

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20602020

研究課題名 (和文) 鎮痛薬感受性個人差における GIRK チャネル遺伝子多型の役割の解明

研究課題名 (英文) The role of GIRK channel gene polymorphisms in the individual differences in sensitivity to analgesics

研究代表者

西澤 大輔 (NISHIZAWA DAISUKE)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・流動研究員

研究者番号：80450584

研究成果の概要 (和文) : 脳型 GIRK チャネル遺伝子 *GIRK1*~*GIRK3* において同定された多型に関して関連解析を行ったところ、*GIRK3* における C1339T、C1781T 及び C1817T 多型が下顎形成外科手術後または開腹術後 24 時間のオピオイド鎮痛薬投与量との間に有意な関連を認めた。特に、C1781T 及び C1817T 多型に関しては、鎮痛薬感受性と mRNA の発現量が相関しており、*GIRK3* 遺伝子発現が鎮痛効果に影響する可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文) : In association studies targeting genetic polymorphisms identified in brain-type *GIRK1*-*GIRK3* genes, significant associations were found between the *GIRK3* C1339T, C1781T and C1817T polymorphisms and requirements of postoperative 24-h opioid analgesics after major open abdominal surgery or painful orofacial cosmetic surgery. In particular, there were significant associations in the C1781T and C1817T between analgesic requirements and mRNA expressions, suggesting that the *GIRK3* mRNA expression could affect the analgesic effects of opioids.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：分子精神医学

科研費の分科・細目：時限・疼痛学

キーワード：鎮痛薬感受性個人差、GIRK チャネル、遺伝子多型、薬理遺伝学、個別化医療、関連研究

1. 研究開始当初の背景

(1) 我が国での鎮痛薬を用いた疼痛治療は、欧米に比べて未だ不十分な状態であり、患者の QOL が大きく低下している。モルヒネに代表されるオピオイド類は強力な鎮痛作用を持つ鎮痛薬として今日の医療現場においても広く利用されているが、これらオピオイド系鎮痛薬の鎮痛効果や依存、耐性などの副作用出現には個人差があり、臨床上、効果的な

疼痛治療を妨げている大きな原因の一つである。

(2) このような鎮痛作用発現にはオピオイドシステムが深く関わっている。これまでにオピオイド物質のターゲットであるオピオイド受容体に関しては、遺伝子多型及びその多型間の連鎖不平衡解析が進んでいる (Ikeda K et al. Trends Pharmacol Sci. 2005

Jun;26(6):311-7.)。特にミューオピオイド受容体遺伝子多型に関しては、研究代表者の所属研究室による報告を含め依存症との関連が多数報告されているばかりでなく、オピオイド系鎮痛薬の薬効との間に有意な関連を示す遺伝子多型が複数同定されるに至っている (Hayashida M et al. Pharmacogenomics 2008 Nov;9(11):1605-16, Fukuda K et al. Pain 2009 Dec;147(1-3):194-201.)。しかし、オピオイド受容体の下流にあるエフェクターの一種で、鎮痛作用の鍵となる重要な分子である (Ikeda K et al. Neurosci Res. 2002 Oct;44(2):121-131.), G 蛋白質活性型内向き整流性カリウムチャンネル (GIRK チャンネル) に関しては、国内外を問わず鎮痛作用の個人差との関連を示す多型の報告は他に例が無い。

(3) 研究代表者らはこれまで、このようにヒトにおいて鎮痛作用の個人差との関連の研究が進んでいない GIRK チャンネルに焦点を当て、その遺伝的な個人差に着目するに至った。これまでの探索的な研究において、ヒトにおける GIRK1~GIRK4 サブユニットのうち、*GIRK2* の遺伝子の全遺伝子領域などに関して網羅的に多型を同定し、そのうちの1つの SNP (Single Nucleotide Polymorphism: 一塩基多型) である A1032G 多型が、鎮痛薬感受性と有意に関連することを見出した。しかし、この翻訳領域の同義多型がどのようなメカニズムで鎮痛薬感受性を変化させるのか、また周辺多型を含めたハプロタイプ解析や他のサブユニットに関する解析などはなされておらず、未だ十分とは言えない。

