

令和 2 年 7 月 9 日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10047

研究課題名(和文) ナトリウムチャンネルNav1.9遺伝子改変マウスを用いた痛みモニターの研究

研究課題名(英文) Pain and activity monitoring of Nav1.9 knock-in mouse

研究代表者

野口 篤子 (Noguchi, Atsuko)

秋田大学・医学系研究科・助教

研究者番号：70400497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)： Nav1.9ノックイン(KI)マウスの低温および低気圧環境での行動量を実験用運動量計測装置により定量した。通常気温(20-26℃)と低温(15℃)環境の比較において低温下では夜間活動量が増加し、KIマウスで顕著であった($p<0.05$)。病態としてKIマウスの環境温への過敏性亢進が行動変容をもたらしたことが推測された。一方通常気圧と比して+0.1気圧、-0.1気圧下では夜間活動量が減少し、この変化はKIマウス群、-0.1気圧下でより強かった($p<0.05$)。低気圧環境と低温環境においてKIマウスの行動量変化は逆の反応を示したが、いずれもKIマウス群での反応が有意に亢進していることが検証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近明らかになった「Nav1.9変異による遺伝性疼痛疾患」を基盤として、そのマウスモデルの行動観察を行うことにより、疾患モデルとして環境が誘導する疼痛発作の機序を解明することは、「痛み」という元来数値化可視化し難かった徴候をある程度客観的に評価でき、これまで不明だった低気圧や寒冷刺激と疼痛の関係性を知る手がかりになる可能性がある。またNav1.9遺伝子改変マウスにおいて、1)疼痛発作の誘導、2)疼痛発作のモニター、が確立できれば、新たな疼痛研究ユニット(実験系)として、疼痛制御、疼痛創薬などに繋がる可能性が高い。

研究成果の概要(英文)：The activity of Nav1.9 gene knock-in (KI) mice in low temperature and low atmospheric environments was quantified by an experimental momentum measuring device. In the comparison between the normal temperature (20-26℃) and the low temperature (15℃), the nighttime activity increased under the low temperature, which was more remarkable in KI mice ($p<0.05$). It was speculated that the hypersensitivity of KI mice to environmental temperature resulted in behavioral alterations. On the other hand, the nighttime activity amount decreased under +0.1 and -0.1 atm compared with the normal atmospheric pressure. This decrease was stronger in the KI mice group under -0.1 atmosphere ($p<0.05$). The behavioral changes of KI mice showed the opposite reaction in the low pressure environment and the low temperature environment, and it was verified that the reactivity to the low temperature and low pressure was significantly enhanced in the KI mouse group in both.

研究分野：小児科学

キーワード：Nav1.9 SCN11A 小児四肢疼痛発作症 ノックインマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

電位依存性 Na⁺チャネルを構成する 9 種の α サブユニット (Nav1.1~Nav1.9) の中で、Nav1.7・Nav1.8・Nav1.9 は感覚神経線維や小型侵害受容ニューロンに存在し疼痛伝導と関係する。最近 Nav1.9 が関与する先天性無痛症、小児発作性疼痛症、後期成人四肢疼痛症が報告された (Nat Genet 2013, Am J Hum Genet 2013, Brain 2014)。

申請者らは乳児期に発症する家族性の四肢疼痛発作症の 6 家系を見出してエクソーム解析を行い、Nav1.9 をコードする *SCN11A* 遺伝子に、これまで報告のない遺伝子変異 p.R222H (5 家系) と p.R222C (1 家系) を同定した (Plos One 2016)。

本疾患のヒトの臨床的特徴は、①我慢できない疼痛が発作性に出現、②20~30 分の疼痛持続、③四肢および膝肘関節に発症、④寒冷・低気圧・ストレスが誘因、⑤思春期以降は症状軽快、⑥他の合併症なく予後は良好、が共通である。その後申請者らは Nav1.9 (p.R222C) ノックインマウスを作成し、後根神経節細胞活動電位の観察から Nav1.9 の機能獲得変異 (gain of function) を証明した (Plos One 2016)。

一方、共同申請者尾野らが考案したピエゾセンサー方式心拍呼吸モニターは、生体下の敷物下に設置して使用するピエゾ素子方式心拍・呼吸センサーから成りヒトへの応用も広がっている。疼痛モニターの研究分野では疼痛の出現に伴う心拍数変動 (heart rate variability: HRV) が有力モニター項目とされ、ピエゾ素子方式センサーは疼痛出現の検出に有力と考えた。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト小児四肢疼痛発作症のモデル、Nav1.9 (p.R222S) 遺伝子改変マウスを用いた気温と気圧変化による行動観察を通し、ヒトの臨床型で認められる「寒冷、低気圧、ストレスなどの環境変化に応答した疼痛発作誘導」について推察する。

