

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（開拓）

研究期間：2017～2022

課題番号：17H06281・20K20308

研究課題名（和文）気象環境により誘発される痛みのメカニズム

研究課題名（英文）Investigation of mechanisms of pain evoked by meteorological environment

研究代表者

原田 浩二（Kouji, Harada）

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80452340

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 20,000,000円

研究成果の概要（和文）：Nav1.9の変異体の発現は低温条件で上昇し、活動電位も増強された。cn11a p.R222S変異マウスは寒冷による一過性の機械刺激性アロディニアを示し、牛車腎気丸の投与によって疼痛が抑制された。気圧変化による行動変化も観察され、変異型マウスでの行動が抑制される傾向が示された。79家系の小児四肢疼痛発作症の患者を収集し、SCN11A p.R222Hスクリーニングが有効であると考えられた。新たに同定された変異（F814C, F1146S）と電気生理学的評価により、活動電位の増加が示された。また、SCN9A遺伝子の変異も見つかった。気圧や気温と疼痛発作の関係の検証のためにデータセットを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年ナトリウムチャンネルと疼痛の関係が証明されている。ナトリウムチャンネルの中でも、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9は主として末梢神経に発現し、これらチャンネルへの特異的阻害薬は活発に開発がなされてきたが、特異的阻害剤はこれまで困難であった。本研究課題では、イオンチャンネルの膜輸送の関与を見出した。このような視点で、痛みのメカニズムの解明が行われたことはない。また、寒冷曝露、気圧変化によりNav1.9の痛みが誘発されることから、疼痛患者の愁訴にあるように気圧のわずかな変化でも膜表面の発現が変わる可能性が示唆した。今後の創薬や病態解明に関わる新たな展開を拓く意義がある。

研究成果の概要（英文）：The expression of Nav1.9 variants increased under low-temperature conditions, leading to enhanced action potentials. Scn11a p.R222S mutant mice exhibited transient mechanical allodynia in response to cold, which was alleviated by administration of Boshakidogan. Furthermore, behavioral changes in response to pressure variations indicated a tendency of reduced activity in the mutant mice. A collection of 79 pedigrees of pediatric limb pain disorder patients revealed the effectiveness of SCN11A p.R222H screening. Newly identified mutations (F814C, F1146S) demonstrated increased action potentials through electrophysiological evaluation. Mutations in the SCN9A gene were also identified. A dataset was constructed to investigate the relationship between pain attacks and changes in atmospheric pressure and temperature.

研究分野：遺伝・環境相互作用

キーワード：疼痛 温度 気圧 気象変化 ナトリウムチャンネル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

四肢の関節の疼痛は高齢者に有病率が高い。疼痛は QOL を損なう主要な要因である。現在の医療では、通常の消炎鎮痛剤 (NSAIDs) や Opioid、局所麻酔薬等が対症療法的に処方されているが、オピオイドなどは依存性などの課題がある。疼痛の本態の解明により、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 の遺伝子変異は、遺伝性の肢端紅痛症の家系解析で見出された。また遺伝性の小径線維ニューロパチーの遺伝解析で、SCN10A が見出された。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とされる。

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患者を見出した。疼痛症状は、乳児期よりはじまり、常染色体顕性遺伝形式であった。この慢性疼痛家系 6 家系について遺伝子解析を行った結果、SCN11A 遺伝子の変異が認められた (引用文献 1)。

痛み発作への寄与度については、チャネルの開閉特性よりも遠心性および求心性膜輸送の関与が大きいことを見出し、痛み感受性への膜表面への輸送系の重要性を示唆している。現在までこのような視点で、痛みのメカニズムの解明が行われたことはなく、寒冷曝露により Nav1.9 の痛みが誘発されることから、愁訴にあるように気圧のわずかな変化でも膜表面の発現が変わる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

