

令和 4 年 10 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15413

研究課題名（和文）頭痛関連SNPと心拍変動解析法を組合わせた一次性頭痛鑑別法の新規構築

研究課題名（英文）Verification of novel methods to identify migraines using genetic polymorphism analysis and spectral analysis of heart rate variability

研究代表者

平 千明（Taira, Chiaki）

信州大学・学術研究院保健学系・助教

研究者番号：40779310

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）： 日常診療の中で訴えの多い慢性頭痛に着目し、一塩基変異（SNP）を用いた遺伝子解析と心拍変動解析による自律神経活動の指標であるLF/HF比を組み合わせた新規片頭痛鑑別法の構築を行った。片頭痛群では家族歴が優位に高く、ASTN2（rs6478241）とPHACTR1（rs9349379）のどちらかまたは両方のリスクアリルを有する場合に片頭痛との関連性が高く、安静座位でのLF/HF比が優位に低いことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭痛鑑別では、血液検査所見や画像所見などのバイオマーカーに関する項目が含まれていないことが、他疾患の基準と比べ特徴的な点である。頭痛関連SNPsを用いて各オッズ比から片頭痛のかかりやすさを数値化し、心拍変動解析によるLF/HF比を定量的に検出することで、より客観的に、より正確性をもって、一次性頭痛を鑑別することが可能となる。本研究成果により、医師の熟練度や主観だけでなく、客観的検査データを伴った新規頭痛鑑別法の応用が期待される。

研究成果の概要（英文）： Two major causes of primary headache disorders are migraine and tension-type headache, and differentiating between them is particularly important for appropriate treatments. However, useful diagnostic methods to differentiate between them have not yet been developed. In this study, we assessed the usability of novel methods combining genetic analysis of migraine-associated single nucleotide polymorphisms and spectral analysis of heart rate variability to identify migraines.

A family history of headache disorders and A allele of ASTN2 (rs6478241) and/or A allele of PHACTR1 (rs9349379) is associated with migraines. Moreover, the LF/HF ratio determined via spectral analysis may be a good diagnostic method to differentiate migraines. A decline in the LF/HF ratio reflects the predominant state of the parasympathetic nerve, and our data suggest that migraineurs may always be prone to induced cerebral vasodilation associated with parasympathetic activity.

研究分野：分子生物学、生理機能検査学

キーワード：ASTN2 PHACTR1 心拍変動解析 LF/HF比 片頭痛

1. 研究開始当初の背景

(1) 一次性頭痛は日常診療の中で最も多い訴えの一つである慢性頭痛であり、その約 80%が「片頭痛」と「緊張型頭痛」である。これら一次性頭痛は日常生活に支障をきたすことが多い疾患にも関わらず、医療機関受診率は 30%程度と低く、その半数以上が途中で診療を中断しており、大多数が市販薬のみで対処しているのが本邦の現状である。一次性頭痛を正確に診断することは、適切な治療を行うために必須である。しかし、器質的疾患に起因する二次性頭痛と異なり、一次性頭痛の鑑別においては CT や MRI 等の画像診断の有用性は低く、血液検査や生理検査等で指標となるバイオマーカーも明らかにされていない。そのため、国際頭痛分類第 3 版 beta 版 (ICHD-3 beta) に基づく問診が主体であり、診断が医師の熟練度や主観に依存しているのが現状である。

(2) 片頭痛に関して、イオンチャネルや血管疾患、血管平滑筋収縮、一酸化窒素シグナルや酸化ストレス、神経伝達物質との関連性が優位な発症関連一塩基多型 (SNP) がゲノムワイド関連解析 (GWAS) により多数報告されているが、個々の SNP のオッズ比は高いとは言えず、技術的にも臨床検査に応用しうる簡便かつ cost-effective な方法は検討されていない。

(3) 起立時は交感神経の興奮により血圧が維持されるが、片頭痛では起立性低血圧を来しやすく (Gotoh F, et al. 1984 and Thijs RD, et al. 2006) 起立時の交感神経興奮をモニタリングすることで片頭痛と緊張型頭痛を鑑別するスクリーニング方法が金沢大学の吉川らによって発明された (Edahiro S and Yoshikawa H, et al. 2015) 加速度脈波形による心拍変動解析から得られた低周波 (LF) と高周波 (HF) のパワースペクトル解析により、交感神経活動 (LF/HF) を算出し、その立座比による片頭痛鑑別法であるが、まだ製品化されておらず、装置の改良及び結果の妥当性について検討する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、頭痛関連 SNPs と心拍変動解析を組み合わせて、患者数の多い一次性頭痛のスクリーニング法を構築することである。GWAS で明らかになった頭痛関連 SNP を日常検査に応用し簡便かつ高感度な検出系を構築し、生体検査である心拍変動解析結果を併用することで、客観的な一次性頭痛鑑別法の実現を目指す。

