

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670330

研究課題名(和文) 周期性四肢疼痛に関わる新規遺伝子の同定と予防及び創薬への応用

研究課題名(英文) Identification of a novel pain gene and its application to prevention and drug development

研究代表者

小泉 昭夫 (KOIZUMI, Akio)

京都大学・医学研究科・教授

研究者番号：50124574

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：疼痛家系参加者28名の3家系の遺伝解析の結果、Nav1.9 R222H、R222S変異を見出した。変異は一般人口150名には認められなかった。全国24家系の患者を解析し、新たに5家系でR222H変異、3家系で新たな3変異を見出した。これらの家系では低気圧と寒冷曝露で痛みは誘発され、成人期に寛解した。消化器症状は明確ではない。ヒトNav1.9 R222Sに相同な部位に変異を入れたKnock-in mouseを作成した。マウスでは行動実験および電気生理学的に興奮閾値の低下が証明された。以上から、Nav1.9は家族性の小児四肢疼痛症の原因と特定された。今後、本症の予防および創薬への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genetic investigation of 3 pedigrees of paroxysmal limb intermittent pain (PLIP), which had 28 members, revealed Nav1.9 R222H or R222S mutation as a causative polymorphism. These polymorphisms were not found in a 150 Japanese controls. Further nation-wide investigation found 24 new families suspected of PLIP. Genetic investigation revealed R222H in 5 families and 3 novel mutations in 3 families. In those families, limb pain was induced by low atmospheric pressure and cold weather in affected members. Their symptoms were ameliorated by growth and aging. Symptoms of GI tract were not detected. Knock-in mice which harbor R222S was proven to have elevated sensitivity to the pain by behavioral test batteries and by electrophysiological examinations. This study demonstrated that Nav1.9 causes PLIP and will pave a way to develop a prevention strategy and new therapeutic approach.

研究分野：環境衛生学

キーワード：分子疫学 痛みの遺伝学 創薬

1. 研究開始当初の背景

四肢の大関節の慢性疼痛は高齢者に有病率が高く、QOL を損なうものとして重要である。現在の医療では、通常の痛み止め (Non-steroidal anti-inflammatory drugs: NSAIDs) や Opioid、局所麻酔薬等が対症的に処方されているが、鎮痛には依存性など課題があり、疼痛の本態の解明による分子標的の探索と特異的薬剤の開発が必要である。近年、無痛症の家系や慢性疼痛の家系において遺伝解析がなされ新たな薬物治療の分子標的が見出されてきた。SCN9A は、遺伝性の Inherited erythromelalgia の家系解析で見出された。また遺伝性の Small fiber neuropathy の遺伝解析では、SCN10A が見出されてきた。前者はてんかんを伴い、後者では心臓の Burugada 症候群や自律神経症状を伴う。両疾患とも思春期以降にはじまり加齢とともに悪化する。また温熱曝露で誘発され寒冷曝露で軽減される。

我々は、上記 2 遺伝子の変異では説明できない疼痛症状を示す慢性疼痛家系 4 家系を見出した。疼痛症状は、乳児期よりはじまり四肢の大関節に定期的に繰り返し、成長とともに症状が軽減する。これら家系では、常染色体優性遺伝形式で非炎症性の疼痛発作の形質が伝わっている。また、これら家系では、痛み性状は ~ (2. 研究目的参照) の特徴を有し、既存の遺伝性疼痛の形質と好対照をなす。本研究では、国内 4 家系が参加し、慢性疼痛の新たなメカニズムの解明を 4 家系の遺伝解析を通じて行う。また同時に、神経障害が感覚神経の形質的幼弱化 (糖鎖修飾の変化などの機序による) を引き起こすことから、高齢者の大関節の痛みへの寄与についても遺伝疫学的検討を行う。

2. 研究の目的

四肢の大関節の慢性疼痛は高齢者に多く、QOL を損なうものとして重要である。近年、新規薬剤の分子標的の発見には、遺伝解析が有望な方法として登場してきた。我々は、既報の慢性疼痛家系と明らかに異なる遺伝性慢性疼痛 (乳児期からはじまり青年期に寛解する、周期的に、四肢大関節に痛みを伴い、寒冷曝露で悪化し温熱曝露で改善し、他合併症を伴わず、炎症性鎮痛剤 (NSAIDs) が症状を軽減する) をしめし、その表現型を常染色体優性遺伝形式で伝える家系 4 家系を見出した。これら家系に、次世代シーケンサーと連鎖解析を併用し遺伝子を同定するとともに、Knock-in mouse を作成し機能解析を行う。さらに高齢者での痛みの寄与についても検討する。これらを通じて、高齢者の疼痛の新たな予防と translational research に道を開く。