具体的な刺激環境として、1) 寒冷 (低温)、2) 低気圧を与え、疼痛発作の出現行動様式の変化を検出する

3. 研究の方法

(1) Scn11a p.R222S knock in mouse の作成

CRISPR/Cas9 法により作成した、Scn11a p.R222S knock in 系統 (Scn11aR222S/WT) の雄マウスから採取した精子と C57BL/6 系統の雌マウス (3 匹) の卵管膨大部より採取した未受精卵とを使用し体外受精を行ったのち、仮親 (ICR 系統の雌マウス) マウスに、二細胞期胚を移植した。その後出生したマウスの遺伝子型を確認するため TaqMan Genotyping Master Mix・Custom TaqMan SNP Genotyping Assays を用いてマウスの genotyping を行い、knock in マウスの選別を行った。

(2) ピエゾ素子方式心拍・呼吸モニターによるマウスの行動観察

正常マウスおよびノックインマウスに対し、非侵襲性ピエゾ素子方式心拍呼吸モニターを用いて自律神経系の変化を検出し、疼痛刺激と心拍数・呼吸数の関係を明らかにすることを試みた。コンベンショナルな心電計を用いた、疼痛と心拍数の解析で、心拍変動 (heart rate variability: HRV) の変化と疼痛の関係を評価する。マウスにおける“痛み”とピエゾ素子方式心拍呼吸モニターにおけるモニター化を確立することを目標に基礎データの収集を行った。

(3) 動物実験用運動量計測装置「nano tag[®]」による行動観察

当初、上記のピエゾ素子方式心拍・呼吸モニターで自律神経系の変動を検出して、疼痛発作の誘導方法の確立、持続時間、疼痛発作の解除の条件などを明らかにする予定であったが、後述のごとく本方法ではデータの妥当性に疑問が生じたことから、途中で中断し、手法を変更した。

代替の行動量の評価手法として、動物実験用運動量計測装置「nano tag®」を導入した。6-8 週齢の正常マウス及び Nav1.9(p. R222S) 遺伝子改変マウスの背部皮下組織内に、運動量モニタリングのためのチップを埋め込み、行動量のデータを蓄積した。チップ内データを PC にて読み出し、24 時間の観察期間の行動量を比較した。

a) 温度の影響の評価

通常環境温、15°C、10°C 下での 24 時間行動量を 1 時間ごとの数値として定量化した。環境温の設定は、小動物用温度調節機能付きチャンバーを用いた。本装置は小動物に対して飼育環境下で温度プログラムにより寒冷刺激あるいは温暖刺激を与えて自律神経系も加えた各種モニターが可能な装置である。このチャンバーを用いてマウスに各パターンの寒冷刺激を与えて、行動変化の有無を観察した。モニターは連続記録できることから日内変動や発作の性状も明らかにした。

b) 気圧の影響の評価

通常大気圧、気圧変動チャンバー内で設定した +0.1 気圧、-0.1 気圧下における、正常マウスとノックインマウスの行動を定量化した。

これらの行動は同時にビデオカメラでも一部を録画し、目視での行動変化の有無を観察した。

4. 研究成果

(1) Scn11a R222S knock in mouse の作成

上述の方法でノックインマウスを作成した。

(2) ピエゾ素子方式モニターによる行動観察

正常マウスに疼痛刺激を与え、ピエゾ素子方式心拍・呼吸モニターにて自律神経系の変化の検出を試みた。次に、上記にて作成した Nav1.9(p. R222S) 遺伝子改変マウスの行動観察を行い、通常の飼育環境下で行動様式の変化がないことを観察したうえで、自然環境下における気圧変動（外気の気圧を連続モニタリング）し、および気圧変動チャンバー内での低気圧下でのマウスの行動観察を行った。しかしマウス行動が多様で粗大運動が目立つためにヒトよりもアーチファクトが膨大であり、大気圧変動による微細な変化を描出することが困難であった。

