

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16443

研究課題名(和文)先天性無痛症に関連する変異遺伝子によるナトリウムチャンネル機能の解明

研究課題名(英文)Evaluation of sodium channel function associated with congenital insensitivity

研究代表者

清澤 研吉(Kiyosawa, Kenkichi)

信州大学・医学部附属病院・助教(特定雇用)

研究者番号：50624772

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):先天性無痛症患者の遺伝子変異による変異NaV1.7チャンネルの機能解析とNaV1.7変異マウスを持ちいた行動実験評価を行なうこととした。変異NaV1.7チャンネル機能解析はパッチクランプ法を用いて行い、電流電圧連関におけるピーク電流の右方シフトおよびRamp pulse currentの減少が確認できた。本変異部位以外での1塩基置換によるチャンネル機能解析はいたらなかった。行動実験では機械性侵害刺激に対する応答が減衰していること、この変異マウスに協調運動障害は見られないことも確認できた。またこの変異マウスより後根神経節を単離し電気生理学的な機能評価を試みたが、研究期間内では測定に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医療者および急性・慢性痛患者にとって、より安全により痛みだけを除ける理想的な鎮痛薬の開発が期待されている。我々は、痛み刺激に対する感受性が欠失しているという先天性無痛症患者に出会った。本症例は電位依存性ナトリウムチャンネルの変異が関与していた。この変異ナトリウムチャンネルの解析を行うことで、局所麻酔薬に代表されるナトリウムチャンネル阻害薬の新規ターゲットとなるタンパク部位が同定できれば、理想的な鎮痛薬の開発の一助となりうる。

研究成果の概要(英文):We analyzed the function of the mutant NaV1.7 channel in patients with congenital insensitivity of pain. NaV1.7 channel function analysis was performed using the patch clamp method. It was confirmed the average peak current density of mutation channels was significantly smaller than Wild-Type channels, and the current-voltage relationship of mutation channels showed a tendency to shift slightly to the right of WT current-voltage relationship. We evaluated the behavioral experiment with NaV1.7 mutant mice. For testing mechanical responses, calibrated von Frey filaments were applied. The response to mechanical noxious stimuli was found to be diminished. We also isolated the dorsal root ganglion from this mutant mouse and attempted to evaluate its electrophysiological function, but it was not measured within the study period.

研究分野：麻酔

キーワード：電位依存性ナトリウムチャンネル 先天性無痛症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全ての医療者および急性・慢性疼痛患者にとって、既存の鎮痛薬では疼痛がコントロールできないことにしばしば遭遇する。オピオイドをはじめとする中枢神経系に作用点を持つ薬物は、意識・神経症状・呼吸・悪心など中枢神経系副作用が必発する。そのため痛覚伝導/伝達経路のみ存在する分子をターゲットにした薬物開発が求められている。

末梢神経に特異的に存在する Nav1.7 のサブユニットをコードする SCN9A 遺伝子変異による無痛症患者が初めて報告されて以来 (Cox et al., Nature 2006), Nav1.7 は局所麻酔薬中毒などの中枢性副作用を起こさない新規鎮痛薬のターゲットとして期待されてきた。電位依存性チャネルは、電位センサー部位が膜電位の脱分極を感知して動くことで、イオン流入部位であるポアが開口することが知られている。我々は先天性無痛症患者に会うことができた。患者は知能・発達・自律神経系は正常だが、熱性および機械性痛覚の低下のみを呈していた。遺伝子解析により、この家系の変異部は新規の SCN9A 変異であることが判明した。そこで本患者の変異 Nav1.7 の機能解析を行うことでナトリウムチャネルの機能が評価につながると考えた。さらにはチャネル機能に応じた新規 Nav 阻害薬開発の一助となると考えられた。