2. 研究の目的

(1) 本研究においては、临床上、効果的な疼痛治療を妨げている鎮痛薬感受性の個人差と GIRK チャンネル遺伝子との関連についての包括的な解析を行い、さらにはそれを実際の臨床の現場への応用をも試みることを目指す。

3. 研究の方法

(1) GIRK チャンネル遺伝子多型の包括的関連解析

「サンプル及び臨床データ収集」

研究に用いるサンプルは、主に下記である。

(i) 下顎形成外科手術後において鎮痛薬を投与された術後疼痛治療患者 (投与量予測無し)

研究代表者及び研究分担者の共同研究先である東京歯科大学水道橋病院において、下顎骨切り術を受ける 15-60 歳の外科患者のうち、研究の趣旨に対し文書同意したものを対

象とする。これらの患者に対し、手術前に末梢血を採血し、DNA を抽出・精製後、遺伝子解析に用いる。術後鎮痛法は、患者が痛みを感じたときにポンプのボタンを押すことによってフェンタニル等の一定量の鎮痛薬を静脈内自己投与する静脈内鎮痛薬自己投与法 (PCA: Patient-controlled analgesia 法) にて行う。術後 24 時間内鎮痛薬自己投与量、手術終了 3 時間後と 24 時間後の痛みの強さの尺度の測定を通して鎮痛薬の鎮痛効果を評価する。また、嘔気、嘔吐、搔痒、呼吸抑制などの副作用発生有無と程度についても調査する。この (i) のサンプルは、研究開始当初段階において研究分担者の池田を中心に収集されたものが臨床データとともに既に 200 近くが所属先の東京都精神医学総合研究所に保管されていたが、解析における統計的な検出力を高めるため、その後も引き続き収集している。

「遺伝子型判別」

解析多型の遺伝子型判別には、アリル特異的 PCR 法や PCR-RFLP などの簡便かつ安価な方法で行い、必要に応じてダイレクトシーケンス法を用いる。

「関連解析」

脳型 GIRK チャンネル遺伝子 *GIRK1*~*GIRK3* の多型に関して、遺伝子型やハプロタイプと表現型となる鎮痛薬感受性との関連を包括的に調べる。

(2) GIRK チャンネル遺伝子多型判別を用いた応用的臨床研究

「予測に基づく投与鎮痛薬量及び実際の鎮痛効果の相関に関する検討」

研究に用いるサンプルは、(1) (i) 以外に、下記も用いる。

(ii) 下顎形成外科手術後において鎮痛薬を投与された術後疼痛治療患者 (投与量予測有り)

これに関しても (1) (i) と同様に東京歯科大学水道橋病院において池田が中心となり臨床データとともに収集するが、サンプルの GIRK チャンネル遺伝子多型情報より鎮痛薬の鎮痛効果や副作用などを予測し、鎮痛効果が高いと予測される患者には少量の鎮痛薬を、低いと予測される患者群には多量の鎮痛薬を投与するように計画する。その比較のための対照群においては、全ての患者に等量の鎮痛薬を投与するように計画する。

予測された痛薬投与必要量が、実際に妥当なものであったかどうかを検討する。術後 24 時間内鎮痛薬自己投与量、手術終了 3 時間後、24 時間後の痛みの強さの尺度の測定結果に基づき、予測された鎮痛薬量を投与された実験群が、対照群に比べていずれも必要十分な鎮痛薬の鎮痛効果が得られていたかどうかを評価する。また、鎮痛薬の副作用発生有無

との関連に関しても調べ、予測の妥当性を検証する。

(3) GIRK チャンネル遺伝子多型が影響する機能の解析

関連解析において遺伝子型と表現型との間で統計的に有意な相関が認められた多型に関しては、適宜様々な *in vitro* の実験を駆使して機能的な解析を行い、そのメカニズムを解明する。