(3) 動物実験用運動量計測装置「nano tag®」による行動観察

動物実験用運動量計測装置「nano tag®」を導入した。6-8 週齢各マウスの背部皮下組織内に、運動量モニタリングのためのチップを埋め込み、データを連続的に蓄積した。チップ内データを PC にて読み出し、ピエゾ素子方式モニターでは評価困難な粗大な運動量の記録を行い、24 時間の行動量を比較した。

a) 温度の影響の評価

通常の飼育環境下（20-26°C、通常大気圧）での行動量を正常及び変異マウスで比較し、その後 15°C および 10°C 下での観察を行った。正常マウス群およびノックインマウス群各 4 匹に対し複数回の計測を行い、8-9 回の計測データを得た。この正常マウスの環境温度を変化させたところ、行動が活発となる 21-22 時にかけては、通常環境と 15°C 環境とにおいて有意に活動の増加を得た。10°C 環境ではやや活動量が減少したが有意差はなかった。（図 1 は正常マウス 4 匹の 9 日分の活動量の平均値である。全図グラフの縦軸は activity count/hr を示す）このような夜間活動量の増加はノックインマウスにおいても観察された。15°C 環境下では通常環境温に比して有意に活動量が増加した（図 2 にノックインマウス 4 匹の 9 回分の記録の平均値を示す）。

次に、正常マウスとノックインマウスの通常環境温下での活動量を比較した（図 3）。両者は最も活動量の上がる 20-0 時においても有意差はなかった。すなわち通常環境下においてはノック

インマウスの明らかな行動量の変化はないことが確認された。

15°Cの環境温下では、20.0.6時台においてノックインマウス群の活動量の増加が観察された(図4)。この傾向は次に実施した10°C環境温においても同様であったが、15°Cに比して全体に活動量は減少する傾向がみられた(図5)。

以上より、

*両群ともに15°C低温環境下においては活動量の増加がみられる傾向にあった。15°Cと10°Cでは差はなかった。

*両群の比較において、有意にノックインマウス群での活動量の増加($p > 0.05$)が認められた。この差は夜間活動の始まる20-21時頃に観察されその後差は目立たなくなった。

運動量測定装置 nano tag の導入により行動量の客観的な計測が可能になった。しかしその一方でマウスの個体差が大きく、行動を規定する要因が多様であるために、単一の刺激による疼痛行動テストとは異なって様の結果を得るのに難渋した。実際の疼痛発作と薬剤効果判定、遺伝子変異の関係性を評価するにはさらなる工夫を要すると考えられた。

今後の研究の推進方策

行動変化の評価方法について再検討する。24時間の通常観察では差異が確認できない可能性が高いことから、短時間の疼痛行動テスト(Von Frey test, etc)に切り替え、その実施条件に温度変化や気圧変化を加えることを考慮する。

