

令和元年6月15日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H02562

研究課題名(和文) バイオインフォマティクスを用いたNav1.7阻害剤の創薬による新たな鎮痛戦略

研究課題名(英文) Discovery of novel Nav1.7 inhibitors by using bioinformatics

研究代表者

川真田 樹人 (Kawamata, Mikito)

信州大学・学術研究院医学系・教授

研究者番号：90315523

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,600,000円

研究成果の概要(和文)：Nav1.7の遺伝子であるSCN9Aのミスセンス変異により、無痛症を発症した新たな家系を発見した。本Nav1.7の変異を培養細胞に発現させたところ、(1)緩やかに脱分極させた時に発生するRamp電流が変異Nav1.7で有意に低下し、(2)膜に発現するNav1.7が変異型で低下していた。さらに、(3)このNav1.7変異を導入した遺伝子改変マウスでは機械的痛みの感受性が低下し、この家系で見られる無痛症と類似の機能変化を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、Ramp電流がNav1.7の重要な機能と考えられ、Nav1.7のV-IカーブでのNa電流密度が著明に抑制されなくとも、Ramp電流が強く抑制されれば、ヒトにおける無痛症を引き起こすことが示された。これまでNav1.7阻害薬は電位感受性部分をターゲットとして創薬されてきたが、副作用から臨床応用には至っていない。本患者のNav1.7の構造変化部位から、Nav1.7のポア周辺をターゲットとした新たな鎮痛薬/局所麻酔薬の創薬の可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：A novel missense mutation of SCN9A, a gene of Nav1.7 causes congenital insensitivity to pain (CIP) in a family. When this Nav1.7 mutation was expressed in cultured cells, the Ramp current generated upon gradual depolarization was significantly reduced in the cells. The expression of Nav1.7 was significantly lower in the mutant cells than that in the wild type cells. The Nav1.7 mutation mice mimic the features of CIP in the family,

研究分野：麻酔科学

キーワード：無痛症 ナトリウムチャンネル1.7 1塩基変異 創薬 バイオインフォマティクス

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

1. 研究開始当初の背景

新たな先天性無痛家系を発見し、温痛覚は幼少時から消失しており、一部、嗅覚も低下していることが示された。患者血液を用いて遺伝子解析を行い、DNAシーケンスにてナトリウムチャンネル1.7 (Nav 1.7) の遺伝子であるSCN9A領域の1塩基置換であることを同定した。これまで、Nav1.7はC線維やA線維などの痛覚線維に発現しており、Nav1.7のナンセンス異常による無痛症症例が世界中で報告されている。一方、痛みと末梢の発赤を特徴とする肢端紅皮症は、Nav1.7の発現増加に起因することも示されている。すなわちNav1.7は、loss of function、あるいはgain of functionというチャンネル機能が直接、痛みの発現と関連する分子であることが示されている。これまでのNav1.7変異の報告の多くはナンセンス異常であることから、本家系における変異Nav1.7の機能異常を検討することで、(1) Nav1.7の機能の解明が可能であり、(2) Nav1.7のどの機能異常が無痛症というphenotypeを生み出すかを検討でき、(3) この変異部位をターゲットとして、バイオインフォマティクスを用いて阻害作用を有する小分子を合成することで、新たな鎮痛薬/局所麻酔薬の開発につながる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) 本患者家系の無痛症のプロファイルを行い、(2) 遺伝子異常部位を同定し、(3) チャンネル発現実験により、本変異Nav1.7の機能異常の特徴を解析し、(4) 本Nav1.7の1塩基変異をノックインした変異マウスを作製し、熱性・機械的侵害刺激に対する行動変化を検討することである。研究が発展すれば、構造変化をきたしたNav1.7と同様の構造変化をきたす小分子化合物候補を、バイオインフォマティクスを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) Quantitative Sensory Test (QST) と神経伝導速度検査

