

乳幼児期に特異的な手足の痛み発作を起こす病気を見つけ原因を解明

- この病気を小児四肢疼痛発作症と命名 -

概要

昔から、乳幼児期に原因がわからずよく泣く子供は「疝（かん）」の強い子だと言われてきました。秋田大学医学研究科 小児科学講座と京都大学医学研究科 環境衛生学分野を中心とした共同研究グループ*は2012年以来調査を行い、「疝」の強い乳幼児の一部は、寒さや悪天候、疲労、体調不良などを契機として誘発される手足の痛み発作が原因でよく泣いたことを見出しました。さらに、この痛み発作は、思春期以降に軽快し、親や兄弟も同じ様に手足の痛みを体験していたことが分かりました。調査に参加していただいた全国23名の子供たちと6家族の御協力を得て、遺伝子^[1]の解析およびマウスモデル^[2]を用いた解析を行い、3番染色体にある、*SCN11A* 遺伝子 (Nav1.9) の一塩基変異^[3]が原因であることを見つけました。これらの子供たちは、共通して p.R222H あるいは p.R222S 変異を有していました。本研究により、乳幼児期に始まる手足の痛み発作の原因が特定され、疾患として新たに確立することができました。この病気を「小児四肢疼痛発作症」^[4] (Infantile episodic limb pain) と命名しました。本研究の成果は、米国の open access 科学誌 *PLOS ONE* 誌へ掲載されます。また、本疾患は、現在まで日本各地（東北、関東、中国）の3県に23名が見出されており、成長に伴い痛みは軽快することから見過ごされてきたと考えられ、潜在患者の数は多いことが予想されます。

*共同研究グループ

京都大学医学研究科 環境衛生学分野

教授 小泉 昭夫 (こいずみ あきお)

研究員 (研究当時) 奥田 裕子 (おくだ ひろこ)

特定講師 小林 果 (こばやし はたす)

准教授 原田 浩二 (はらだ こうじ)

大学院生 塩井 大智 (しおい ひろとも)

大学院生 加畑 理咲子 (かばた りさこ)

秋田大学医学研究科 小児科学講座

教授 高橋 勉 (たかはし つとむ)

助教 野口 篤子 (のぐち あつこ)

医員 近藤 大喜 (こんどう だいき)

京都大学医学研究科 分子バイオサイエンス分野

教授 Shohab Youssefian (ショハブ ユーセフィアン)

第一三共株式会社 生物医学研究所

副主任研究員 土門 友紀 (どもん ゆき)

副主任研究員 窪田 一史 (くぼた かずふみ)

主任研究員 北野 裕 (きたの ゆたか)

岡崎統合バイオサイエンスセンター 細胞生理研究部門

助教 高山 靖規 (たかやま やすのり)

教授 富永 真琴 (とみなが まこと)

聖マリアンナ医科大学 予防医学講座

准教授 人見 敏明 (ひとみ としあき)

山陰労災病院

病院長 大野 耕策 (おおの こうさく)

鳥取大学医学部 脳神経小児科講座

准教授 斎藤 義朗 (さいとう よしあき)

日本医科大学千葉北総病院 小児科

部長 浅野 健 (あさの たけし)

1. 背景

日本ではよく泣く子どもは「疝 (かん)」が強いと言われてきましたが、泣く原因は不明でした。我々の共同研究グループは、2012年から開始した調査により、そうした「疝」の強い子供たちの一部では乳幼児期の手足の痛み発作が原因となっていることを明らかにしました。見出された子供たちには1) 乳幼児期に痛み発作がおこる (急に泣く・不機嫌になる、言葉が話せるようになると「痛い」と訴える)、2) 手足の関節に発作的な痛みが繰り返し起こる、3) 青年期に軽快する、4) 寒冷や悪天候で痛みが誘発・悪化する、5) 親族にも同じ症状を認める、という特徴的な症状が共通してみられることが分かりました (図1)。本研究では、この原因不明の家族性小児疼痛疾患について、常染色体優性遺伝¹⁾を示す6家系から23名の患者さんに研究へのご協力をいただき原因遺伝子の探索を行いました。

- ・乳幼児期に痛くなる
(急に泣く・不機嫌になる、いわゆる「疳」の強い子、言葉が話せるようになると「痛い」と訴える)
- ・手足の関節におこる発作的な痛み
(15-30分間持続、10-20回/月程度)
- ・青年期にほぼ痛みはなくなる
- ・寒さ・悪天候で痛くなる
- ・親族に同じ症状

