

平成30年6月4日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19626

研究課題名(和文) てんかん性脳症に対する全エクソン解析を用いた早期診断システムの構築と治療法開発

研究課題名(英文) Research of early diagnosis system for epileptic encephalopathy by whole exome sequencing

研究代表者

中村 和幸 (Nakamura, Kazuyuki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20436215

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)：てんかん性脳症など小児神経疾患においては、神経学的予後が不良な疾患が多い状況である。その遺伝学的背景を明らかにしつつ、早期診断システムの構築が重要と考えた。今回、West症候群の症例においてKCNQ3遺伝子の新規突然変異を同定し、West症候群の新たな遺伝学的背景を明らかとした。また急性脳症におけるCPT2多型の確認、特異な脱力発作を反復する症例においてHECW2変異を認めた。解明された遺伝子の機能から治療に結びつけることと、さらに解析の時間を短縮することが課題である。

研究成果の概要(英文)：Pediatric neurological diseases such as epileptic encephalopathy often have poor neurological prognosis. We thought that establishing an early diagnosis system is important while clarifying its genetic background. In this study, we identified a novel mutation of the KCNQ3 gene in West syndrome. Secondly, we confirmed the CPT2 polymorphism in acute encephalopathy. Thirdly, we found HECW2 mutation in patient with attacks of flaccid paralysis. We need elucidate the functions of these genes, develop for order-made therapy and shorten the time for analysis.

研究分野：小児神経学、てんかん

キーワード：小児神経疾患 てんかん 知的障害

1. 研究開始当初の背景

てんかんは1,000人あたり5.3~8.8人に発症する頻度が高い疾患であり、特に小児期に多い¹⁾。その分類のうち、てんかん性脳症とは「難治のてんかん発作に伴い、知能や運動機能が低下し発達に影響をきたす予後不良の疾患」である²⁾。近年、てんかん性脳症の原因として様々な原因遺伝子が明らかにされてきている。

我々は、原因不明のてんかん性脳症の症例328例に対し、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、計15例(大田原症候群9例、West症候群1例、てんかん性脳症5例)にSCN2A遺伝子の新生突然変異を発見し、両者の関連性を初めて確定した³⁾。同様の手法でUDP-galactose transporterをコードするSLC35A2変異を同定し、新たな先天性グリコシル化異常症(CDG)を報告した⁴⁾。さらに大田原症候群3例、てんかん性脳症1例においてGNAO1変異を同定し、細胞内シグナル伝達異常という新たなてんかん症候群の病態背景を明らかにした⁵⁾。

これまでのてんかん治療は、主にてんかん症候群分類もしくはけいれん発作型をもとに薬剤選択が行われてきた。てんかん性脳症においては難治に経過して発達予後が不良であることが多いが、近年遺伝子異常をもとにした薬剤選択によって症状の改善をみた症例が報告されてきている。一例として、重度の不随意運動を合併したGNAO1変異症例に対してガバペンチンを投与し、不随意運動が軽減した1例がある⁶⁾。ガバペンチンは電位依存性カルシウムチャネルの抑制作用を有するため、カルシウムチャネル機能の異常が病態の一つと推測されるGNAO1変異例に対して効果が期待される。

しかし、このような例はいまだ少数である。原因となる遺伝子変異が判明しても現時点では治療に直結することが難しく、大部分のてんかん性脳症の症例では重度な神経学的後遺症をきたし、予後は未だ改善していない。また、遺伝子診断までに少なくとも数か月以上を要することが現状であり、早期に診断・治療を導入する態勢が整っているとは言えない。

2. 研究の目的

今後、てんかん性脳症の原因遺伝子の解明が進んでいくなかで、「遺伝学的病態をもとにした治療法の選択もしくはその開発が最重要課題」であると考えた。さらに発達予後改善のためには、発症早期での確定診断も不可欠と考えられる。本研究ではてんかん性脳症の症例に対して遺伝学的病態を発症早期に同定するシステムを構築し、その遺伝情報をもとにして、治療効果が高いと考えられる薬物選択を行うことによって神経学的予後を改善できる可能性を探求することを目的とする。原因遺伝子が発症早期に明らかとし、てんかんの分子病態に基づいた適切な治療

を早期から行なうことで、てんかん発作のみならず、発達を改善できる可能性がある。

3. 研究の方法

対象は主に早期発症の難治性てんかんを中心とし、その他一般的検査で原因が変名しなかった小児期神経疾患周産期異常が明らかな症例は除外する。その後研究について同意を得られた対象患者およびその両親から検体の採取を行い、DNAを抽出する。

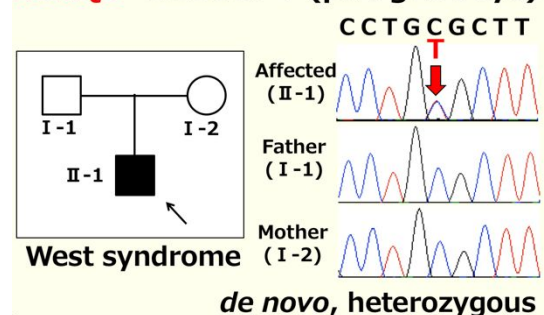
まず患者検体単独、もしくは両親検体を含めた「トリオ症例」に対し、次世代シーケンサー(Ion Proton)を用いた全エクソン解析を行い遺伝子変異のスクリーニングを行う。変異が同定された症例に対して、Sanger法による変異検出エラーの除外を行った上で、両親検体の解析によるde novo変異の確認を行い、その病的意義を検討する。既知遺伝子に変異を認めない場合、他施設との共同研究によって新規原因遺伝子の検索も併行して行う。

4. 研究成果

1) West症候群におけるKCNQ3変異

2歳3か月男児に対する全エクソン解析(てんかん性脳症の共同研究)により、KCNQ3新生突然変異[c.688C>T: p.(Arg230Cys)]を同定した(図1)。本症例は4か月時に発達遅滞を指摘され、7か月時にスパズム発作を発症してWest症候群と診断された。ACTH療法で発作は消失し、脳波は改善したが、2歳3か月時点で発達指数25と運動発達遅滞と知的障害を認めている。KCNQ3遺伝子はbenign familial neonatal seizures (BFNS)やbenign familial infantile seizures (BFIS)といった自然寛解する疾患でその変異が同定されていたが、近年では知的障害を伴う局在関連性てんかんやLennox-Gastaut症候群との関与が指摘されている。これまでWest

KCNQ3 c.688C>T (p.Arg230Cys)



症候群では報告がなく、今回の研究によりKCNQ3遺伝子異常がWest症候群の発症に関与していることを初めて明らかとなった。

【図1】

2) 急性脳症におけるCPT2多型

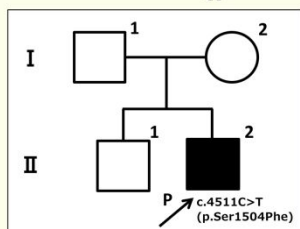
発熱と意識障害から急性脳症と考えられた1歳男児例において、頭部MRIで淡蒼球と黒質に局限した異常信号を認めた。ミトコン

ドリア異常症などの代謝異常症について、早期診断を目的として全エクソン解析を行った。結果、ミトコンドリア関連の各遺伝子には異常を認めなかったが、CPT2 遺伝子多型として F352C がヘテロ接合体、V368I がホモ接合体で確認された。この多型により CPT2 酵素活性が低下し、発熱時のエネルギー需要に対応しにくい素因を有すると考えられた 7)。急性脳症を反復する症例もあるため、カルニチン補充や発熱時は積極的に解熱を図るなどの対応について、情報提供を行った。

3) 特異な周期性脱力発作を来した症例における *HECW2* 変異

6 歳男児に対する全エクソン解析(てんかん性脳症の共同研究)により、*HECW2* 新生突然変異 [c.4511C>T: p.(Ser1504Phe)] を同定した(図 1)。本症例は乳児期より全般性発達遅滞を認め、6 か月から周期的に全身の脱力を発症し、てんかん性異常波は認めないという特異な症例であった。近年、*HECW2* 遺伝子変異は知的障害や筋緊張低下、てんかんを認める症例において報告されている。本症例でみられた周期性の脱力発作の報告はなく、今後 *HECW2* の機能解明が課題と考えられた。

HECW2 c.4511C>T (p.Ser1504Phe)



【図 2】

【参考文献】

- 1) 中川栄二：けいれんの鑑別診断。有馬正高，他（編），小児神経学 診断と治療社，306-313，2008
- 2) Berg AT et al.: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51:676-85
- 3) Nakamura K et al: Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013;81:992-998.
- 4) Kodera H, et al. De novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat* 2013;34:1708-1714.
- 5) Nakamura K et al: De Novo mutations in *GNAO1*, encoding a G o subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet*

2013;93(3):496-505.

6) 高木真理子ら：ガバペンチンが有効であった *GNAO1* 変異をもつヒョレアアテトーシスの 1 例。脳と発達 2014;46:S327

7) 水野ら：Carnitine palmitoyltransferase (CPT)の熱不安定性遺伝子多型を持った急性脳症の 1 例。小児科臨床 2012;65:113-8.

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)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1) 渡邊あさみ，徳田桐子，楠目和代，福田光成，中村和幸，加藤光広，石井榮一：新たな *DCX* 遺伝子ミスセンス変異を認めた滑脳症の男児例。愛媛医学。2017;36(3)167-170.

2) Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saitsu H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV, Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y : Pathogenic variants in *PIGG* cause intellectual disability with seizures and hypotonia. *Am J Hum Genet* 2016;98(4):615-626

〔学会発表〕(計 3 件)

1) Nakamura K, Kato M, Abiko T, Kanbayashi T, Nakashima M, Saitsu H,, Matsumoto N: *HECW2* mutation causes peculiar periodic attacks of paralysis, intellectual disability and hypotonia: 第 60 回日本小児神経学会学術集会，千葉；2018 年 5 月

2) Nakamura K, Yokoyama J, Abe A, Saitsu H, Nakashima M, Matsumoto N, Kato M : First case report on West syndrome with a de novo *KCNQ3* mutation: 32nd International Epilepsy Congress, Barcelona, Spain; September 2017

3) Nakamura K, Kato M, Makrythanasis P, Zaki M, Saitsu H, Santoni F, Miyatake S, Nakashima M, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y : Novel GPI deficiency caused by *PIGG* mutations shows intellectual disability, seizures and hypotonia: 15th Asian and Oceania Congress of Child Neurology , Fukuoka, Japan; May 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

取得状況（計0件）

〔その他〕なし

6．研究組織

(1)研究代表者

中村 和幸 (NAKAMURA, Kazuyuki)
山形大学医学部小児科・助教
研究者番号：20436215

(2)研究分担者：なし

(3)連携研究者：なし

(4)研究協力者

加藤光広 (KATO Mitsuhiro)
昭和大学医学部小児科

松本直通 (MATSUMOTO Naomichi)
横浜市立大学医学研究科遺伝学