3. 研究の方法

(1) 頭痛診断に応用可能な SNP 検出法構築

アジア人で片頭痛と関連性が高い 5 つの SNPs: *MEF2D* (rs2274316, リスクアリル: C)、*ASTN2* (rs6478241, リスクアリル: A)、*PRDM16* (rs2651899, リスクアリル: C)、*SUGCT* (rs4379368, リスクアリル: T)、*PHACTR1* (rs9349379, リスクアリル: A) を対象として、QIAGEN 社の抽出キットを使用して口腔粘膜の擦過細胞から DNA を抽出した。塩基特異的プライマーを使用した Real-time PCR 法による genotyping を行い、ダイレクトシーケンシング法との一致率を確認した。

(2) 心拍変動解析プロトコルの確立

株式会社トライテックの心電図による心拍変動解析装置 (チェック・マイハート) を使用して起立負荷検査を行い、交感神経活動の指標である LF/HF 比立座比を算出した。本学医学部保健学科学生 21 名を対象として、同時再現性・日内変動・日差変動について検証を行い、至適プロトコルを決定した。

(3) 本学医学部保健学科学生および教職員 64 名を対象として頭痛判定システムの有用性の検証を行った。慢性頭痛の鑑別には、国際頭痛分類第 3 版 beta 版 (ICHD-3 beta) に基づく問診アンケートを作成し、神経内科医が行った。

なお、本研究は本学医学部遺伝子倫理委員会の承認を得て行った (承認番号: 621)。

4. 研究成果

(1) 塩基特異的 PCR による genotyping 法の確立

MEF2D、*ASTN2*、*PRDM16*、*SUGCT* の 4 種類の SNP は、表 1 の変異塩基特異的プライマーを使用して SYBR Green 法による Real-time PCR による genotyping を行った。リアルタイム PCR 装置には、ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社の LightCycler 480 Instrument を使用した。95 10min - (95 10sec - 60 10sec - 72 10sec) × 45cycle 行い、1 時間以内での genotyping が可能であり、ダイレクトシー

表 1 4 種 SNP の塩基特異的プライマー

| Target genes | Allele specific Primers (5'-3') |
|------------------------------------|---|
| <i>MEF2D</i> (rs2274316) [A/C] | F: ggggaccgcagagcaacaa ggggaccgcagagcaacac R: cagagactgaacatccccttgg |
| <i>ASTN2</i> (rs6478241) [A/G] | F: ggtaggggagagaaaagacaaga ggtaggggagagaaaagacaagg R: tgaaaagcagacagacatggacc |
| <i>PRDM16</i> (rs2651899) [T/C] | F: agaagactcccaggaggt R: gttgaaaaatcgctttccca gttgaaaaatcgctttcacg |
| <i>SUGCT</i> (rs4379368) [C/T] | F: ggatggtattgactttacatcgcc ggatggtattgactttacatccct R: ctaattccagaatccccacagtg |

クエンス法との結果も全て一致した。*PHACTR1*はプライマーの改良を行ったものの、上記4種と同一の検出系では特異的検出が出来ず、ダイレクトシーケンスによる genotyping のみを行った。

(2) 心拍変動解析プロトコルの確立

日内・日差変動を確認するために LF/HF 比 (立座比) を 2 日間、朝夕で 3 重測定し、頭痛の有無で比較を行った。日内変動の確認には 1 日目の朝夕の LF/HF 比 (立座比) の差を算出したところ、有頭痛群 vs. 無頭痛群の mean±SD は 1.34 ± 0.82 vs. 0.73 ± 0.46 ($p=0.108$) と、有頭痛群では朝夕での測定値の変動が大きい傾向にあった。日差変動として、2 日間の朝、夕の立座比よりそれぞれ Coefficient of Variation (CV) を算出し評価した。有頭痛群では朝の CV (mean±SD) が 0.50 ± 0.32 、夕方が 0.43 ± 0.26 、対照群では朝が 0.23 ± 0.25 、夕方が 0.40 ± 0.35 であった。両群の CV がどちらも同程度であった夕方の測定が最適と判断し、15 時~17 時を測定時間とした。心拍変動解析は自律神経の影響を受けるため、13 時以降の食事、カフェイン摂取、喫煙を制限した。測定方法は、1)5 分間安静座位、2)座位にて 5 分間脈拍測定、3)立位にて 5 分間脈拍測定し、1)~3)を 1 セットとして、1 回につき 2 セット行い、変動要因を少なくするため、メトロノームを用いて呼吸を一定にした状態で測定した。

(3) 本学医学部保健学科学生および教職員 64 名の頭痛保有率

神経内科医による問診アンケートの結果、片頭痛 17 名、片頭痛と緊張型頭痛の混合型が 3 名、緊張型頭痛が 3 名、頭痛なしが 41 名であった。混合型を含む片頭痛群 20 名と頭痛なし (対照群) 41 名の計 61 名を対象に、SNP 関連性および LF/HF 比測定結果を検証した。61 名の基本データを表 2 に示す。