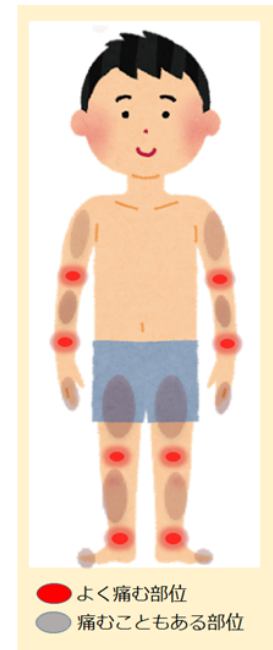


図1.「小児四肢疼痛発作症」の特徴

2. 研究手法・成果

遺伝子の解析は〈全ゲノム連鎖解析〉⁶⁾という原因遺伝子が存在する染色体領域を明らかにする方法と、〈エクソーム解析〉⁷⁾という次世代シーケンサーを用いた全遺伝子のエクソン領域塩基配列を決定する方法を併用して行いました。その結果、3番染色体にある、Nav1.9 (痛みに関与するナトリウムチャンネル⁸⁾のひとつ)をつくる *SCN11A* 遺伝子の p.R222H および p.R222S 変異 (Nav1.9 の 222 番目のアミノ酸であるアルギニンをヒスチジンあるいはセリンに変化させる変異) が疾患の原因であることを明らかにしました (図 2)。原因遺伝子が明らかになった点を鑑み、我々は本疾患を「小児四肢疼痛発作症」と名付け、病気の概念を確立しました。

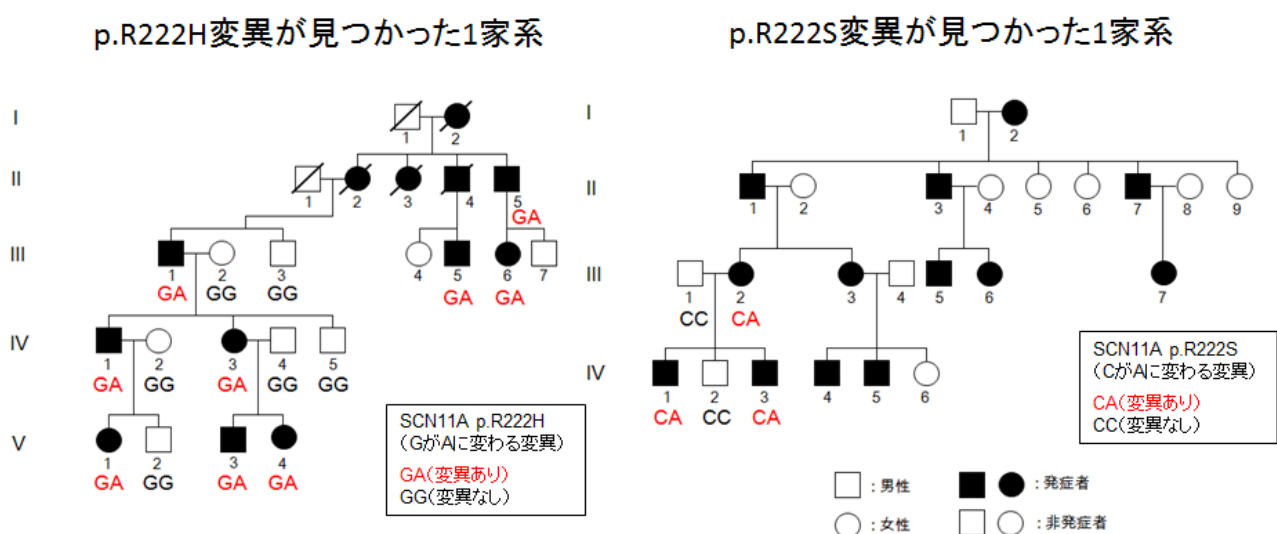


図2. *SCN11A* 遺伝子 p.R222H および p.R222S 変異の同定

代表的な2家系を示す。発症者は変異を有しており、非発症者では変異を認めないことがわかる。

見つかった変異が痛みにつながるかどうかを検討するために、マウスの *Scn11a* 遺伝子に患者が持っている変異のうちの 1 つである p.R222S 変異を導入したノックインマウス^[9]を作成しました。マウスの痛みの感じ方を評価する解析（疼痛行動解析^[10]）を行ったところ、ノックインマウスは患者さんと同様に機械的的刺激、温刺激、冷刺激に対して正常マウスよりも痛みを感じやすいことが明らかになりました（図 3）。

