微鏡や NMR 解析などの先端的手法も視野に入れて複合体構造の妥当性を高める。さらに、AlphaFold の派生モデル（RoseTTAFoldAll-Atom など）や分子動力学シミュレーションを併用することで、より実際の相互作用に近い構造を推定し、結合部位の同定と機能的意義を明確化していく予定である。今回の解析は、AlphaFold 技術の進展が研究戦略を柔軟に拡張させ、分子機構の理解を一層深化させる契機となった。

2. 加齢に伴う NGF シグナルの変化と慢性疼痛病態に及ぼす影響の解明

a. 若齢マウスと老齢マウスの SNX25-NGF シグナルの相違

本項目では、慢性疼痛の病態形成における「老化」の影響に着目し、加齢に伴って免疫系細胞における NGF（nerve growth factor）シグナルおよびその制御因子である SNX25 の発現や機能がどのように変化するかを明らかにすることを目的としている。加齢は神経再生能や免疫応答性の低下と関連しており、その結果として炎症の遷延化や疼痛の慢性化を引き起こすことが知られている。しかし、老化に伴う SNX25-NGF シグナル経路の変容についてはほとんど報告がなく、その実態を明らかにすることは、老年性疼痛のメカニズム理解および治療標的探索の上で重要である。

本研究では、C57BL/6 マウスを用い、若齢群（8-12 週齢）と老齢群（18-24 カ月齢）を比

較対象とした。SNX25-NGF シグナルの強度やその時空間的变化を明らかにするために、各臓器サンプルを回収し、PCR、ウェスタンブロット、ELISA、および免疫組織化学を順次実施する計画である。今年度はその初期解析として、SNX25 および NGF の遺伝子発現解析を定量 PCR (qPCR) で行った。SNX25 および NGF が恒常的に発現することが知られている顎下腺、肺、および結腸組織を対象に、若齢群・老齢群それぞれ 3 個体ずつ (N=3) を解析した。

その結果、顕著な統計的差異は現時点では認められなかったものの、NGF 発現量は顎下腺、肺、結腸のいずれにおいても老齢マウスで低下傾向を示した。この傾向は、加齢に伴う神経栄養因子産生能の低下や、SNX25 を介した Nrf2-NGF 経路の抑制的变化を示唆する可能性がある。今後は、サンプル数を増やして統計的な確実性を高めるとともに、蛋白レベル (ウェスタンブロット、ELISA) での検証を進める。また、免疫組織化学染色により、SNX25 と NGF の局在や共発現パターンを組織レベルで評価し、加齢による発現様式の空間的变化を可視化する予定である。

さらに、単離マクロファージや線維芽細胞培養系を用いて、老化に伴う SNX25-NGF 経路の応答性低下が細胞固有の変化によるものか、あるいは組織微小環境の変化に起因するのかを明らかにする。これにより、老化関連疼痛における神経免疫関連の分子基盤を明確にし、老齢個体特有の疼痛制御不全メカニズムを解明することを目指す。

3. 糖尿病に伴う免疫系細胞変調が慢性疼痛病態に及ぼす影響の解明

a. 糖尿病性神経障害性疼痛モデルマウスにおける NGF シグナルと疼痛の連関検証

本項目は令和 8 年度以降に本格的に計画しているが、現在までに前任地 (奈良県立医科大学) から導入した凍結胚・凍結精子をもとにマウスの個体化に取り組み、実験動物管理室スタッフのご尽力により固体化に成功した。

D. 考察と結論

本研究では、SNX25-NGF シグナルが免疫系細胞を介した疼痛制御に重要な役割を担うことを示し、慢性疼痛の新たな分子基盤として神経免疫関連の重要性を支持する結果が得られた。特に、SNX25 中和抗体投与により炎症性疼痛モデルの第 2 相疼痛反応が抑制されたことは、SNX25 が炎症および感作過程に深く関与していることを示唆している。これまで SNX25 は細胞内タンパク質として認識されてきたが、本研究では中和抗体がマクロファージ内へ取り込まれることを確認し、細胞内標的に対する抗体医薬開発の可能性を示した点は重要である。一方で、現時点では抗体の細胞内移行効率は十分高くなく、今後はリポソーム内包化や DDS 技術を応用することで、より効率的な細胞内送達法の確立が必要であると考えられる。

また、SNX25 が Nrf2 と相互作用し、その分解抑制を介して NGF 発現を制御するという

これまでの知見に加え、本研究では AlphaFold3 を用いた構造予測解析を導入し、SNX25-Nrf2 複合体形成の可能性を構造学的に検討した。Nrf2 は天然変性領域を多く含むため複合体予測には限界があるものの、一部で相互作用候補領域が示唆されており、今後の実験的検証により新たな分子制御機構が明らかになる可能性がある。近年、AI を活用した構造予測技術の進展は著しく、本研究においても創薬標的探索や阻害化合物設計に向けた重要な基盤となることが期待される。