2. 研究の目的

我々が発見した先天性無痛症患者は、遺伝子解析により Nav1.7 のポア周囲のアミノ酸置換が原因で構造が変化しナトリウムチャネル機能に影響が起きていることが考えられた(図1) 変異 Nav1.7 チャネル機能を解析することでナトリウムチャネルにおけるナトリウムイオン透過の制御機構の検討を行い、新規 Nav1.7 阻害薬のターゲットとなるタンパク部位の探索を最終目的とした。

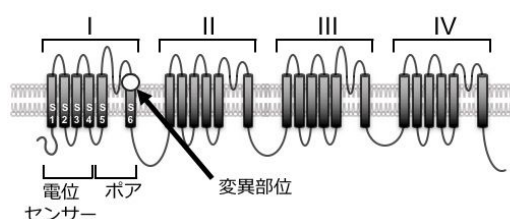


図1. 電位依存性ナトリウムチャネルの二次構造と変異部位

3. 研究の方法

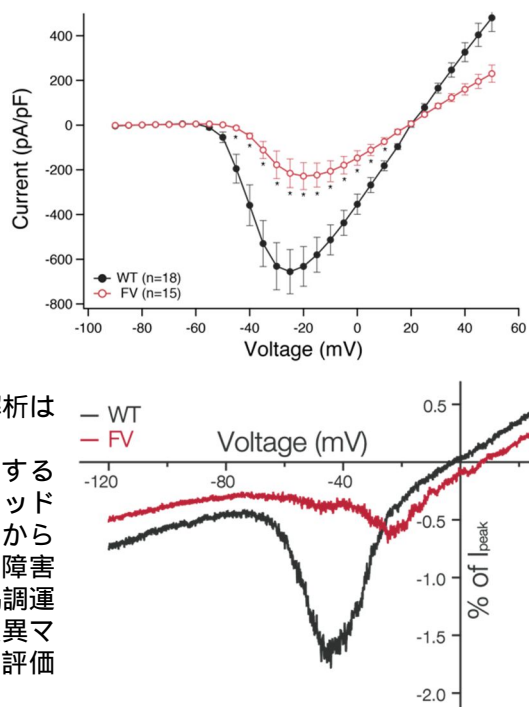
変異のない Nav1.7, 本変異 Nav1.7 をサブユニットと共に tsA201 細胞に強制発現させ、ホールセルパッチクランプ法で解析を行う。

また本患者と同様の遺伝子変異をマウスに導入し遺伝子改変マウスを作成する。遺伝子変異マウスに対し機械性侵害刺激・熱性侵害刺激をくわえ侵害刺激に対する応答(機械刺激逃避閾値・熱刺激逃避潜時)を行動実験で評価する。その後遺伝子改変マウスの後根神経節を用いてパッチクランプ法による電気生理学実験を計画した。

4. 研究成果

変異 Nav1.7 チャネル機能をパッチクランプ法を用いて機能解析を行い、電流電圧連関におけるピーク電流の減少および右方シフト(右上図)が確認できた。Ramp pulse current の検討では変異 Nav1.7 チャネルにおける電流の減少が確認できた(右下図)。不活性化曲線の検討ではピーク電流のわずかな脱分極側へのシフトが確認できた。また、活性化曲線の立ち上がり方がより脱分極側へシフトしたことで、ウィンドウカレントが減少し、ランプパルス電流の減少がみられたと考えられた。本変異部位以外での1塩基置換によるチャネル機能解析はいたらなかった。

マウスを用いた行動実験では機械性侵害刺激に対する応答が減衰していることが確認できた。またロタロッド試験で変異型と野生型の協調運動に差がないことから変異の導入によって少なくとも予定外の協調運動障害は認めないことが確認できた。この変異マウスに協調運動障害が見られないことも確認できた。またこの変異マウスより後根神経節を単離し電気生理学的な機能評価



を行なっているが、ピペット作成など安定した測定条件の確立に難渋し測定には至らなかった。一方で電流の測定が困難な原因としてチャンネルが膜に発現しにくい可能性も考えられるため Nav1.7 の gating charge を抽出できればチャンネルの発現量に言及できると考えその測定が必要と考えている。

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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------