

令和元年6月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K08772

研究課題名(和文) 周期性四肢疼痛に関わる新規遺伝子の機能解析と創薬への応用

研究課題名(英文) Functional analysis of novel mutations of SCN11A for future drug of familial episodic pain

研究代表者

奥田 裕子 (Okuda, Hiroko)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：30709663

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)：我々はナトリウムチャネルをコードするSCN11A p.R222S/H変異が原因である遺伝性四肢疼痛発症家系を見出し、その機能解析によって、この変異が疼痛症状を引き起こすことを示唆した (Okuda et al., 2016)。さらに疼痛家系42家系を集積し、p.R222H変異が東北地方で多く存在すること、SCN11A新規変異(p.F814C、p.F1146S)を見出した。またこれら変異を持つノックインマウスを作成し、変異によって疼痛経路の過剰興奮が起こり、疼痛発作を引き起こすことを示唆した。2018年、この成果を論文として発表した (Kabata et al., Plos one 2018)。

研究成果の学術的意義や社会的意義

疼痛発症のメカニズムおよびその診断や治療法は未だ確立されていない中、我々は小児における発作性四肢疼痛の原因遺伝子を確定し、新たな疾患概念として「小児四肢疼痛発作症」と命名、初めて遺伝子検査を可能にした。さらに、本疾患は日本全国に分布していることを解明し、これまで見過ごされてきた本疾患患者が未だ潜在的に多く存在している可能性を示唆した。本課題で同定したSCN11A変異はこれまで海外症例のみの報告であり、新たな疼痛機序解明の糸口となりうると考える。今後、引き続き全国的な症例収集、遺伝子変異の同定、客観的診断基準の確立を行うことによって、本疾患の社会的認知と治療体制整備への寄与が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：We reported the two novel mutations p.R222H/S in SCN11A, which the cause of familial episodic pain (FEP) syndrome (Okuda et al., Plos one 2016).

We recruited an additional 42 new unrelated Japanese FEP families, between 2016 and 2018, and identified a total of 11 mutations in SCN11A: p.R222H in seven families, p.R225C and p.V1184A, additionally two novel missense variants of SCN11A p.F814C and p.F1146S in independent families. SCN11A p.R222H was confirmed to be frequently observed in patients with FEP in the Tohoku region of Japan. To evaluate the effects of these latter two mutations, we generated knock-in mouse models harboring p.F802C and p.F1125S, orthologues of the human p.F814C and p.F1146S, respectively. Consequentially, we confirm higher level of excitability in the F802C or F1125S mice than in WT as R222S mouse. These results indicate that these novel mutations are gain of function mutations. These results published in 2018.

研究分野：生理学

キーワード：小児四肢疼痛発作症 難病 SCN11A チャネルパッチ

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。よって、その疼痛メカニズム究明のため、研究が進められてきた。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、SCN9A、SCN10A といった Na チャネル (Nav1.7、Nav1.8) をコードする遺伝子の変異が病態に深く関与することが分かってきた。我々は、既報の慢性疼痛と異なり、乳児期より思春期に掛け四肢の大関節の痛みを来す遺伝性慢性疼痛発症家系の 6 家系を集積し、網羅的遺伝子解析を行い、疼痛に係わるナトリウムチャネル (Nav1.9) の変異 (SCN11A p.R222H/S) および痛み物質として考えられている Sphingosine-1-phosphate (SPH-1-P) の代謝関連タンパク、ペントマイド (Paintamide) を見いだした。

2. 研究の目的

既報の慢性疼痛と異なり、乳児期より思春期に掛け四肢の大関節の痛みを来す遺伝性慢性疼痛発症家系の 6 家系において、網羅的遺伝子解析によって見出した疼痛に係わるナトリウムチャネル (Nav1.9) の変異およびその代謝関連タンパク、Paintamide について、(1) 電気生理学的機能解析 (安定発現株、knock in mice) (2) knock-in/out mice での疼痛行動解析、(3) 同症状を持つ家系の集積を行うことで疫学的知見を得、神経原性疼痛のメカニズムの解明と臨床疫学的データを用いた創薬ターゲットの同定を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 電気生理学的機能解析