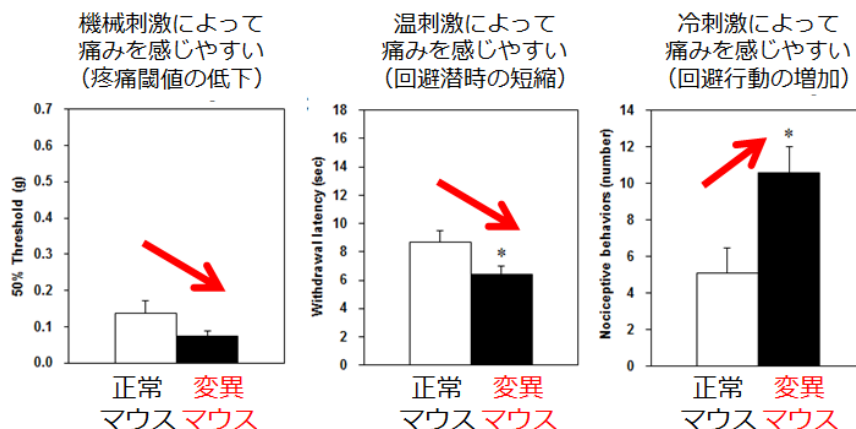


図3. 変異ノックインマウスは痛みを感じやすい
 機械刺激、温刺激、冷刺激の検査において、R222S変異を有するノックインマウスは正常マウスと比較して痛みを感じやすいことが証明された。

またマウスの脊髄後根神経節（DRG）ニューロン（痛みを伝える神経細胞）を用いて電気生理学的解析^[11]を行い、神経の情報伝達手段である電氣的信号の状態を評価しました。その結果、ノックインマウスの DRG ニューロンは正常マウスと比べて電氣的な興奮が起こりやすいことがわかりました（図 4）。

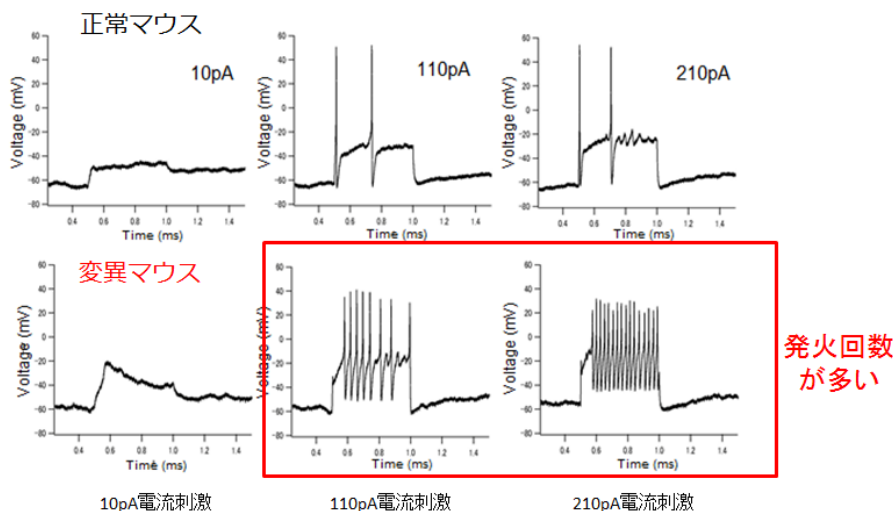


図4. 変異ノックインマウスの痛み神経細胞は興奮しやすい
 発火を示すピークが多いほど神経細胞が興奮しやすいことを表す。R222S変異を有するノックインマウスの痛み神経細胞は正常マウスと比較して興奮しやすいことが証明された。