神経障害性疼痛は、高齢者をはじめ多くの人々が経験し、低気圧や寒冷曝露で誘発されることが多い (引用文献 2)。近年、原因として後根神経節での Nav1.9 ナトリウムチャネルの発現増加が原因となることが明らかになってきた (引用文献 3)。我々は、Nav1.9 (SCN11A) の遺伝子異常を通じて、細胞膜表面での発現が環境温度に依存する一方、チャネルの電気生理学的特性は変異により大きな変化はなかった。以上から、皮膚表面に存在する Nav1.9 では、膜表面に輸送する遠心性と膜表面から除去する求心性の輸送経路があり、輸送速度が温度や気圧などの気象条件により変動し、痛み閾値が増減するとの仮説に至った。

温度依存性 Nav1.9 の遠心性輸送系の解明、未知タンパクによる求心性輸送経路の解明、

温度依存性のメカニズムの解明、輸送系に着目した痛み創薬の可能性の検討、気圧変化による輸送の影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

1) 発現調節メカニズムの検討

温度依存性 Nav1.9 の遠心性および求心性輸送系の解明を行う。遠心性輸送路については、Immunoprecipitation により、Nav1.9 の輸送系について WT、L811P を対照として輸送に関わる結合タンパクの探索を行った。

サブユニットが Nav1.9 電流量の調節に大きく関与することが報告されたため、この発現系を構築した。既に確立している ND7/23 細胞に発現抑制 (siRNA) を行い、新たな発現細胞で Nav1.9 の膜発現量の増強があるかどうか検証した。

イメージング等を用い細胞レベルで再現を試み、求心性輸送については各種細胞内輸送タンパク質を候補として分子を探索した。

またタグ融合遺伝子発現マウスを作成し、in vivo での Nav1.9 の膜発現量の増強があるかどうか検証した。

2) 疼痛発作動物モデルの作成

遺伝子改変マウスをゲノム編集で作成した。

作成された遺伝子改変マウスについて von Frey テスト、hot plate テストなどの行動実験により疼痛過敏性を評価した。

個体における寒冷曝露、気圧変化により、疼痛過敏が引き起こされることを予備的に検討し、その介在する mediator 候補を評価した。

3) 電気生理学的検討

患者で見られた変異体についてパッチクランプ法で電気生理学的特徴を検討した。

4) 臨床症例の解析

小児四肢疼痛症の患者を継続して収集し、臨床像、温度依存性の重要性について評価した。

小児四肢疼痛症の患者の全国的な分布の疫学調査を実施した。

小児四肢疼痛発作症患者において Nav1.9 以外の遺伝子の変異を探索し、Nav1.9 の輸送に関与しうる因子を検討した。

4. 研究成果

1) 発現調節メカニズムの検討

アルファサブユニットである Nav1.9 を培養細胞系で発現させて、その電気生理学的特性を評価することを目標とするが、このサブユニットである Nav1.9 の発現、機能にはサブユニットの共発現が重要な働きを担うことが多く報告されていることから(引用文献4)今回見いだされた Nav1.9 変異型の機能解析を行う目的のため、1、2 サブユニットの安定発現株作成を試みた。発現ベクターの作成を行い、細胞への遺伝子導入を行い、薬剤選択した細胞株を得た。しかし発現抑制が生じ、十分な発現が見られなかった。

ベータサブユニットについての発現系は得られなかったが、Nav1.9 安定発現株を作成し、WT、R222H、R222S 変異体の発現状態を観察したところ、細胞膜表面での発現は、培養条件を 37 度から 28 度にするにより顕著に上昇した。また活動電位も増強された。無痛症を引き起こす L811P 変異体のチャネル開閉特性は、WT、R222S、R222H とも差は認められなかった。一方、L811P は膜表面への輸送が低温でも低いレベルであり、タンパクの発現レベルでは、膜画分に発現量の著明な差があった。

2) 疼痛発作動物モデルの作成

小児四肢疼痛発作症の原因遺伝子として同定した Scn11a p.R222S 変異マウスを用い、気候変動として寒冷による疼痛行動変化の検証を行った。

野生型マウスと比較して、低温処置後の Scn11a 変異マウス(p.R222S)は機械刺激性アロディニアを一過的に示した。一方で、低温処置による炎症の生化学的・器質的な徴候は認められなかった。

このモデル動物に漢方製剤である牛車腎気丸を投与し、疼痛の抑制が確認できた。減圧環境下での疼痛感作を検討した。50hPa までの減圧による行動を観察し、野生型マウスに比べて変異型マウスでの行動が抑制される傾向が示された。