安定発現株: Nav1.9 は通常の細胞発現系では安定に発現しない為、ND7/23 細胞 (マウス神経芽細胞腫とラット脊髄後根由来神経) を用い、正常、および変異をもつ Nav1.9 の安定発現株を作成し、得られた各チャネルの電気生理学的性質 (膜電位、チャネルキネティクス) を解析した。

knock in mice: 同定された遺伝子のマウス相同遺伝子を見出し、変異を導入して作出した knock in mice から疼痛経路にある後根神経節 (DRG) を単離し、Current Clamp 法でチャネル特性を測定、野生型マウスと比較した。

(2) knock in mice での疼痛行動解析

作成した knock in mice を用い、疾患患者同様、加齢による痛みの軽減が再現されるかを週齢の違いによって評価した。評価方法は自発行動量、機械刺激 (von Frey 法)、熱刺激 (テイルフリック法、ホットプレート法) を用いた。

(3) 遺伝解析

Nav1.9 チャネルの変異型を持つ疼痛家系 6 家系と同様の症状 乳児期からはじまり青年期に寛解する、周期的疼痛発作を生じる、疼痛箇所は主に四肢大関節、寒冷曝露で悪化し温熱曝露で改善する、を持った疼痛疾患患者を集積し、Nav1.9 チャネルの変異の有無をサンガーシークエンスによって解析した。また、同変異が見つからなかった場合、Nav1.9 の全エクソンを direct sequencing によって解析する。同時に、痛みの伝達に関与するナトリウムチャネルのサブタイプである Nav1.7、Nav1.8 についても全エクソンの direct sequencing を行った。

4. 研究成果

(1) 電気生理学的解析

Paintamide に関する解析: 患者の疼痛時、非疼痛時における Paintamide の血中濃度比較を行ったが、差がなかった。またノックインマウス作成段階においてノックアウトベクターによる複数のキメラマウスから F1 ヘテロマウスを獲得することが困難であり、上記のとおり疼痛による差がなかったことから、作成は行わないこととした。

安定発現株に関する解析: 我々が見出した Nav1.9 の変異 (p.R222H/S) および野生型の安定発現株について、パッチクランプ法を用い、チャネル電流解析を行った。各変異型と野生型のチャネル間で、活性化に差がないことが分かった (図 1)。

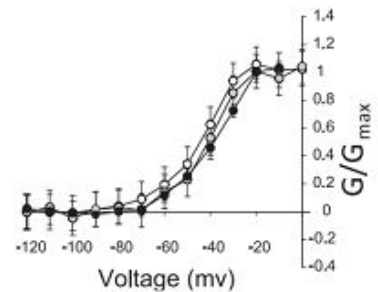


図 1

knock-in mice に関する解析: 若齢マウス (6-8 週) から痛みの伝達経路である DRG を単離し、活動電位の性質について静止膜電位、活動電位発生の閾値、振幅の大きさ、幅、速さ、後脱分極について計測した。その結果、p.R222S の相同遺伝子を持つ knock in mice について、有意に振幅が大きく、後脱分極側にシフトしていた。また、p.R222S 変異マウスは野生型に比べ、発火頻度においても有意に増大していた (図 2, 3)。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

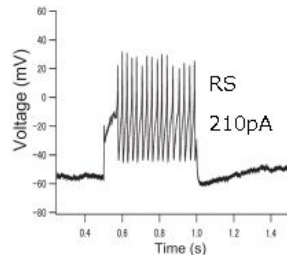
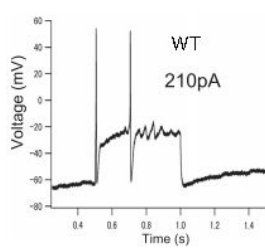