例えば有意な相関が認められた多型が翻訳領域における非同義置換であった場合、多型によるアミノ酸置換を伴う 2 種の GIRK チャンネルタンパク質を発現させ、機能の違いを比べる。また、多型がプロモーター領域のものであった場合、ルシフェラーゼアッセイなどのプロモーター活性を測定する実験を行い、多型が発現量に与える効果を明らかにする。

4. 研究成果

(1) GIRK チャンネル遺伝子多型の包括的関連解析

「サンプル及び臨床データ収集」

3. (1) (i) のサンプル及び臨床データ収集を行い、研究期間全体において約百数十例、研究開始当初段階において保管されていたものと併せて合計では 360 症例以上を収集した。

臨床データにおいて、嘔気、嘔吐、搔痒、呼吸抑制などの副作用発生の無い症例が圧倒的多数であり、これらの副作用発生に関しては遺伝子多型との関連解析は行わないこととした。

「遺伝子型判別」

「関連解析」

ヒトにおける脳型 GIRK チャンネルの GIRK1 ~GIRK3 のサブユニットのうちまだ調べられていない *GIRK1* の遺伝子の全エクソン及びプロモーター領域、エクソンとイントロンの境界領域などに関してダイレクトシーケンスにより多型探索を行ったところ、プロモーター領域に 4 個、エクソン 1 に 1 個、またエクソン 3 に 1 個、合計 6 個の一塩基多型 (SNP) を同定した。その後連鎖不平衡解析を行い、プロモーター領域の 2 個及びエクソン 1 の 1 個の SNP の間において絶対連鎖不平衡 ($D' = 1, R^2 = 1$) となっていることを認めた。ところが、これらの SNP はいずれも対立遺伝子頻度は 5~6%程度以下で比較的低く、十分な統計的検出力を得られない可能性が高いため、関連解析は行わなかった。

同様に、*GIRK3* の遺伝子の全エクソン及びプロモーター領域、エクソンとイントロンの境界領域などに関してダイレクトシーケンスにより多型探索を行ったところ、プロモ-

ーター領域に 4 個、またエクソン 3 に 6 個、合計 10 個の SNPs を同定した。その後連鎖不平衡解析を行い、プロモーター領域の 2 個及びエクソン 3 の 2 個の SNP の間においてそれぞれ絶対連鎖不平衡 ($D' = 1, R^2 = 1$) となっていることを認めた。

GIRK2 における G-1250A 及び A1032G 多型に関して PCR-RFLP 法により遺伝子型を決定し 3. (1) (i) の 362 人のサンプルに関して関連解析を行ったが、鎮痛薬感受性との間に有意な関連は認められなかった。

また、*GIRK3* の C-968G、C1339T、C1781T、C1817T、G2069A の 5SNPs を対象として PCR-RFLP 法及びダイレクトシーケンスにより遺伝子型を決定し 3. (1) (i) の 362 人のサンプルに関して関連解析を行ったところ、非同義の C1339T 多型が術後 24 時間のフェンタニル投与量との間に有意な関連を認めた。

一方、本研究と並行して別に収集された、開腹術後において鎮痛薬を投与された術後疼痛治療患者 112 人のサンプルに関して解析したところ、*GIRK3* の非翻訳領域における C1781T 及び C1817T 多型が術後 24 時間の鎮痛薬総投与回数及び総投与量との間に有意な関連を認めた (図 1)。