Scn11a p.R222S 変異マウスを用い、気候変動として気圧による疼痛行動変化の検証を行い、50hPa までの減圧による行動を観察し、野生型マウスに比べて変異型マウスでの行動が抑制される傾向が示された。

3) 電気生理学的検討

臨床症例から 3 家系で新規に同定された変異(F814C, F1146S)と表現型との関係性を評価し、電気生理学的評価を行った。変異マウスの脊髄後根神経節細胞を解析し、パッチクランプ法での実験でいずれも活動電位の増加を示した。

4) 臨床症例の解析

小児四肢疼痛症の患者を国内各地の医療機関を通じて収集した。

集積した疼痛家系は 79 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。SCN11A 遺伝子のコード領域の変異の検索を行った。また臨床情報を取得した。

そのうち SCN11A 変異を持つ家系は 23 家系(32%)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 10%(43%)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多く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考えられた。

SCN11A 変異スクリーニングは、小児四肢疼痛発作症の症例では有効であると考えられた。R222S/H 変異を有さない症例について遺伝子変異を検索した結果、1 家系で既報変異(V1184A)を、3 家系で新規変異(F814C, F1146S)を見出すことができた。一方で、小児四肢疼痛発作症とみられる症状を示す場合でも SCN11A 変異陰性家系が存在し、これらの症例について、他の遺伝子を含めた検討を行った。SCN11A に変異を有さない症例について遺伝子変異を検索した結果、SCN9A 遺伝子に変異を見出すことができた。

患者での疼痛発作での気圧変化、気温変化との関係の検証を行うため、疼痛発作についての記録を取得することを計画した。協力同意を得られた患者について、冬季(12 月から翌 3 月)の期間、疼痛の発生した日時記録を依頼した。得られたデータは時系列データとしてデータセットを固定した。気象データを利用して統計解析を実施する基礎となった。

患者の居住地に近接する気象台のデータを確認し、温度、気圧などが当該期間について得られることを確認し、ダウンロードして統合データセットにした。統計解析については解析計画を作成した。

< 引用文献 >

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*. 2016 May 25;11(5):e0154827. doi: 10.1371/journal.pone.0154827.

McAlindon T, Formica M, Schmid CH, Fletcher J. Changes in barometric pressure and ambient temperature influence osteoarthritis pain. *Am J Med*. 2007 May;120(5):429-34. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.07.036.

Bennett DL, Clark AJ, Huang J, Waxman SG, Dib-Hajj SD. The Role of Voltage-Gated Sodium Channels in Pain Signaling. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1079-1151. doi: 10.1152/physrev.00052.2017.