3. 研究の方法

(1) 遺伝解析

4 世代以上にわたり ~ の特徴を有する疼痛家系参加者 28 名の内、発症者 18 名の参加において遺伝解析を行う。得られた候補遺伝子については、各家系において分離分析を行い、変異を入れた LOD score を算出する。機能異常の推定は、Polyphen や、Shift Score および生物種による保存を勘案し候補として特定する。得られた変異について、一般人口 150 名における変異のアリル頻度を算出し、150 名に見出されないことを条件に最終候補遺伝子とする。また、高齢者の ~ の症状を参考に、痛みの愁訴の強い慢性疼痛患者 30 名について、本遺伝子の全エクソンの解析を direct sequencing により行う。結果は 1000 人ゲノムのデータと比較する。

(2) 臨床的特徴付け

予想される遺伝子の神経組織での分布を参考に、種々の臨床的特徴付けを行う。例えば、脊髄後根神経節および三叉神経節で発現している遺伝子では、Substance P や Calcitonin-gene-related protein (CGRP) が高く、痛み部位に皮膚温の変化が認められる。これらの経験則に基づき、Substance P、CGRP、Thermography により疼痛発作前後の皮膚温を測定する。また、患児の神経学的所見 (反射、痛覚、温度覚、神経伝達速度等) を記録する。成長、発達や知的発達を評価し、脳 MRA などで合併症の有無を検討する。

(3) Knock-in mouse

同定された遺伝子のマウス相同遺伝子を見出し、ヒトに相同な部位に変異を入れる。この断片を Lox-P を入れた Targeting Vector に組み込み、ES 細胞に導入する。その後得られた子孫を、神経特異的に Cre recombinase を発現するマウスと交配し、神経に特異的に変異が Knock-in されたマウスを得る。

行動観察：マウスの行動観察を行うとともに、神経障害モデルを行い、行動学的に疼痛閾値を評価する。

電気生理学的検討：若年マウス (2 週から 6 週齢)、青年期マウス (10 週齢)、成獣期 (30 週から 40 週齢)、高齢マウス (50 週齢) について脊髄後根神経節から小径ニューロンに特に注目し、痛みニューロンを単離し電気生理学的検討を行う。同時に、神経障害モデルを行い、電気生理学的検討を行う。

Proteomics：差異が明らかになった場合、そのメカニズムについて検討する。糖鎖修飾が関与すると予測されるため、糖鎖修飾等を重点的に検討する。薬理的に糖鎖修飾を試みて、成長による痛みの消失の再現を試みる。

4. 研究成果

(1) 遺伝解析

疼痛家系参加者 28 名の 3 家系の遺伝解析の結果、本遺伝性疼痛の原因として Nav1.9 R222H、R222S 変異を見出した。変異は、一般人口 150 名には認められなかった。

(2) 臨床的特徴付け

予想される遺伝子の神経組織での分布を参考に、現在まで本研究に参加し、変異を有する患者への問診をもとに臨床的特徴付けを行った。その結果、R222H、R222H、F802C、F814C、V1184A の 5 つの変異を有する患者において、発症時期、発作の軽快時期、環境要因との関係について本症の特徴を明らかにすることができた。