本研究の概要を図 5 に示します。上記の結果から、*SCN11A* 遺伝子 (Nav1.9) の p.R222H および p.R222S 変異は痛み伝達神経を過剰に興奮させることで痛みを引き起こすと考えられます。近年、*SCN11A* 遺伝子の変異は小児の痛みだけでなく、高齢者の疼痛疾患 (小径線維ニューロパチー)、無痛症など様々な痛み関連疾患の原因となることが報告され注目を集めています (図 6)。小児の発作性の痛みを引き起こす *SCN11A* 遺伝子変異についても、現在までに 2 報の報告があります (*Am J Hum Genet* 2013、*Nat Commun* 2015 ; 図 6 参照)。しかしながら、*SCN11A* 遺伝子の特定の部位に変異がある症例では痛みが主でそのほかの症状はなく、痛みは小児期にのみみられ、成人するとほぼなくなることはわかっていませんでした。この事実が明らかになり、独立した「小児四肢疼痛発作症」として疾患概念を確立するに至りました。また原因変異を特定したことで遺伝子診断が可能になりました (注)。

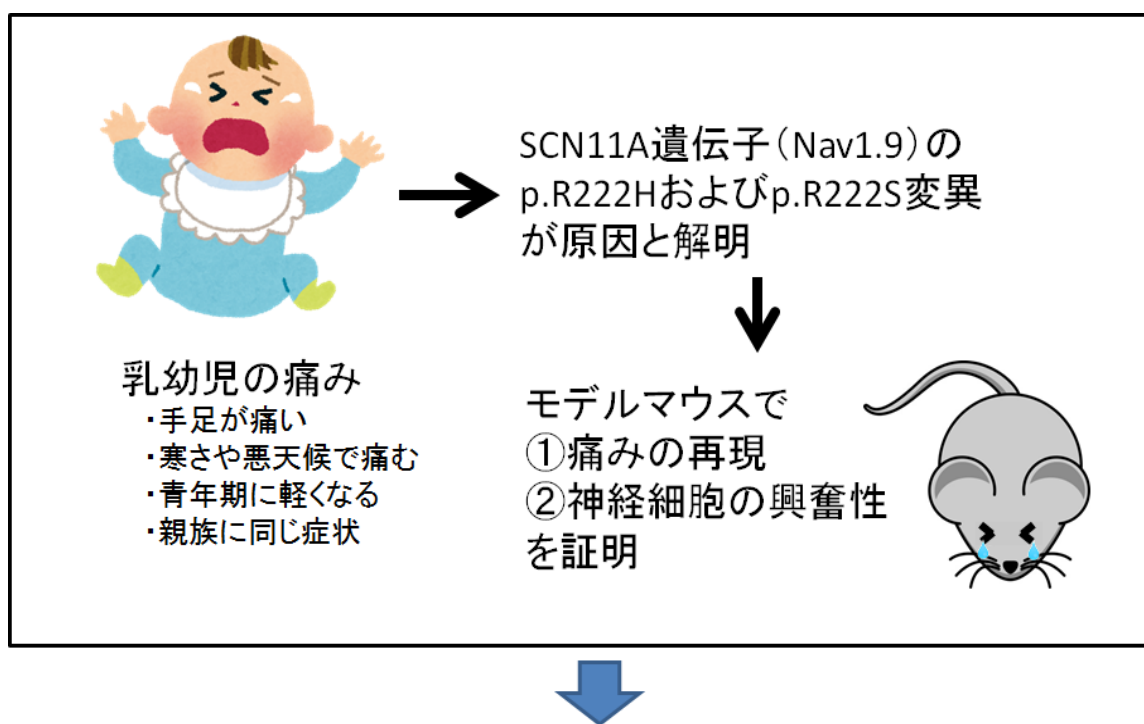


図5.本研究の概要

疾患	SCN11A変異	論文
無痛症	L811P	<i>Nat Genet</i> 2013
疼痛性小径線維ニューロパチー (高齢者)	I381T、L1158P	<i>Brain</i> 2014
	G699R	<i>J Neurol Neurosurg Psychiatry</i> 2015
小児の発作性の痛み	R222H、R222S	本研究 (<i>PLoS One</i> 2016)
	R225C、A808G	<i>Am J Hum Genet</i> 2013
	V1184A	<i>Nat Commun</i> 2015