上肢に対する安全ピン刺激、熱刺激、振動刺激、嗅覚試験を行った。また、正中神経と腓腹神経の神経伝導速度を測定した。

(2) 患者血液を用いて遺伝子解析を行い、DNAシーケンスにてナトリウムチャンネル1.7 (Nav 1.7) の遺伝子であるSCN9A領域の1塩基置換であることを同定した。変異のないNav1.7、本患者変異Nav1.7をプラスミドに導入し大腸菌を用いて増幅し、ヒト胎児腎臓(tsA201)細胞にリン酸カルシウム法を用いてそれぞれ培養細胞に強制発現させ、ホールセルパッチクランプ法を用いてチャンネル機能解析を行った。

(3) 本無痛症患者家系で見出した1塩基異常をノックインしたマウスにおいて、機械的・熱性侵害刺激を加えて、逃避閾値・潜時を計測した。

4. 研究成果

(1) Quantitative Sensory Test (QST)

安全ピンに対する痛みの消失、熱刺激による痛み誘発の消失、軽度振動覚の低下、一部、嗅覚も低下していることが示された。神経伝導速度からは、運動神経、知覚神経の伝導速度は健常人との差を認めなかった。

(2) 遺伝子変異の同定

常染色体劣性疾患における候補領域を絞り込むために、5 Mbを超えるLOH領域を同一の子孫領域としてマッピングし、無痛症の原因として以前に報告されている14個の遺伝子をLOH領域においてスクリーニングしたところ、Nav1.7をコードするSCN9Aがこれらの領域に含まれる唯一の遺伝子であり、SCN9Aの直接配列は、エクソン10におけるホモ接合変異1144TからGへの変異であり、コドン384におけるフェニルアラニンからバリンへのミスセンス変異であった (F384V)。この変異はドメイン I の細胞外セグメントに位置した (図1)、この部分がNav1.7の機能における変化を誘導すると考えられた。

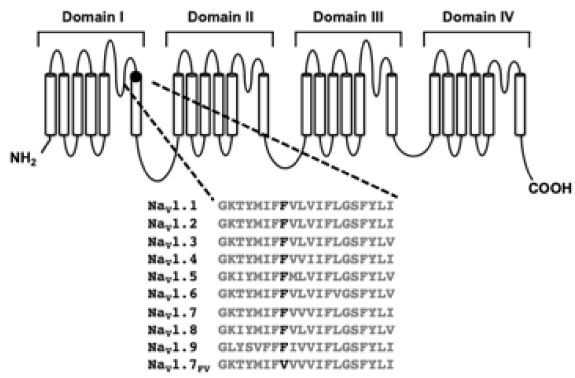


図1. Nav1.7変異部分のシェーマ

(3) 変異Nav1.7の電気生理学的特徴

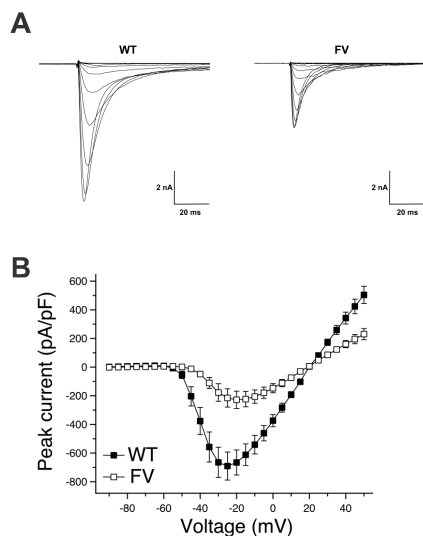


図2. tsA201細胞における電流-電圧カーブ
WT: wild type; FV: 変異型

tsA201細胞における変異による電流-電圧 (I-V) カーブにおける電流密度を抑制した (図2)。一方、変異はRamp電流の発生を抑制し (図3-A) Nav1.7