発症時期：以下特徴的な聞き取りの内容を示す。

0 歳：幼い頃から良く泣く赤ちゃんで、1-2 歳から「痛い」と言葉を発するようになった。思えば手足が痛かったのかもかもしれません。

1 歳頃から時折夜泣き、急に機嫌が悪くなるなどの様子を認めていた。

1 歳 11 カ月頃から、突如泣きだすエピソードが出現。

「下肢が床につけられない」など自分で訴えるようになったので気付いた。

言葉を発する、または歩けるようになったころから、痛いといって泣いていた

1 歳半～2 歳頃から「足痛い」と話すようになった。

小さいころ（記憶のある限り）から、ずっと痛い。

発作の軽快時期

中学校頃から少しずつ痛みが改善

高校生頃から軽快したが、30 歳の今も痛い。

大人になって頻度は圧倒的に減少。

完全に消失はしていない（年に数回（41 歳））

大人して軽くなったが今もたまに痛みがある。

寒冷・悪天候との関連

夏場は 10 日/月、冬場は 20 日/月

痛くなると次の日に低気圧がくるので「天気予報」といわれている。

姉は天気の崩れる 3 日前、弟は 1 日前に痛くなる。

寒くなったり低気圧が来る前に、なんとなく触覚が過敏になるような様子。

天気の悪い時、気圧の低下時。

気圧、冷え、雨期に多く症状が現れる。必ずという訳ではない。

雨の前や寒波の前になると夜痛み出す。

以上のごとく我々の検討した患者では、変異部位が広範囲にわたるが、共通して乳幼児期から発症し、寒冷曝露で誘発され、成人期に寛解した点が確認された。一方、変異部分

に関わらず N 末端に近い部位の変異においても、消化器症状は明確ではない。

(3) Knock-in mouse

同定された遺伝子のマウス相同遺伝子を見出し、ヒトに相同な部位に変異を入れる。ヒトの変異に相同な変異を導入したマウスを得た。ヒト Nav1.9 R222S に相同な部位に変異を入れた Knock-in mouse で、行動実験および、後根神経を用いた検討で電気生理学的検討を行った。

R222S Knock-in mouse での行動実験：8 - 9 週齢の若齢マウスおよび 36 - 38 週齢の成熟マウスを用いて、自発行動量、機械刺激、温度刺激、寒冷刺激への反応を見た。その結果、自発行動量には差は認められなかったが、機械刺激、温度刺激、寒冷曝露刺激で、週齢に関わらず、R222S Knock-in mouse は、対照の野生型マウスに比べ刺激への閾値は低下し、感受性が高くなっていた。

ただし、本研究では、加齢による感受性の低下は証明されず、ヒトとマウスでの種差が存在した。

後根神経を用いた電気生理学的検討：

R222S Knock-in mouse および野生型マウスを用い、痛み刺激の中継点である後根神経節から神経細胞を単離し、Current Clamp を行った。その結果明らかに R222S Knock-in mouse では、脱分極頻度の増加が認められ、興奮性の増加が証明された。

(4) 全国規模での遺伝疫学的調査：共同研究機関である秋田大学から、全国の小児診療を行う全国の拠点病院に問い合わせたところ 24 家系の新たな患者が紹介された。これらの患者の遺伝解析を行った。その結果東北地方の 5 家系で Nav1.9 R222H 変異が見出された。また、Nav1.9 の全エクソンの解析で、3 家系で新たに 3 変異（p.F802C, p.F814C, p.V1184A）を見出した。また変異の認められない 15 家系について、全ゲノムシーケンズを行ったところ SCN9A の変異を 1 家系で見出した。

(5) 総括

本研究により、子供に手足の痛みがおこる小児四肢疼痛発作症の疾患概念が確立し、SCN11A 遺伝子の検査による遺伝子診断が可能となった。本研究の成果はこれまで見過ごされてきた新しい病気である小児四肢疼痛発作症の実態把握の糸口となることが大いに期待される。現在まで、我々は比較的短い期間の調査で多くの家系が全国で集まり、本症の国内での頻度は比較的高いことが予想された。

本症の子供たちは学童期には痛みが原因で学校を休みがちであり、成長痛だと考えら

れてきた。そして青年期になれば痛みが軽快するので病気が見逃されていることが推測され、まだ診断されていない潜在的な小児期の患者が数多く存在する可能性が高い。小児期のQOLを損なう疾患として注目する必要がある。

今後は医療機関への調査を大規模に拡大し、遺伝子検査による正確な診断の推進と国内実態調査を進めていく必要がある。同時に、将来的な小児四肢疼痛発作症の治療法開発を目標として、細胞実験により本疾患の病態解明を行う必要がある。さらに、本研究は「寒さや悪天候により痛みが強くなる」「成長すると痛みが軽くなる（痛みが子供の時期に限られる）」という従来あまり注意を払われなかった訴えが、疼痛疾患の症状であることを明確にした点で、こうした環境要因や年齢が痛みに関与するメカニズムを解明することが、新しい視点での鎮痛薬開発に寄与することがおおいに期待される。

また、本疾患の原因遺伝子である SCN11A は、炎症性疼痛に関わる遺伝子として注目されており、創薬の標的として想定されてきた。本研究により開発された実験動物は、創薬に有用な資源となると考えられる。