図 2

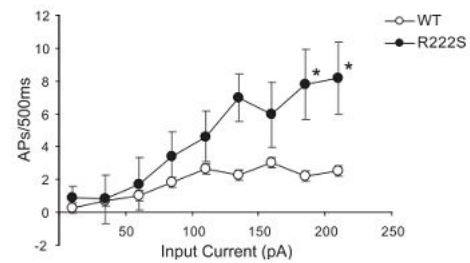


図 3

以上のことから、Nav1.9 の変異により DRG ニューロンが過剰に興奮することで疼痛発作を引き起こすことを示唆した。

さらに、疫学的研究 (後述: 項目 3) 遺伝解析) を進めることで得られた新たな変異である Nav1.9 p.F802C、F1146S の相同遺伝子変異を持つ knock in マウスも作出し、同様の電気生理学的解析を進めたところ、p.F802C、F1146S の静止膜電位は共に WT に比べ脱分極側へ有意にシフトし、p.F802C では入力抵抗が有意に増加した。基電流および活動電位の各パラメータは各変異と WT では差は見られなかった。また電流入力に対し、p.1146S は入力値に対する発火確率および発火頻度において小さい入力でも有意に発火し、p.F802C では発火確率は WT と差はないが、発火頻度は有意に増すことが分かった (図 4, 5)。

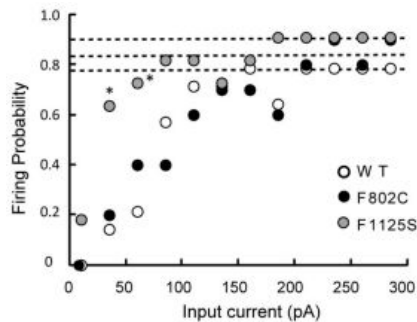


図 4 発火確率

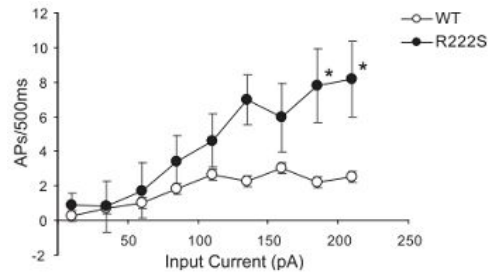


図 5 発火頻度

以上の結果より、p.R222S 変異を持つマウス同様、各変異は定常状態においても WT に比べ発火しやすい状態であり、その応答性は異なるが入力に対する興奮性は高く、疼痛経路が活性化しやすいと考えられた。

(2) p.R222S knock in mice での疼痛行動解析

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、熱刺激を計測した。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、熱刺激で、週齢に関わらず p.R222S knock in mice は、WT マウスに比べ、刺激への閾値は低下し、感受性は高くなっていった。しかし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。

(3) 遺伝解析

現在までに集積した疼痛家系は 57 家系であり、家系は日本全土にわたっていることが分かった。そのうち SCN11A 変異を持つ家系は 19 家系 (33%) であった。特に東北地方において、SCN11A p.R222H 変異を持つ家系は全体の 75% (9/12) を占めており、p.R222H 変異が原因となる本症患者は特に東北地方では相当数存在すると考えられ、疑い症例に対する R222H/S スクリーニングは有効であるといえる。また、SCN11A p.R222H/S 以外では 1 家系で既報変異 (V1184A) を、3 家系で新規変異 (L811F, F814C, F1146S) を見出した。さらに SCN11A 変異がみられなかった家系において、SCN9A の変異を 1 家系で見出した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件) , とも査読有

Okuda H, Noguchi A, Kondo D, Kobayashi H, Harada HK, Youssefian S, Shioi H, Domon Y, Kubota K, Kitano Y, Takayama Y, Hitomi T, Ohno K, Saito Y, Asano T, Tominaga M, Takahashi T, Akio Koizumi. Infantile pain episodes associated with novel Nav1.9 mutations in familial episodic pain syndrome in Japanese families. PLoS One. (2016 May 25;11(5):e0154827)