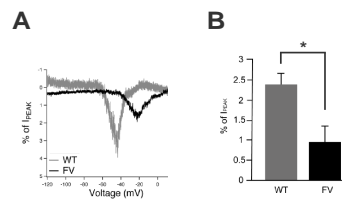


図3. tsA201細胞におけるRamp電流 (A) と膜におけるNav1.7発現量 (WT: wild type; FV: 変異型)

の発現は細胞全体ではwild typeと差がなかったが、膜に発現しているNav1.7は変異型を導入した細胞で有意に低下していた (図3-B)。

(4) 変異Nav1.7のノックインマウスの行動生理学的検討

変異Nav1.7ノックインマウスでは、機械的侵害刺激に対する閾値が著明に上昇していたが (図4)、熱性侵害刺激に対する潜時は軽度、延長していた (図5)。

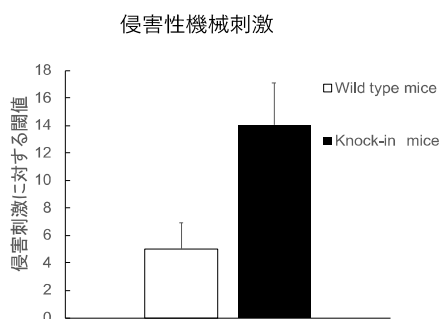


図4. Nav1.7遺伝子改変マウス(Knock-in mice)では通常状態での侵害性機械刺激に対する逃避閾値が上昇していた。

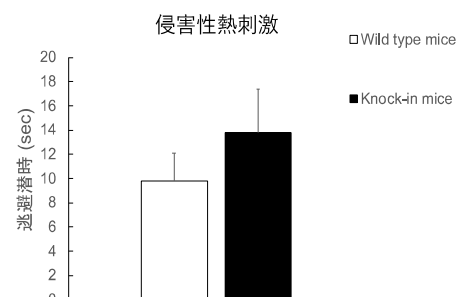


図5. Nav1.7遺伝子改変マウス(Knock-in mice)では通常状態での侵害性熱刺激に対する逃避閾値が軽度上昇していた。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 18 件)