①症例が1家系にとどまる、②自律神経症状の有無が一定しない

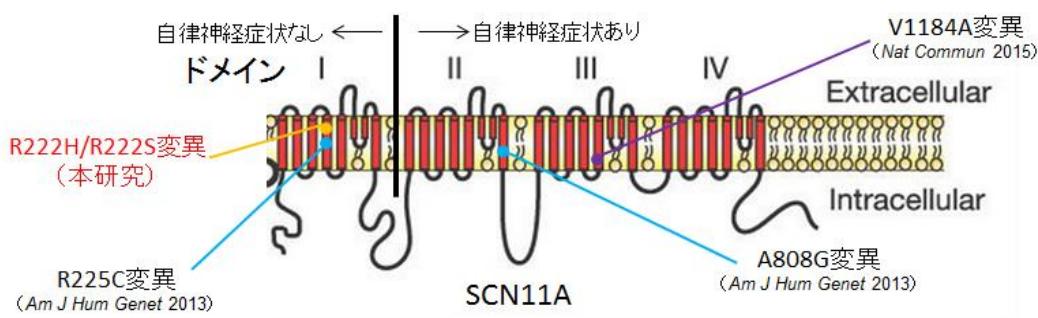


図6.現在までに報告されているSCN11A変異による痛み関連疾患

注：以前の報告は①症例が1家系にとどまる点、②痛みに合併する自律神経症状が長く継続する点、③変異が存在するSCN11A遺伝子のドメイン（用語解説[8]、図6参照）がばらばらで各変異が遺伝子機能に与える影響が不明である点、の3点から疾患概念を確立するに至っていませんでした。それに対して、本研究では、6家系に共通するSCN11A遺伝子のドメインIの変異に特徴的な症状—即ち、痛み以外の症状（例えば下痢など）はなく、痛みは小児期にのみみられ成人するとほぼなくなる—が明らかになり、「小児四肢疼痛発作症」として疾患概念を確立することができました。本研究症例の変異の位置の関係を図6に示します。

3. 波及効果

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りました。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ます。現在まで、我々は比較的短い期間の調査で7家系（6家系を論文発表した後、さらに1家系が発見されました）、合計24名の患者さんを日本各地で見出しており、本症の国内での頻度は比較的高いことが予想されます。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すが、成長痛だと考えられてきました。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患者さんが数多く存在する可能性が高いと考えられます。

4. 今後の予定

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予定です。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、モデルマウス実験や細胞実験により本疾患の病態解明を行っていきます。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ました。こうした環境要因や加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できます。

<論文タイトルと著者>

“Infantile pain episodes associated with novel Nav1.9 mutations in familial episodic pain syndrome in Japanese families”

Hiroko Okuda, Atsuko Noguchi, Hatasu Kobayashi, Daiki Kondo, Kouji H. Harada, Shohab Youssefian, Hiroto Shioi, Risako kabata, Yuki Domon, Kazufumi Kubota, Yutaka Kitano, Yasunori Takayama, Toshiaki Hitomi, Kousaku Ohno, Yoshiaki Saito, Takeshi Asano, Makoto Tominaga, Tsutomu Takahashi, and Akio Koizumi

PLOS ONE Vol. 11 page e0154827, 2016, doi: 10.1371/journal.pone.0154827

<用語解説>

[1] 遺伝子

タンパク質の設計図となる DNA 配列のこと。各遺伝子の DNA 配列に従ってアミノ酸がつなぎ合わされタンパク質が作られます。ヒトは約 2 万 2000 個の遺伝子を持ち、本研究ではこの中から病気の原因となる遺伝子の探索が行われました。

[2] モデルマウス

ヒトの病気を再現する特殊なマウス（ハツカネズミ）。病態解明、治療法開発等を目的に医学研究で頻繁に用いられます。

[3] 一塩基変異

遺伝子は DNA の 4 つの塩基 A（アデニン）、C（シトシン）、T（チミン）、G（グアニン）の配列によって決まります。一塩基変異とは遺伝子の中のある塩基が別の塩基に変化する遺伝子変化のことです（例：本研究で取り上げた *SCN11A* 遺伝子の p.R222H 変異は G が A に変わる変異、p.R222S 変異は C が A にかわる変異です、図 2 参照）。

[4] 小児四肢疼痛発作症

小児期から四肢に発作性の痛み（疼痛）を生じる新しい病気。今まで存在が知られておらず、本研究で疾患概念が確立されました。名前は本研究グループの命名によります。

多くの患者さんでは 1-2 歳ごろから痛みが始まります。痛みの部位としては膝、肘、手首、足首などの関節周囲が多いですが、大腿や下腿、上腕、手指などに痛みを生じることもあります（図 1 参照）。一方腹部、背中、首、腰などの体幹には痛みは生じません。