Kabata R, Okuda H, Noguchi A, Kondo D, Fujiwara M, Hata K, Kato Y, Ishikawa K, Tanaka M, Sekine Y, Hishikawa N, Mizukami T, Ito J, Akasaka M, Sakurai K, Yoshida T, Minoura H, Hayashi T, Inoshita K, Matsuyama M, Kinjo N, Cao Y, Inoue S, Kobayashi H, Harada KH, Youssefian S,

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

Takahashi T, Koizumi A. Familial episodic limb pain in kindreds with novel Nav1.9 mutations. PLoS One. (2018 Dec 17;13(12):e0208516). doi:10.1371/journal.pone.0208516.eCollection 2018.

〔学会発表〕(計 9 件)

野口篤子、近藤大喜、奥田裕子、小林果、斉藤義朗、大野耕策、浅野健、原田浩二、小泉昭夫、高橋勉、「Nav 1.9 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(千葉) 2016 年 10 月

奥田裕子、野口篤子、原田浩二、小林果、近藤大喜、高橋 勉、小泉昭夫「小児四肢疼痛発作症モデルマウスを用いた行動学的、電気生理学的解析」生理研研究会(九州) 2016 年 10 月

奥田裕子、野口篤子、原田浩二、小林果、近藤大喜、高橋勉、小泉昭夫「周期性四肢発作症の疼痛マウスモデルの作出と行動学的・電気生理学的解析」第 11 回トランスポーター研究会(京都) 2016 年 7 月

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 87 回日本衛生学会学術総会(宮崎) 2017 年 3 月

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 87 回日本衛生学会学術総会(宮崎) 2017 年 3 月

奥田裕子、加畑理咲子、小林果、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫 「小児四肢疼痛発作症の新規変異を持つマウスモデルの電気生理学的解析」第 88 回日本衛生学会学術総会(東京) 2018 年 3 月

加畑理咲子、奥田裕子、藤原倫昌、加藤善史、野口篤子、小林果、原田浩二、高橋勉、小泉昭夫 「小児四肢疼痛発作症の臨床と遺伝解析」第 88 回日本衛生学会学術総会(東京) 2018 年 3 月

奥田裕子、加畑理咲子、小林果、人見敏明、曹洋、原田浩二、小泉昭夫 「SCN11A 遺伝子新規変異の影響による疼痛伝達経路への興奮性に関する電気生理学的解析」第 95 回日本生理学会大会(香川) 2018 年 3 月

奥田裕子、加畑理咲子、小林果、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫 「小児四肢疼痛発作症の新規変異における電気生理学的解析」第 89 回 日本衛生学会(愛知) 2019 年 1 月

〔図書〕(計 1 件)

野口篤子、奥田裕子、小林果、小泉昭夫、高橋勉、小児四肢疼痛発作症. 日本臨床 75 巻 4 号:641-651.2017 年

〔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 H P

<http://hes.med.kyoto-u.ac.jp/>

京都大学、研究・産官学連携、研究成果

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2016/160527_1.html

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：小泉 昭夫

ローマ字氏名：KOIZUMI, Akio

所属研究機関名：京都大学

部局名：大学院医学研究科

職名：名誉教授

研究者番号(8桁)：50124574

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 勉

ローマ字氏名：TAKAHASHI, Tsutomu

研究協力者氏名：野口 篤子

ローマ字氏名：NOGUCHI, Atsuko

研究協力者氏名：原田 浩二

ローマ字氏名：HARADA, Kouji

様 式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

研究協力者氏名：Shohab Youssefian
ローマ字氏名：YOUSSEFIAN, Shohab
研究協力者氏名：人見 敏明
ローマ字氏名：HITOMI, Toshiaki
研究協力者氏名：小林 果
ローマ字氏名：KOBAYASHI, Hatasu
研究協力者氏名：加畑 理咲子
ローマ字氏名：KABATA, Risako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。