

平成28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 慢性の痛み解明研究事業  
(英語) Research Project on Elucidation of Chronic Pain

研究開発課題名： (日本語) 新規周期性四肢疼痛症の加齢による寛解の分子機構解明と創薬への応用  
(英語) Elucidation of molecular mechanism of amelioration of novel periodic limb pain by aging and its application to drug discovery

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 助教 小林果  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Graduate School of Medicine, Assistant professor, Hatasu Kobayashi

実施期間： 平成28年 4月 1日 ～ 平成29年 3月 31日

分担研究 (日本語) 分子生物学的解析、マウス行動解析、遺伝疫学的解析  
開発課題名： (英語) Molecular biological, mouse behavioral and genetic epidemiological analysis

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 教授 小泉昭夫  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Graduate School of Medicine, Professor, Akio Koizumi

分担研究 (日本語) 分子生物学的解析、マウス行動解析  
開発課題名： (英語) Molecular biological and mouse behavioral analysis

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人京都大学 大学院医学研究科 准教授 原田浩二  
所属 役職 氏名： (英語) Kyoto University, Graduate School of Medicine, Associate professor, Kouji Harada

分担研究 (日本語) 分子生物学的解析  
開発課題名： (英語) Molecular biological analysis

研究開発分担者 (日本語) 武庫川女子大学 生活環境学部 食物栄養学科 准教授 土生敏行  
所属 役職 氏名: (英語) Mukogawa Women's University, Department of Food Science and Nutrition,  
Laboratory of Nutritional Sciences, Associate professor, Toshiyuki  
Habu

分担研究 (日本語) 電気生理学的解析  
開発課題名: (英語) Electrophysiological analysis

研究開発分担者 (日本語) 大学共同利用機関法人自然科学研究機構 (岡崎共通研究施設) 細胞生理部  
門 教授 富永真琴  
所属 役職 氏名: (英語) Inter-University Research Institute National Institutes of Natural  
Sciences, National Institute for Physiological Sciences, Professor,  
Makoto Tominaga

分担研究 (日本語) 臨床の特徴付け  
開発課題名: (英語) Clinical characterization

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人秋田大学 大学院医学系研究科 教授 高橋勉  
所属 役職 氏名: (英語) Akita University School of Medicine, Professor, Tsutomu Takahashi

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人秋田大学 大学院医学系研究科 助教 野口篤子  
所属 役職 氏名: (英語) Akita University School of Medicine, Assistant professor, Atsuko  
Noguchi

## II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

Nav1.9 (*SCN11A* 遺伝子によりコードされる) p.R222H および p.R222S 変異が原因である小児四肢疼痛発作症は、乳児期から思春期に四肢の痛み発作を頻発するが成人期には軽快する、気圧低下・寒冷曝露など環境要因が痛みを誘発するという特徴を有している。本研究課題では、周期性四肢疼痛症の原因となる Nav1.9 変異が病態に果たす役割の解明と、本臨床型についての日本における臨床疫学的検討を行う。また、モデル動物を確立し創薬への利用を目指す。

臨床疫学的検討については、現在まで研究成果のプレスリリース、各種学会、研究会での呼びかけ、医療機関へのアンケート調査を行い、本症の特徴を示す計 26 家系に研究協力を得ている。全家系に対して Nav1.9 p.R222H/S のスクリーニングを行い 10 家系 (38.5%) に変異が見出された。さらに、p.R222H/S が陰性であった患者に対してそれ以外の Nav1.9 変異の探索を行っており、現時点で 3 つの新たな Nav1.9 変異が見出されている。これらの症例に対しては、p.R222H/S 変異を有する症例との間に症状の違いがあるか詳細な臨床情報を得て比較検討を行っていく。また Nav1.9 変異陰性の患者については次世代シーケンサによる Nav1.9 以外の原因変異の探索に着手した。

p.R222H/S 変異が神経細胞に変性をもたらすかどうかを検討する目的で、Nav1.9 p.R222S Knock-in マウスの神経病理学的な解析を行った。Nav1.9 の発現が報告されている後根神経節、皮膚末梢神経、腸管末梢神経を対象に光顕・電顕レベルでの病理学組織学的解析を行い、若齢・老齢ともに R222S Knock-in マウスで神経変性を認めないことが示された。したがって、R222S Knock-in マウスでの疼痛閾値の低下は末梢神経の基質的な変化をともなわない、機能的な影響により引き起こされると考えられる。さらに、上記の遺伝疫学的検討で見出された、新規 Nav1.9 変異の Knock-in マウス作成に着手した。今後は作成したマウスの電気生理学および疼痛行動学的特性を解析して、特に加齢との関係に着目しながら R222S Knock-in と比較検討を行う。