痛みは不定期に発作性におこり、1回の発作においては数分から数十分の痛みを数回繰り返します。多くの患者さんで、発作は低気圧や寒冷、疲労などで誘発されます。

本疾患は血液検査や画像検査で特に異常がみられないこともあり、患者さんの痛みのほとんどは原因不明とされてきました。痛みに対しては鎮痛剤を含む対症療法が行われていますが、その効果は十分ではありません。患者さんのなかには痛みのために小児期に夜間の不眠や長期の学校の欠席を強いられてきたひともあります。発作は10代後半ごろからは徐々に軽快し、成人になるとほぼ消失します。

[5] 常染色体優性遺伝

ヒトの遺伝子は父親から受け継いだものと母親から受け継いだものの2つのペアでできています。このペアのどちらか片方に何らかの異常(変異)を持っているときに症状(病気)が出るような遺伝のしかた(図2参照)を『常染色体優性遺伝』と呼びます(一方、病気の種類によってはペア2本ともに変化があって初めて病気がでるものもあり、このような病気の遺伝は常染色体劣性遺伝と呼びます)。したがって常染色体優性遺伝病においては、ご両親のどちらかに病気がある場合、1/2の確率でお子さんにも同じ病気が受け継がれることになります。

[6] 全ゲノム連鎖解析

病気の原因となっている染色体領域を特定する実験手法。染色体は細胞核にあるDNAの集合体であり、染色体上に遺伝子が存在します。ヒトの場合は23種類(常染色体22種類+性染色体1種類)あり、父親から受け継いだものと母親から受け継いだものの2本の合計46本を持っています。各染色体のどの領域にどの遺伝子が存在するかは解明されているので、病気の原因となっている染色体領域を特定することで、原因遺伝子の候補を大幅に絞り込むことができます。

[7] エクソーム解析

全遺伝子のエクソン領域の塩基配列を決定する実験手法。エクソンは遺伝子配列のうちタンパク質の設計図になる部分で(それ以外の部分はイントロンと呼ばれます)、遺伝する病気の大多数ではエクソンの変異が原因となります。エクソーム解析は、次世代シーケンサーとよばれる高速にDNA配列を決定できる新しい機器の開発に伴い、最近になって実現された方法です。

[8] ナトリウムチャンネル

ナトリウムチャンネルは細胞膜に存在するタンパク質の一つで、ナトリウムイオン(Na^+)を通す「門」を開閉することで細胞内へのナトリウム流入を調節する役割を持っています。ナトリウムチャンネルは、共通した特徴として4つのドメイン構造(I-IV)(*)からなっておりそれぞれ違う役割を有しています。今回見つかった変異は何れもドメインIに存在します。神経細胞においては、ナトリウムチャンネルが開くことで細胞膜を通過する電流が生じ(正電荷を持つ Na^+ が流入するため)、「発火」(図4参照)と呼ばれる神経の電氣的信号の伝導が起こりやすくなります。本研究では「発火」の回数を評価して、神経細胞の興奮のしやすさを解析しています。

*ドメイン構造：タンパク質の中で特有の機能を持つことが知られている構造

[9] ノックインマウス

遺伝子に人工的に変異を挿入したマウス。本研究ではマウスの *Scn11a* 遺伝子に p.R222S 変異に相当する一塩基変異を挿入しています。実験には患者さんと同様に *Scn11a* 遺伝子ペアの片方にだけ変異を有したマウスを用いています。

[10] 疼痛行動解析

解析の詳細を以下に記します。

機械刺激による痛みの評価 (von Frey 試験) : マウスの後肢をフィラメントで刺激します。順番にフィラメントを太くしていき、刺激を大きくします。マウスが足を上げた時の太さで痛みが生じる閾値を評価します。

温刺激による痛みの評価 (Hargreaves 試験) : マウスの後肢を赤外線で刺激します。赤外線を当ててマウスが足を上げるまでの時間 (潜時) を測定して、熱により痛みが生じる閾値を評価します。

冷刺激による痛みの評価 (Cold plate 試験) : 10°Cのプレート上でマウスを一定時間観察します。足をあげるなどの痛み回避行動の回数で、低温による痛みの感じやすさを評価します。

[11] 電気生理学的解析

本研究では、マウス脊髄から採取した DRG 神経細胞に微小電極で穴を開け、細胞内外の電位差の測定を行いました。一定電流を細胞内に流した時の電位変化から神経細胞の「発火」の回数を測定することで細胞の興奮しやすさを評価しました。