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5件) - 査読有

Okuda H, Noguchi A, Kobayashi H, Kondo D, Harada KH, Youssefian S, Shioi H, Kabata R, Domon Y, Kubota K, Kitano Y, Takayama Y, Hitomi T, Ohno K, Saito Y, Asano T, Tominaga M, Takahashi T, Koizumi A. Infantile pain episodes associated with novel Nav1.9 mutations in familial episodic pain syndrome in Japanese families. PLOS ONE. 11(4): e0154827, 2016.
doi: 10.1371/journal.pone.0154827

Hitomi T, Matsuura N, Shigematsu Y, Okano Y, Shinozaki E, Kawai M, Kobayashi H, Harada KH, Koizumi A. Importance of molecular diagnosis in the accurate diagnosis of systemic carnitine deficiency. J Genet. 94(1): 147-150, 2015.
doi: 10.1007/s12041-015-0486-0

Chong PF, Ogata R, Kobayashi H, Koizumi A, Kira R. Early onset of moyamoya syndrome in a Down syndrome patient with the genetic variant RNF213 p.R4810K. Brain Dev. 37(8): 822-824, 2015.
doi: 10.1016/j.braindev.2014.12.006

Yan J, Hitomi T, Takenaka K, Kato M, Kobayashi H, Okuda H, Harada KH, Koizumi A. Genetic Study of Intracranial Aneurysms. Stroke. 46(3): 620-626, 2015.
doi: 10.1161/STROKEAHA.114.007286

Nanayakkara S, Senevirathna STMLD, Abeysekera T, Chandrajith R, Ratnatunga N, Gunarathne EDL, Yan J, Hitomi T, Muso E, Komiya T, Harada KH, Liu W, Kobayashi H, Okuda H, Sawatari H, Matsuda F, Yamada R, Watanabe T, Miyataka H, Himeno S, Koizumi A. An integrative study of the genetic, social and environmental determinants of chronic kidney disease characterized by tubulointerstitial damages in the North Central Region of Sri Lanka. J. Occup. Health. 56(1): 28-38, 2014.
doi: 10.1539/joh.13-0172-OA

[学会発表](計4件)

野口篤子、近藤大喜、奥田裕子、小林果、齋藤義朗、大野耕策、浅野健、原田浩二、小泉昭夫、高橋勉「Nav1.9 遺伝子変異が同定された小児四肢疼痛発作症の日本人家系」第26回日本小児リウマチ学会総会・学術集、2016年10月21-23日、千葉市民会館(千葉県)

小林果、奥田裕子、人見敏明、塩井大智、原田浩二、小泉昭夫「原因不明の家族性慢性疼痛症の責任遺伝子として SCN11A 遺伝子を同定した」第86回日本衛生学会総会、2016年5月11-13日、旭川市民文化会館(北海道)

塩井大智、崔廷米、奥田裕子、小林果、原田浩二、小泉昭夫「慢性疼痛症モデルマウスの作成と疼痛行動解析」第86回日本衛生学会総会、2016年5月11-13日、旭川市民文化会館(北海道)

奥田裕子、小林果、原田浩二、小泉昭夫「周期性四肢関節症の疼痛マウスモデルの電気生理学的解析」第86回日本衛生学会総会、2016年5月11-13日、旭川市民文化会館(北海道)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称：疼痛遺伝子及びその用途
発明者：小泉昭夫、小林果、原田浩二、人見敏明、土生敏行、高橋勉、野口篤子、近藤大喜
出願人：国立大学法人京都大学、国立大学法

人秋田大学
種類：特許
番号：特願 2014-238250
出願年月日：平成 26 年 11 月 25 日
国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等
京都大学大学院医学研究科環境衛生学分野 HP
<http://hes.med.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

小泉 昭夫 (KOIZUMI, Akio)
京都大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号： 5 0 1 2 4 5 7 4

(2)研究分担者

高橋 勉 (TAKAHASHI, Tsutomu)
秋田大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号： 2 0 2 7 0 8 4 5

原田 浩二 (HARADA, Kouji)
京都大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号： 8 0 4 5 2 3 4 0

人見 敏明 (HITOMI, Toshiaki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号： 9 0 4 0 5 2 7 5

小林 果 (KOBAYASHI, Hatasu)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号： 7 0 5 4 2 0 9 1