1. Ishida T, Sakamoto A, Tanaka H, Ide S, Ishida K, Tanaka S, Mori T, Kawamata M: Transversus abdominis plane block with 0.25% levobupivacaine: a prospective, randomized, double-blinded clinical study. *J Anesth.* 2015; 29: 557-561.
2. Kawai Y, Ajima K, Kaidoh M, Sakaguchi M, Tanaka S, Kawamata M, Kimura H, Ohhashi T : In vivo support for the new concept of pulmonary blood flow-mediated CO₂ gas excretion in the lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2015; 308: L1224-L1236.
3. Ishida T, Kiuchi C, Sekiguchi T, Tsujimoto T, Kawamata M: McGrath MAC video laryngoscope for insertion of a transoesophageal echocardiography probe: A randomised controlled trial. *Eur J Anaesthesiol.* 2015; 33: 1-6.
4. Sugiyama Y, Shimizu F, Shimizu S, Urasawa M, Tanaka S, Kawamata M: Severe Re-expansion Pulmonary Edema Induced by One-Lung Ventilation. *Respiratory care* 2015; 03759.
5. Ishida T, Tanaka S, Sekiguchi T, Sugiyama D, Kawamata M: Spinal nociceptive transmission by mechanical stimulation of bone marrow. *Molecular Pain.* 2016; 12: 1-15.
(Doi:10.1177/1744806916628773.)
6. Fuseya S, Yamamoto K, Minemura H, Yamaori S, Kawamata T, Kawamata M: Systemic QX-314 Reduces Bone Cancer Pain through Selective Inhibition of Transient Receptor Potential Vanilloid Subfamily 1-expressing Primary Afferents in Mice. *Anesthesiology.* 2016; 125: 204-218.
7. Kozuka Y, Kawamata M, Furue H, Ishida T, Tanaka S, Namiki A, Yamakage M: Changes in synaptic transmission of substantia gelatinosa neurons after spinal cord hemisection revealed by analysis using in vivo patch-clamp recording. *Molecular Pain.* 2016; 12: 1-14.(Doi:10.1177/1744806916665827.)
8. Tanaka Y, Kawaguchi M, Noguchi Y, Yoshitani K, Kawamata M, Masui K, Nakayama T, Yamada Y: Systematic review of motor evoked potentials monitoring during thoracic and thoracoabdominal aortic aneurysm open repair surgery: a diagnostic meta-analysis. *J Anesth.* 2016; 30: 1037-1050.
9. Yoshitani K, Masui K, Kawaguchi M, Kawamata M, Kakinohana M, Kato S, Hasuwa K, Yamakage M, Yoshikawa Y, Nishiwaki K, Aoyama T, Inagaki Y, Yamasaki K, Matsumoto M, Ishida K, Yamashita A, Seo K, Kakumoto S, Hayashi H, Tanaka Y, Tanaka S, Ishida T, Uchino H, Kakinuma T, Yamada Y, Mori Y, Izumi S, Nishimura K, Nakai M, Ohnishi Y: Clinical Utility of Intraoperative Motor-Evoked Potential Monitoring to Prevent Postoperative Spinal Cord Injury in Thoracic and Thoracoabdominal Aneurysm Repair: An Audit of the Japanese Association of Spinal Cord Protection in Aortic Surgery Database. *Anesthesia & Analgesia* 2018; 126(3): 763-768
10. Sugiyama Y*, Wakabayashi R*, Urasawa M, Maruyama Y, Shimizu S, Kawamata M *: Contributed equally: Perioperative characteristics of the accuracy of subcutaneous continuous glucose monitoring - pilot study in neurosurgery and cardiac surgery - . *Diabetes Technology and Therapeutics* 2018; 20(10):654-661
11. Zhang H, Kashihara T, Nakada T, Tanaka S, Ishida K, Fuseya S, Kawagishi H, Kiyosawa K, Kawamata M, Yamada M: Prostanoid EP4 receptor-mediated augmentation of I_h currents in A β dorsal root ganglion neurons underlies neuropathic pain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2018; 368: 50-58
12. Yamamoto K, Tanaka S, Fuseya S, Ishida T, Zhang H, Kawamata T, Kawamata M: Knockdown of

TRPV2 channels in sensory neurons increases limb use and weight bearing but does not affect spontaneous flinching behavior in a mouse model of bone cancer. *Molecular Pain* 2018; 14: 1-11

13. Sugiyama Y, Iida H, Amaya F, Matsuo K, Matsuoka Y, Kojima K, Matsuno F, Hamaguchi T, Iseki M, Yamaguchi K, Takahashi Y, Hara A, Sugawara Y, Kawamata M, Tanaka S, Inagaki Y, Otsuki A, Yamazaki M, Ito H: Prevalence of chronic postsurgical pain after thoracotomy and total knee arthroplasty: a retrospective multicenter study in Japan (Japanese Study Group of Subacute Postoperative Pain). *J Anesth.* 2018; 32: 434-438
14. Sugiyama Y, Gotoh S, Urasawa M, Kawamata M, Nakajima K: Hemodynamic response to massive bleeding in a patient with congenital insensitivity to pain with anhidrosis. *Case Reports in Anesthesiology* 2018; 2018:9593458.
15. Sugiyama Y, Kiuchi C, Suzuki M, Maruyama Y, Wakabayashi R, Ohno Y, Takahata S, Shibasaki T, Kawamata M: Glucose management during insulinoma resection using real-time subcutaneous continuous glucose monitoring. *Case Reports in Anesthesiology* 2018; 2018:6248467.
16. Fuseya S, Ichino T, Tanaka S, Ishida K, Ishida T, Kawamata M. Airway obstruction due to a laryngeal polyp following insertion of a laryngeal mask airway. *JA Clin Rep* 2018; 4: 43
17. Ishida T, Tanaka S, Sakamoto A, Hirabayashi T, Kawamata M: Plasma ropivacaine concentration after TAP block in a patient with cardiac and renal failure. *Local Reg Anesth.* 2018; 11: 57-60.
18. Fuseya S, Ishida T, Ichino T, Kawamata M: Flattening of the Interventricular Septum during One-lung Ventilation in a Patient with Arrhythmogenic Right Ventricular Cardiomyopathy. *Shinshu Medical Journal* 2018; 66: 443-449.