表 2 61 名の基本データ

| | 片頭痛群 | 対照群 |
|----------------|-----------|------------|
| N数 (男:女) | 20 (7:13) | 41 (14:27) |
| 年齢 (mean±SD) | 29.1±12.1 | 29.6±13.4 |
| BMI (mean±SD) | 20.4±2.0 | 21.4±3.1 |
| 家族歴保有率 (%) | 50.0 | 22.0 |
| リスクアレル保有率 (%) | | |
| <i>MEF2D</i> | 55.0 | 43.9 |
| <i>ASTN2</i> | 60.0 | 63.4 |
| <i>PRDM16</i> | 55.0 | 73.2 |
| <i>SUGCT</i> | 60.0 | 68.3 |
| <i>PHACTR1</i> | 60.0 | 56.1 |

(4) 61 名での新規片頭痛鑑別法の有用性評価

家族歴

片頭痛群では対照群と比べて家族歴が優位に高値を示した ($p=0.0276$)。また家族歴を有する場合のオッズ比 (OR) = 3.56 [95%信頼区間 (95% CI): 1.1294-11.1933, $p=0.0264$] と、家族歴を有する場合は、片頭痛発症の可能性が高まることが明らかとなった。

5 種の SNP genotyping

各 SNP は単独では、リスクアレル保有率・保有数ともに有意差は認められなかった。OR [95% CI] は *MEF2D*、*ASTN2*、*PRDM16*、*SUGCT*、*PACTR1* それぞれで、1.562 [0.533-4.578]、1.156 [0.386-3.462]、0.448 [0.146-1.373]、0.696 [0.229-2.114]、1.174 [0.396-3.486] であり、いずれも有意差は認められず、単独で片頭痛との関連性がある SNP は明らかではなかった。一方、SNP 2 種類の組み合わせでは *ASTN2* と *PHACTR1* のどちらかまたは両方のリスクアレルを有している場合は OR=6.9667 [0.8310-58.4038, $p=0.0408$]、*PRDM16* と *SUGCT* のどちらかまたは両方のリスクアレルを有している場合は OR=0.2051 [0.0341-1.230, $p=0.0837$] であり、95%信頼区間が 1 を含むものの、*ASTN2* と *PHACTR1* が片頭痛関連 SNP である可能性が示唆された。

心拍変動解析による LF/HF 比

61 名のうち同意の得られた 57 名 (片頭痛 18 名、対照群 39 名) について心拍変動解析を行った。LF/HF 比座位、立位、立座比それぞれの測定値 (mean±SD) は、片頭痛群 vs. 対照群で 1.14 ± 0.82 vs. 2.20 ± 2.04 ($p=0.020$)、 3.69 ± 5.10 vs. 4.21 ± 3.51 ($p=0.272$)、 2.67 ± 1.03 (外れ値 1 例除く) vs. 2.37 ± 1.58 ($p=0.096$) であり、座位でのみ有意差を認めた。座位での LF/HF 比の ROC 曲線下の面積 (AUC) は 0.6980 [0.5569-0.8391, $p=0.0059$] (図 1) と LF/HF 比により片頭痛を区別できる可能性が示唆され、カットオフ値の候補は 1.15 (FPF=0.3846, TPF=0.6667, OR=3.2000) となった。

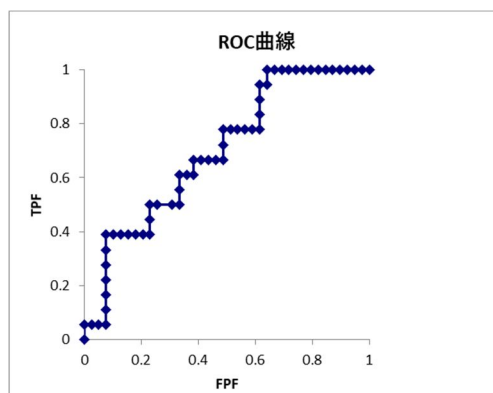


図 1 LF/HF 比 (座位) の ROC 曲線

【総括】片頭痛群では家族歴が優位に高く、その一因として *ASTN2* や *PHACTR1* が影響している可能性が示唆された。また、片頭痛群では安静座位での LF/HF 比が優位に低く、副交感神経優位による脳血管拡張を反映していると考えられ、新規片頭痛鑑別法としての本法の応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Chiaki Taira, Misaki Hanawa, Kazuyuki Matsuda, Masahide Yazaki |
| 2. 発表標題 Verification of novel methods to identify migraines using genetic polymorphism analysis and spectral analysis of heart rate variability |
| 3. 学会等名 IFBLS 34rd World Congress of Biomedical Laboratory Science (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平 千明, 花輪みさき, 千田実穂, 矢崎正英 |
| 2. 発表標題 SNPと心拍変動を組み合わせた頭痛鑑別システムの構築と検証 |
| 3. 学会等名 第66回日本臨床検査医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究協力者 | 花輪 みさき (Hanawa Misaki) | | |
| 連携研究者 | 矢崎 正英 (Yazaki Masahide) (70372513) | 信州大学・学術研究院保健学系・教授 (13601) | |

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 |
|-------|---|--|----|
| 連携研究者 | 松田 和之 (Matsuda Kazuyuki) (00647084) | 信州大学・学術研究院保健学系・教授 (13601) | |

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 |
|---------|---------|
| | |