図1

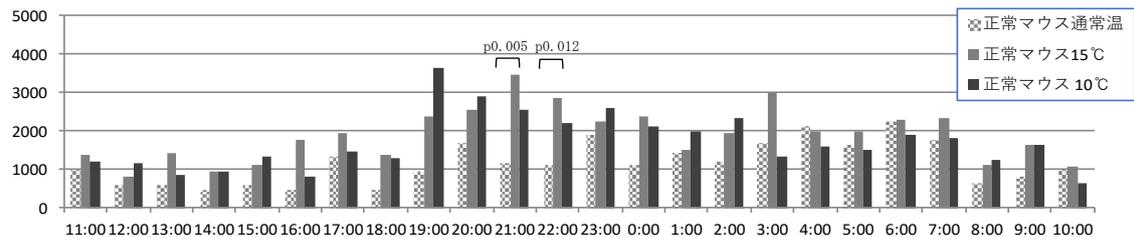


図2

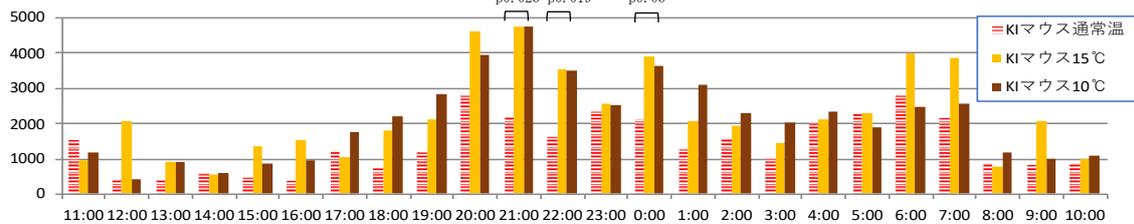


図3

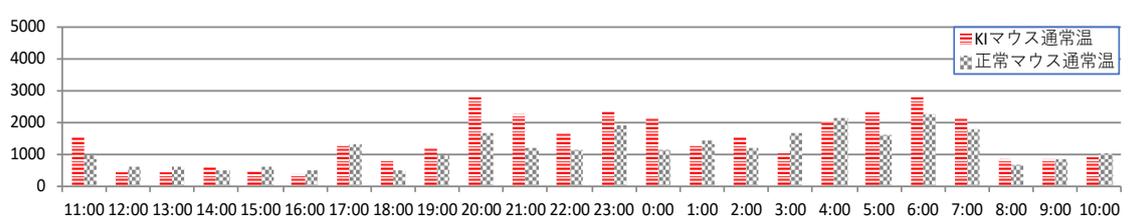


図4

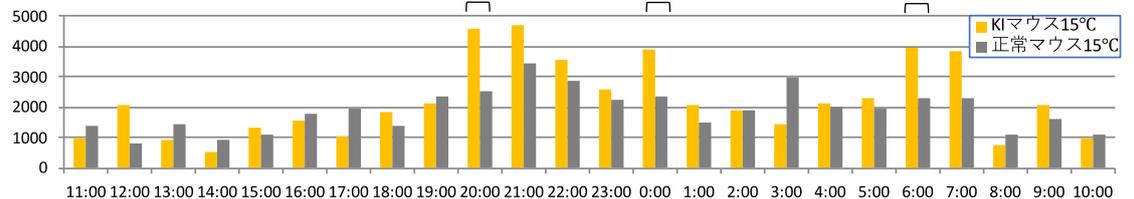


図 5

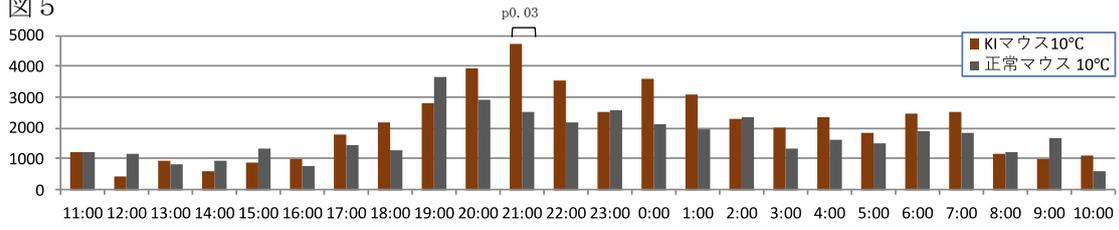


図 6

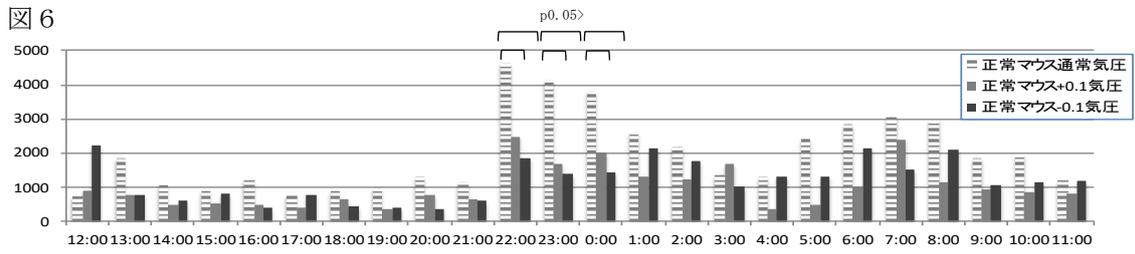
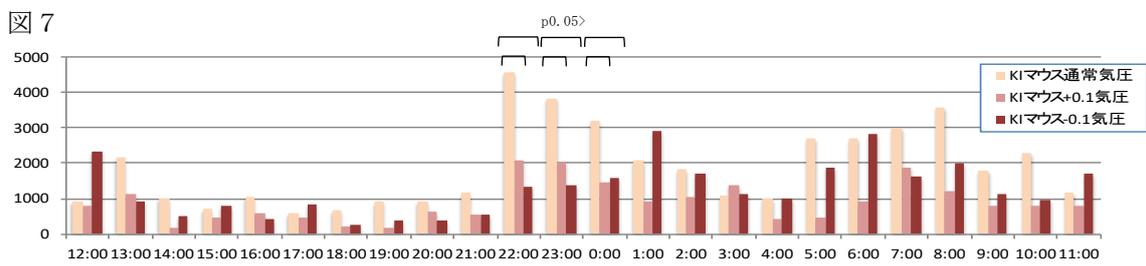


図 7



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	高橋 勉 (Takahashi Tsutomu) (20270845)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究分担者	尾野 恭一 (Ono Kyoichi) (70185635)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	