これらの *GIRK3* の多型は鎮痛薬感受性のマーカー多型となる可能性が考えられた。

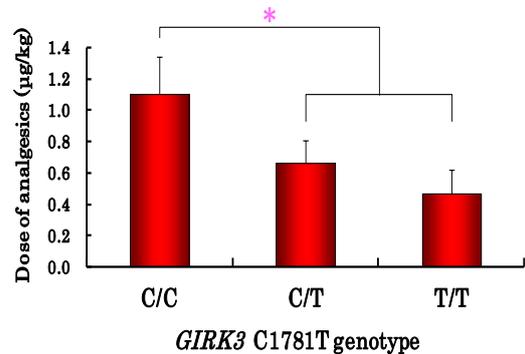


図 1

*: $P < 0.05$

(2) GIRK チャンネル遺伝子多型判別を用いた応用的臨床研究

3. (1) (i) のサンプルを用いた関連解析により、*GIRK3* の C1339T 多型が術後 24 時間のフェンタニル投与量との間に有意な関連を認めた。従って、この多型をマーカー多型として利用し 3. (1) (i) 及び 3. (2) (ii) のサンプルを用いる応用的臨床研究を計画し、共同研究先の東京歯科大学水道橋病院において、関係する研究倫理申請書を提出した。承認が得られ次第、研究を開始予定である。

(3) GIRK チャンネル遺伝子多型が影響する機能の解析

既に鎮痛薬感受性との関連が示されている *GIRK2* の翻訳領域の同義多型 A1032G に関して、遺伝子型特異的な mRNA の発現の多寡を比較した。具体的には、先行研究において *GIRK2* の mRNA はヒトの脳での発現が示されていることから、この多型の遺伝子型が A/A、A/G、及び G/G のヒトの脳組織より抽出された RNA を脳バンクから収集し、リアルタイム PCR を用いて mRNA の発現を遺伝子型間で比較したところ、鎮痛薬感受性の低い A/A の遺伝子型においては他の遺伝子型に比べて、mRNA の発現が有意に低かった。この遺伝子型の患者では、鎮痛作用発現において重要な *GIRK2* の発現量が低下することにより鎮痛作用が低下し、その結果鎮痛薬感受性が低下している可能性が示唆された。

一方、4. (1)において鎮痛薬感受性との関連が示された *GIRK3* の C1781T 及び C1817T 多型に関して、同様に遺伝子型特異的な mRNA の発現の多寡を比較した。この多型の遺伝子型が C/C、C/T、及び T/T のヒトの脳組織より抽出された RNA を脳バンクから収集し、リアルタイム PCR を用いて mRNA の発現を遺伝子型間で比較したところ、鎮痛薬感受性の低い C/C の遺伝子型においては、C1781T に関しては T/T の遺伝子型と比べ、C1817T に関しては C/T + T/T の遺伝子型に比べて、mRNA の発現が有意に低かった。この遺伝子型の患者では、鎮痛作用発現において重要な *GIRK3* の発現量が低下することにより鎮痛作用が低下し、その結果鎮痛薬感受性が低下している可能性が示唆された (図 2)。

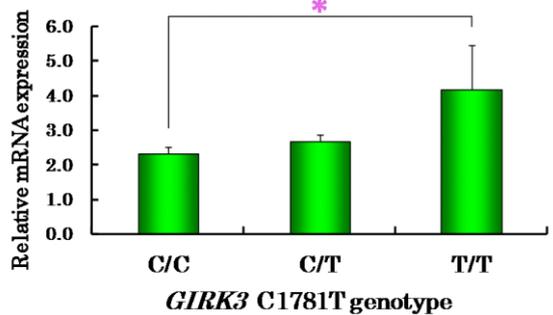


図 2

*: $P < 0.05$

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Nishizawa D, Gajya N, Ikeda K, Identification of Selective Agonists and Antagonists to G Protein-Activated Inwardly Rectifying Potassium Channels:

Candidate Medicines for Drug Dependence and Pain, Current Neuropharmacology, 査読無、Vol. 9、2011、pp.113-117

- ② Nishizawa D, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Kasai S, Ogai Y, Han W, Hasegawa J, Shimoyama N, Sora I, Hayashida M, Ikeda K, Association between *KCNJ6* (*GIRK2*) Gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery, PLoS ONE、査読有、4 巻、2009、e7060
- ③ 西澤大輔, 長島誠, 佐藤泰雄, 田上恵, 池田和隆, 遺伝子多型と疼痛感受性, オピオイド感受性—基礎および臨床のデータから—, 麻酔, 査読有、58 巻、2009、pp.1093-1101