Cusdin FS, Clare JJ, Jackson AP. Trafficking and cellular distribution of voltage-gated sodium channels. *Traffic.* 2008 Jan;9(1):17-26. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00673.x.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 2件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Takahashi Kiichi, Ohba Takayoshi, Okamoto Yosuke, Noguchi Atsuko, Okuda Hiroko, Kobayashi Hatasu, Harada Kouji H., Koizumi Akio, Ono Kyoichi, Takahashi Tsutomu	4. 巻 7
2. 論文標題 E44Q mutation in NaV1.7 in a patient with infantile paroxysmal knee pain: electrophysiological analysis of voltage-dependent sodium current	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e07396 ~ e07396
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2021.e07396	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 原田 浩二、箕浦 明	4. 巻 68
2. 論文標題 「気象と小児ぜん息患者数の関連調査：気象データとレセプトデータを活用した「Health Weather」の取り組み」について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本公衆衛生雑誌	6. 最初と最後の頁 510 ~ 510
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11236/jph.20-137	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nanayakkara Shanika, Yamamoto Naomichi, Harada Kouji H.	4. 巻 148
2. 論文標題 Intranasal levels of lead estimated from airborne pollen and urinary lead levels in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Allergy and Clinical Immunology	6. 最初と最後の頁 654 ~ 655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jaci.2021.05.024	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsubara Yosuke, Okuda Hiroko, Harada Kouji H., Youssefian Shohab, Koizumi Akio	4. 巻 394
2. 論文標題 Mechanical allodynia triggered by cold exposure in mice with the Scn11a p.R222S mutation: a novel model of drug therapy for neuropathic pain related to NaV1.9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology	6. 最初と最後の頁 299 ~ 306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00210-020-01978-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Phosri Arthit、Cao Yang、Harada Sassa Mariko、Harada Kouji H.	4. 巻 20
2. 論文標題 Socio economic factors do also matter: comments on the article “ Can climatic factors explain the differences in COVID-19?incidence and severity across the spanish regions?: an ecological study ”	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Health	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12940-021-00701-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kabata Risako et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 Familial episodic limb pain in kindreds with novel Nav1.9 mutations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0208516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0208516	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 野口篤子、奥田裕子、小林果、小泉昭夫、高橋勉	4. 巻 75
2. 論文標題 小児四肢疼痛発作症	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本臨床	6. 最初と最後の頁 641-651
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 奥田 裕子、杉 昌樹、原田 浩二、Shohab Youseffian、小泉 昭夫
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症モデルマウスの減圧に対する疼痛行動解析
3. 学会等名 第92回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田裕子、竹谷朱、小林果、土生敏行、原田浩二、ユーセフィアン・ショハブ、小泉昭男
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症の神経過興奮メカニズム解明のためのNav1.8欠損マウスの作出
3. 学会等名 第91回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 矢野 直子, 吉田 健司, 林 貴大, 高折 徹, 舞鶴 賀奈子, 横山 淳史, 奥田 裕子, 原田 浩二, 小泉 昭夫, 滝田 順子
2. 発表標題 新たに診断された小児四肢疼痛発作症の1家系
3. 学会等名 第122回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田 裕子、加畑 理咲子、小林 果、人見 敏明、原田 浩二、小泉 昭夫
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症のモデルマウスを用いたNav1.9 変異チャネルの機能解析
3. 学会等名 第90回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥田 裕子, 加畑 理咲子, 小林 果, 人見 敏明, 原田 浩二, 小泉 昭夫
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症の新規変異における電気生理学的特徴
3. 学会等名 第89回日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加畑理咲子、奥田裕子、小林果、人見敏明、曹洋、原田浩二、小泉昭夫
2. 発表標題 小児四肢疼痛発作症の臨床と遺伝解析
3. 学会等名 第88回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田裕子、加畑理咲子、小林果、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第88回 日本衛生学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 The electrophysiological study on the effect of novel mutations of SCN11A on pain pathway neuronal excitability
3. 学会等名 第95回日本生理学会大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 原田浩二	4. 発行年 2021年
2. 出版社 新規の小児期の疼痛疾患である小児四肢疼痛発作症の診断基準の確立と患者調査研究班	5. 総ページ数 3
3. 書名 小児四肢疼痛発作症ハンドブック 小児四肢疼痛発作症の研究の現状 A. これまでの遺伝疫学からの知見	

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 疼痛遺伝子及びその用途	発明者 小泉昭夫, 小林果, 原田浩二ほか	権利者 国立大学法人京都大学, 国立大学法人秋田大学
産業財産権の種類、番号 特許、6782412	取得年 2020年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

<p>小児四肢疼痛発作症サイト http://www.med.akita-u.ac.jp/~ielp/index.html 「小児四肢疼痛発作症の患者友の会」設立の呼びかけ http://hi.med.kyoto-u.ac.jp/setsuritsu.html 秋田大学Lab Interview vol.19 http://www.akita-u.ac.jp/honbu/lab/vol_19.html</p>
--

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
研究分担者	S Youssefian (Youssefian Shohab) (00210576)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	
研究分担者	高橋 勉 (Takahashi Tsutomu) (20270845)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究分担者	奥田 裕子 (Okuda Hiroko) (30709663)	京都大学・医学研究科・特定准教授 (14301)	
研究分担者	小泉 昭夫 (Koizumi Akio) (50124574)	京都大学・医学研究科・名誉教授 (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	尾野 恭一 (Ono Kyoichi) (70185635)	秋田大学・医学系研究科・教授 (11401)	
研究分担者	小林 果 (Kobayashi Hatasu) (70542091)	三重大学・医学系研究科・講師 (14101)	

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