さらに、本研究では加齢に伴う慢性疼痛の増加に着目し、若齢および老齢マウスにおける SNX25-NGF シグナルの変化を解析した。老齢マウスでは NGF 発現低下傾向が認められ、加齢に伴う神経栄養因子産生能や免疫応答性の変化が疼痛慢性化に関与する可能性が示唆された。老化に伴う慢性炎症 (inflammaging) は高齢者疼痛の重要な背景因子と考えられているが、本研究はその分子基盤として SNX25-NGF 経路が関与する可能性を示した点で意義深い。また、糖尿病性神経障害性疼痛についても、老化や炎症性メディエーターとの関連を含めた解析基盤を整備することができ、今後の病態解明に向けた準備が進展した。

以上より、本研究は SNX25-NGF シグナルが慢性疼痛形成および慢性化に重要な役割を果たすことを示すとともに、神経免疫連関を介した疼痛制御機構の一端を明らかにした。今後は、SNX25 阻害抗体や低分子化合物探索をさらに進めることで、新規鎮痛薬開発への応用が期待される。また、老化や糖尿病に伴う免疫系変調を統合的に理解することで、高齢者慢性疼痛に対する新たな治療戦略の構築につながることを期待される。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Isonishi A, Tatsumi K, Okuda H, Tanaka T, Hattori T, Wanaka A. Macrophage deficiency of sorting nexin 25 suppress plaque formation in atherosclerotic lesions in mice. *Acta Histochem. Cytochem.* 58: 1-6. 2025

2) Ueda K, Imai T, Okayasu T, Tanaka T, Tatsumi K, Wanaka A, Kitahara T. Coenzyme Q10 and rikkunshito prevent age-related changes in mouse otolith morphology and function. *Biochemistry and Biophysics Reports* 42: 102033. 2025

3) 田中達英、和中明生「真皮免疫細胞に着目した痛覚センシング機構の解明」アレルギー & リウマチ性疾患 45: 127-131, 2025 北隆館

4) 田中達英、和中明生「神経免疫関連に着目した新規痛覚センシング機構」 BIO Clinica 40: 72-76, 2025 北隆館

5) 田中達英「マクロファージ-ニューロンのシグナル伝達を介した痛覚制御機構」 アレルギー&リウマチ性疾患 45: 709-713, 2025 北隆館

6) 田中達英「真皮マクロファージによる NGF を介した感覚センシング」 アレルギー&リウマチ性疾患 45: 856-860, 2025 北隆館

7) 田中達英「神経免疫関連による痛覚制御の新しいメカニズム」 アレルギー&リウマチ性疾患 45: 1041-1045, 2025 北隆館

8) Aung Ye Mun, 田中達英「神経近傍型マクロファージ：神経炎症と神経恒常性の調節因子」 Precision Medicine 9: 54-58, 2026 北隆館

2. 学会発表

1) Tanaka T. Neuroimmune Interactions in Pain Sensing Mechanisms. Keystone symposia, Neural-Immune Interactions: A Systems-Wide Perspective on Whole Organism Physiology

2) 田中達英「マクロファージ-ニューロンのシグナル伝達を介した感覚制御機構」
第 68 回日本神経化学会

3) 田中達英「マクロファージ-ニューロンのシグナル伝達を介した痛覚受容機構」
第 8 回感覚フロンティア研究シンポジウム

4) 田中 達英、Aung Ye Mun、和中 明生「神経 associate 型マクロファージに着目した内臓痛制御メカニズム」 第 98 回日本生化学会大会

5) Aung Ye Mun, 田中達英「Age-related immune cell alterations across organs」 第 98 回日本生化学会大会

6) 田中達英「過敏性腸症候群モデルマウスにおける末梢神経と免疫応答の連関」 JAPAN PAIN WEEK - JOINT CONFERENCE of 47th JASP, 18th JAMP, 29th JAPR and 30th

JSOP

7) 田中達英「神経免疫インターフェースから読み解く痛覚制御の新しいメカニズム：痛覚システムの多機能性に迫る」 JAPAN PAIN WEEK - JOINT CONFERENCE of 47th JASP, 18th JAMP, 29th JAPR and 30th JSOP

8) Aung Ye Mun, 田中達英「Age-Related Immune Cell Changes Across Multiple Organs」
第 18 回 NAGOYA グローバルリトリート

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし