

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670670

研究課題名(和文)無痛症患者の遺伝子学的解析による新規痛み関連分子の検索

研究課題名(英文)genetic analysis of pain-related molecules in a patient with hereditary congenital indifference to pain

研究代表者

杉山 由紀(SUGIYAMA, Yuki)

信州大学・学術研究院医学系・助教

研究者番号：10468100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：常染色体劣性遺伝と考えられる、知能が正常で、熱傷を繰り返す、先天性無痛症患者家系を発見した。既知の先天性無痛症の臨床症状と一致しない部分があるため、この患者の遺伝子学的解析と生理学的検査を行った。本研究は、当院倫理委員会の承認を受けて行った。生理学的検査では、振動覚と熱刺激に対する感覚閾値および痛み閾値が正常対照の95%以上と有意に上昇していた。神経伝導速度は正常だった。遺伝子学的解析から、Nav1.7をコードするSCN9Aが、本患者家系の無痛症の候補遺伝子と考えられた。SCN9AのDNAシーケンスの結果、exon10において、c.1144T>Gのホモ接合のミスセンス変異が検出された。

研究成果の概要(英文)：We encountered patients, who manifested congenital indifference to pain, normal intelligence and repeated thermal injuries and were born from consanguineous parents. Some clinical symptoms and results of physiological examinations did not match those of congenital indifference to pain reported to date. We thus carried out a genetic analysis and examined neurophysiological function test. After approval of the study protocol by the ethical committee of our institution, informed consent was obtained from the patients. Sensation thresholds for both vibration and change of skin temperature in the extremities were increased, and patients felt no painful perception in response to noxious thermal stimuli. As results of genetic analysis, SCN9A, which encodes Nav1.7, was considered to be a candidate gene of their symptom. A homozygous missense mutation 1144T>G in exon 10 was detected from direct sequencing of SCN9A.

研究分野：神経科学

キーワード：先天性無痛症

1. 研究開始当初の背景

既に報告されている遺伝性感覚自律神経ニューロパシーとは症状が異なり、痛み刺激を認識するが不快とは感じない、長野県内の先天性無痛症家系患者を見出した。現在知られている無痛症の多くは痛覚のみならず、温度覚や交感神経の機能消失を伴う遺伝性感覚自律神経ニューロパシー (Hereditary sensory and autonomic neuropathy; HSAN) である。こうした末梢性の無痛症は 14 の遺伝子異常が報告されているが (Nat.Rev.Neurol 2012 ; 8 : 73-85)、本患者の臨床症状は、これら HSAN 症状と一致しない。また本患者は、知覚はあるが不快ではないという点で、末梢神経ではなく、脳の認知機構に何らかの異常がある Congenital indifference to pain (CIP) の症状といえる。現在、CIP の原因遺伝子および詳細な病態機序については不明である。各種疾患の原因遺伝子や変異部位の特定は、多大な時間と労力をかけても、原因の特定に至らないという問題があった。しかし、近年、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子解析手法が発達し、解析時間が短縮され、解析精度は格段に高まった。本研究では、新たに見出した無痛症家系に対し、網羅的な手法による遺伝子解析を行い、確定的な結果が得られる点が独創的である。また、新たな痛み関連遺伝子異常の特定は、新たな鎮痛薬の開発に直結するため、臨床上きわめて有意義な研究である。

2. 研究の目的

本患者の原因遺伝子とその機能および疾患

の病態機序を明らかにする。

3. 研究の方法

本研究は、信州大学医学部医倫理委員会の承認 (No. 425) を受けて行った。常染色体劣性遺伝病の候補原因遺伝子を絞り込むため、2 名の患者血液を用いてオリゴヌクレオチド SNP array を行った。SNP array は既知の SNP 部位において、相同染色体の SNP 配列がヘテロ接合であるか、ホモ接合であるかを網羅的に解析する手法である。ホモ接合が連続している部位を Loss of Heterozygosity (LOH) 領域といい、この領域は共通祖先からの配列が保存されている領域と考えられる。LOH 領域のカットオフを 5Mb とし、5Mb を超過する LOH 領域を共通祖先由来の遺伝子領域とした。2 名の患者に共通する共通祖先由来の遺伝子領域を解析した。この領域内に既知の 14 の無痛症原因遺伝子 (Table 1) が含まれているかどうかを照合した。

常染色体優性

SPTLC1, SPTLC2, ATL1, RAB7A, DNMT1,
3q24-p22

常染色体劣性

WNK1, FAM134B, KIF1A, IKBKAP, NTRK1,
NGFb, CCT5, SCN9A

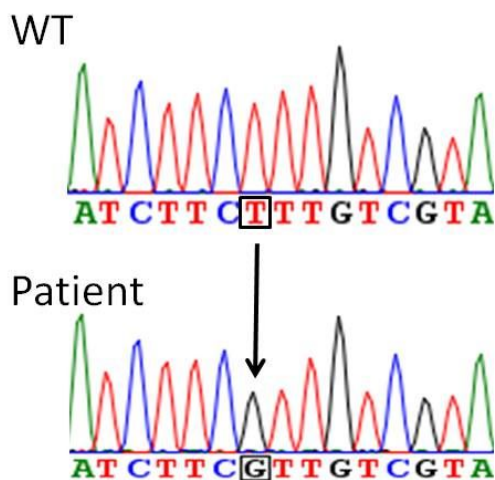
(Table 1) 既知の無痛症原因遺伝子

次に、この領域内に含まれていた既知の無痛症遺伝子の DNA シーケンスを行った。生理学的検査は、Quantitative sensory testings

(QST) による、熱刺激・冷刺激・振動覚の閾値の解析と、神経伝導速度の解析を行った。

4. 研究成果

SNP array では、2 名に共通する LOH 領域は 2 つ存在した。この領域内の遺伝子と既知の先天性無痛症原因遺伝子を照合したところ、Na チャネルのサブユニットの 1 つである、Nav1.7 をコードする SCN9A が合致した。SCN9A の DNA シーケンスの結果、exon10 において、c.1144T>G のホモ接合のミスセンス変異、p.F382V が検出された。(図 1)



(図 1) SCN9A シーケンス結果

QST による解析により、2 名とも正常対照と比較し、熱刺激による痛みの感覚閾値の上昇(感覚鈍麻)と振動覚の閾値が 95 パーセントイル以上と有意に上昇していた。熱の痛み閾値は熱傷の危険があるため 56 以上の検査は不可能であった(図 2)

| QST | 患者A | 患者B |
|-----|-----------------------|------------------------|
| 熱刺激 | 99.6% (痛み閾値 >56°C) | 97.00% (痛み閾値 >56°C) |
| 振動覚 | 96.0% | 99.99% |
| 冷刺激 | 73.0% | 99.99%(手) 83.0%(足) |

(図 2) QST の結果

また末梢神経刺激装置を用いて、C 線維刺激による体性感覚誘発電位を測定した。通常であれば、誘発脳波を測定しうる十分な刺激で刺激した場合においても、本患者では誘発脳波は測定できなかった。よって、本患者が痛みを感じていないことが他覚的にも証明された。神経伝導速度は正常だった。(図 3)

| NCV | 患者A | 患者B |
|------|------|------|
| 運動神経 | 54.6 | 59.4 |
| 感覚神経 | 52.1 | 76.7 |

(m/s)

(図 3) 神経伝導速度の結果

SCN9A の遺伝子変異により無痛症症状を呈す場合、臨床症状として、知能正常、痛覚以外の感覚正常、神経伝導速度正常が特徴的な症状である。本症例では、この特徴とほぼ合致し、本変異が無痛症の原因であると考えられた。SCN9A の遺伝子変異により、無痛症症状を呈す場合、その多くはナンセンス変異である。本症例ではミスセンス変異により症状があらわれており、この変異部が Nav1.7 の機能に重要な部位である可能性が高いことが考えられた。

次に電気生理学的解析を行うために、SCN9A の野生型発現プラスミドの入手および、本変異を組み込んだ SCN9A 変異発現プラスミドを

作成した。これら SCN9A 発現プラスミドを GFP で標識し、サブユニットとともに HEK293 細胞に強制発現させ、GFP の発現を確認した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 2 件)

1) 杉山由紀、清沢研吉、吉山勇樹、石田高志、田中聡、川真田樹人 . 先天性無痛症患者の遺伝子学的解析による SCN9A の新規ミスセンス変異の発見 . 第 62 回日本麻酔科学会学術集会 2015.5.28-30, 神戸

2) Yuki Sugiyama, Tomoki Kosho, Hiroshi Morita, Satoshi Tanaka, Mikito Kawamata. Identification of a New Missense Mutation in SCN9A in a Patient With Hereditary Congenital Indifference to Pain. American Society of Anesthesiologists 2014, New Orleans

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 由紀 (SUGIYAMA, Yuki)
信州大学・学術研究院医学系・助教
研究者番号 : 10468100

(2) 研究分担者

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

川股 知之 (KAWAMATA, Tomoyuki)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 80336388

田中 聡 (TANAKA, Satoshi)
信州大学・学術研究院医学系・准教授
研究者番号 : 60293510