[学会発表] (計 7 件)

- ① Nishizawa D, Nagashima M, Kato R, Sato Y, Tagami M, Kasai S, Ogai Y, Hasegawa J, Hayashida M, Ikeda K, Association between *GIRK3* gene polymorphisms and postoperative analgesic requirements after major abdominal surgery, The American Society of Human Genetics 60th Annual Meeting, Washington DC, USA、2010 年 11 月 3 日
- ② 西澤大輔, 池田和隆, 遺伝子解析による術後疼痛、がん性疼痛マネジメントへの貢献、第 4 回日本緩和医療薬学会年会、鹿児島、2010 年 9 月 25 日
- ③ 西澤大輔, 長島誠, 加藤良二, 佐藤泰雄, 田上恵, 笠井慎也, 大谷保和, 長谷川準子, 林田眞和, 池田和隆, *GIRK* チャネルサブユニット *GIRK3* の遺伝子多型と開腹術後鎮痛との関連、第 40 回日本神経精神薬理学会、仙台、2010 年 9 月 17 日
- ④ Ikeda K, Nishizawa D, Kasai S, Fukuda K, Hayashida M, Polymorphisms of the genes encoding the mu-opioid receptor and *GIRK2* (*KCNJ6*) are associated with postoperative opioid requirements, CINP 2010, Hong kong, 2010 年 6 月 8 日
- ⑤ Nishizawa D, Nagashima M, Katoh R, Satoh Y, Tagami M, Kasai S, Ogai Y, Han W, Hasegawa J, Shimoyama N, Sora I, Hayashida M, Ikeda K, *GIRK* チャネル遺伝子 *GIRK2* の遺伝子多型と開腹術後鎮痛との関連、第 39 回日本神経精神薬理学会、京都、2009 年 11 月 14 日

[図書] (計 1 件)

- ① Nishizawa D, Hayashida M, Nagashima M, Koga H, Ikeda K, Totowa: The humana press Inc., Genetic polymorphisms and

human sensitivity to opioid analgesics,
In: Methods in Molecular Biology, 2010,
pp. 395-420

[産業財産権]

○取得状況 (計4件)

名称 : Method of evaluating
drug-sensitivity by analyzing the
GIRK channel genes

発明者 : Ikeda K, Hayashida M, Nishizawa D,
Sora I

権利者 : 財団法人東京都医学研究機構

種類 : 特許

番号 : Britain Part of the European Patent
Office, EP(UK)No.1895016

取得年月日 : 22年9月6日

国内外の別 : 外国

名称 : Method of evaluating
drug-sensitivity by analyzing the
GIRK channel genes

発明者 : Ikeda K, Hayashida M, Nishizawa D,
Sora I

権利者 : 財団法人東京都医学研究機構

種類 : 特許

番号 : German Part of the European Patent
Office, 602007007697.8-08

取得年月日 : 22年7月28日

国内外の別 : 外国

名称 : Method of evaluating
drug-sensitivity by analyzing the
GIRK channel genes

発明者 : Ikeda K, Hayashida M, Nishizawa D,
Sora I

権利者 : 財団法人東京都医学研究機構

種類 : 特許

番号 : France Part of the European Patent
Office, E1895016

取得年月日 : 22年7月14日

国内外の別 : 外国

名称 : Method of evaluating
drug-sensitivity by analyzing the
GIRK channel genes

発明者 : Ikeda K, Hayashida M, Nishizawa D,
Sora I

権利者 : 財団法人東京都医学研究機構

種類 : 特許

番号 : European Patent Office, 1895016

取得年月日 : 22年7月14日

国内外の別 : 外国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西澤 大輔 (NISHIZAWA DAISUKE)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神

医学総合研究所・流動研究員

研究者番号 : 80450584

(2) 研究分担者

池田 和隆 (IKEDA KAZUTAKA)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神

医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号 : 60281656