〔学会発表〕(計5件)

1. Tanaka T, Tanaka S, Fuseya S, Imai N, Kawamata M: Persistent post-thoracotomy pain in Japan: a prospective follow-up study of prevalence and risk factors. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, San Diego, USA, 2015.10.24-28
2. Tanaka R, Tanaka S, Kawamata M: Reevaluation of effects of sevoflurane and propofol on visual evoked potentials. Annual Meeting of American Society of Anesthesiologists, San Diego, USA, 2015.10.24-28
3. Mikito Kawamata, Esther Pogatzki-Zahn, Audun Stubhaug: Acute Post-Operative Pain: Mechanisms, Treatment, and Prevention of Chronification. Refresher Course. International Association for the study of pain Meeting, Yokohama, 2016.9.26-30
4. Hao Zhang, Satoshi Tanaka, Daisuke Sugiyama, Mikito Kawamata: Spontaneous exploratory activity, area of mechanical hyperalgesia, and expression of c-Fos protein in the spinal cord after abdominal surgery vary according to degree of the surgical stress. International Association for the study of pain Meeting, Yokohama, 2016.9.26-30
5. Kiyosawa K, Sugiyama Y, Kashihara T, Nakada T, Yamada M, Kawamata M: Patch-clamp analysis of mutant voltage-gated sodium channels causing congenital insensitivity to pain. *Euroanaesthesia2017*, Geneva, Switzerland, 2017.6.3-5

〔図書〕(計7件)

1. 川真田 樹人: 神経筋疾患. ペインコントロール. 今日の治療指針. 福井 次矢, 高木 誠, 小室 一成編. 東京, 医学書院, 2015, pp.849-850

2. 川真田 樹人: 痛みの生理学. 麻酔科学レビュー2015. 天羽 敬祐編. 東京, 総合医学社, 2015, pp.211-214.
3. 川真田 樹人: 急性痛. 痛みの臨床テキスト. 小川 節郎. 東京, 南江堂, 2015, pp. 2-5
4. Sugiyama Y, Kawamata M: Steroids, Diuretics, and Anticonvulsants. Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection. 2015; 113-118.
5. Ishida T, Kawamata M: Anesthesia in Awake Craniotomy. Neuroanesthesia and Cerebrospinal Protection. 2015; 371-379.
6. 川真田 樹人: 痛みの生理学. 麻酔科学レビュー 最新主要文献集 2016. 澄川 耕二, 岩崎 寛. 東京, 総合医学社, 2016, pp.211-214.
7. 川真田 樹人: 痛みの生理学. 麻酔科学レビュー 2018. 山蔭 道明, 廣田 和美. 東京, 総合医学社, 2018, pp.250-254.

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：山田 充彦

ローマ字氏名：Mitsuhiko Yamada

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：10263237

研究分担者氏名：上園 保仁

ローマ字氏名：Yasuhito Uezono

所属研究機関名：国立研究開発法人国立がん研究センター

部局名：研究所

職名：分野長

研究者番号（8桁）：20213340

研究分担者氏名：石田 高志

ローマ字氏名：Takashi Ishida

所属研究機関名：信州大学

部局名：学術研究院医学系

職名：講師

研究者番号（8桁）：60531952

研究分担者氏名：木村 忠史

ローマ字氏名：Tadashi Kimura

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：60344214

(2)研究協力者

研究協力者氏名：植田 弘師

ローマ字氏名：Hiroschi Ueda

所属研究機関名：長崎大学

部局名：医歯薬学総合研究科(薬学系)

研究者番号（8桁）：00145674

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。