Nav1.9 安定発現細胞株を用いた検討では、Nav1.9 R222H/S 変異体の細胞膜分布を検討し、R222H/S 変異が 37°C 培養下では影響を与えないことが明らかとなった。その一方で、25°C 培養下では Nav1.9 は細胞膜分布が増加することが示された。現在は 25°C 培養下での Nav1.9 の細胞膜輸送に R222H/S 変異が与える影響を検討している。

本研究課題の成果を（遺伝解析、Knock-in マウス疼痛行動解析、電気生理学的解析）2016 年に *PLoS One* 誌に掲載している。

(英文)

Nav1.9 (encoded by *SCN11A* gene) p.R222H and p.R222S mutation cause infantile episodic limb pain, which is characterized by episodic extreme pain in limbs from infancy, improvement of the pain in adult hood, and pain induction by cold exposure, atmospheric depression and bad weather. In this research project, to clarify the role of Nav1.9 mutation in etiology of infantile episodic limb pain, we performed clinical, genetic epidemiological, cell biological, and animal studies. In addition, we aim to establish painful model mouse to use for drug discovery.

We have recruited 26 pedigrees representing the characteristics of this disease by conducting press releases of research results, introducing this disease at various research meetings and academic conference, and questionnaires to medical institutions. We screened Nav1.9 p.R222 H/S mutations in all pedigrees, and found the mutations in 10 pedigrees (38.5%). In addition, we have been searching for other Nav1.9 mutations for patients with negative p.R222H/S, and three new Nav1.9 mutations have been found. For these cases, we will examine detailed clinical information as to whether there are differences in symptoms between cases with p.R222H/S mutations. For patients with no Nav1.9 mutation, we started searching for causal mutations other than Nav1.9 by the next generation sequencer.

To investigate whether p.R222H/S mutation causes degeneration of nerve cells, we performed neuropathological analysis of Nav1.9 p.R222S knock-in mice. Histopathological analysis by light microscopy and electron microscope was performed on the dorsal root ganglion, and the skin and the intestinal peripheral nerve, in which the Nav1.9 expression has been reported. But, neurodegeneration was not observed in both the young and aged R222S knock-in mice. Therefore, hyperalgesia of R222S knock-in mice is likely to be caused by functional change, but not structural change, of peripheral nerves. In addition, we start knock-in mouse generation for new Nav1.9 mutations, which was described in the above-mentioned genetic epidemiological part. We will analyze the electrophysiological and pain behavioral characteristics of the knock-in mouse, and compare it with R222S knock-in mice, especially focusing the relationship with aging.

Study using the Nav1.9 stably expressing cell line revealed that the R222 H/S mutations had no effect on the cell membrane distribution of the Nav1.9 under the culture at 37 ° C. On the other hand, it was shown that the cell membrane distribution increased in Nav1.9 under 25 ° C culture. Currently, we examine the effect of R222H/S mutations on cell membrane transport of Nav1.9 under 25 ° C culture.

The results of this research project (genetic analysis, and behavior and electrophysiological analysis using the knock-in mouse) have been published in *PLoS One* in 2016

### III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0 件、国際誌 1 件)

1. 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, 11(5), e0154827

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 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、口頭、小林果、奥田裕子、人見敏明、塩井大智、原田浩二、小泉昭夫、第 86 回日本衛生学会総会、2016/5/12、国内
2. 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、ポスター、奥田裕子、小林果、原田浩二、小泉昭夫、第 86 回日本衛生学会総会、2016/5/12、国内
3. 慢性疼痛症モデルマウスの作成と疼痛行動解析、ポスター、塩井大智、崔廷米、奥田裕子、小林果、原田浩二、小泉昭夫、第 86 回日本衛生学会総会、2016/5/12、国内
4. 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、口頭、野口篤子、近藤大喜、奥田裕子、小林果、斎藤義朗 大野耕策、浅野健、原田浩二、小泉昭夫、高橋勉、第 26 回日本小児リウマチ学会総会、2016/10/23、国内
5. 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、口頭、野口篤子、近藤大喜、奥田裕子、小林果、斎藤義朗 大野耕策、浅野健、原田浩二、小泉昭夫、高橋勉、第 58 回日本先天代謝異常学会、2016/10/29、国内
6. 新たな小児疼痛疾患「小児四肢疼痛発作症」の原因遺伝子として SCN11A を同定した、口頭、小林果、第 9 回日本運動器疼痛学会、2016/11/26、国内
7. 小児四肢疼痛発作症の遺伝疫学的検討、口頭、加畑理咲子、小林果、奥田裕子、曹洋、人見敏明、原田浩二、小泉昭夫、第 87 回日本衛生学会総会、2017/3/28、国内
8. Scn11a R222S 変異マウス末梢感覚神経の電子顕微鏡観察、ポスター、塩井大智、奥田裕子、加畑理咲子、小林果、原田浩二、小泉昭夫、第 87 回日本衛生学会総会、2017/3/28、国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

なし

(4) 特許出願

なし