

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K19645

研究課題名（和文）日本における驚愕病の臨床像の解明および病態解析

研究課題名（英文）Manifestation of clinical features and pathological analysis of Hyperekplexia in Japan

研究代表者

美根 潤 (Mine, Jun)

島根大学・医学部・特別協力研究員

研究者番号：80565234

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：1)日本人の驚愕症の臨床像、自然歴の調査、診療ガイドラインの作成：全国の医療機関1394施設へ調査を行い、うち症例の経験を有する施設は25施設であった。17症例は小児科領域であり、4症例は成人領域であった。2)の解析結果と併せ臨床像を解析し、診断基準案を作成、関連学会でパブリックコメントを募った。この結果を踏まえ、診療ガイドラインを作成した。2)グリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子異常の解析：驚愕病が疑われる症例について平成28年度から令和元年度の間に、39症例の解析を行い、うち13例（GLRA1遺伝子変異）、1例（SLC6A5遺伝子変異）で遺伝子異常を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

驚愕病は、新生児期より、予期できない刺激に対して全身を過剰に硬直させるなどの過度の驚愕反応と筋硬直を呈し、適切な治療や指導を行わなければ、過度な驚愕反応による呼吸停止や転倒により事故につながることもある疾患である。本邦において認知度は低く、てんかんや筋疾患、不安障害などと誤って診断され、不必要な治療が行われていることも少なくない。本研究では、日本人の驚愕症の臨床像、自然歴の調査、グリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子異常の解析を行い、その結果を基に診療ガイドラインを作成した。この結果、驚愕病患者さんが適切な診療を受けることが可能となり、医療の均てん化に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：1) Clinical features of Japanese Hyperekplexia, investigation of natural history, and created of clinical guidelines: A survey was conducted at 1394 facilities of medical institutions nationwide, of which 25 facilities had experience of cases. 17 cases were in the pediatric area and 4 cases were in the adult area. The clinical manifestation was analyzed with the result of 2). Next, we created diagnostic criteria draft. After completing its public comment procedures, we confirmed guideline. 2) Analysis of gene abnormalities related to glycinergic neurotransmission system: 39 cases were analyzed between 2016 and 2019, 13 cases had GLRA1 mutation and one case had SLC6A5 mutation.

研究分野：小児神経

キーワード：驚愕病

1. 研究開始当初の背景

1) 本研究に関する動向及び位置づけ

驚愕病は、新生児期より、予期できない刺激に対して全身を過剰に硬直させるなどの過度の驚愕反応と筋硬直を呈する疾患である。合併症として、膈ヘルニア、股関節脱臼、運動発達遅滞などが認められる。筋強直は成長とともに改善するが、驚愕反応は残存することから、適切な治療や指導を行わなければ、過度な驚愕反応による呼吸停止や転倒により事故につながることもある。血液・尿検査、CT や MRI などの画像検査、脳波や筋電図などの生理学的検査などで異常を示さないため、さらに我が国でのこの疾患の認知度は低いために、てんかんや筋疾患、不安障害などと誤って診断され、不必要な治療が行われていることも少なくない。

この疾患の原因は、グリシン作動性神経伝達系の異常による抑制性神経伝達障害と考えられている。これまで、この神経伝達に関与する複数の遺伝子異常が同定されているが、遺伝子異常によって確定診断をされた症例はきわめて少ない。ノックアウトマウスなどによりその病態も少しずつ明らかになっているが、不明な点が多かった。

2) これまでの研究成果

我々は、日本で初めて **GLRA1** 遺伝子異常を有する驚愕病を報告した (**Kimura M, et al, Brain Dev, 2006**)。また、驚愕病姉弟例から、麻痺性イレウスを合併しやすいことを報告した (吾郷真子, 他. 日本小児科学会雑誌 **2010**)。さらに、まれな原因遺伝子である **GLRB** 遺伝子変異を有する驚愕病の 1 例を同定した。 (**Mine J, et al. Brain Dev, 2012**)。現在、日本およびアジアの国々から、本疾患が疑われる症例に関してグリシン作動性神経伝達系に関与する遺伝子解析を行って、これまで **17** 例の臨床像をまとめた (**Mine J, et al. Dev Med Child Neurol, 2015**)。

2. 研究の目的

1) 日本人の驚愕症の臨床像、自然歴の調査、診療ガイドラインの作成

日本において驚愕病患者は、**18** 例しか同定されていない。しかし、常染色体優性遺伝形式をとる症例が多いことから、症例数がさらに存在することが予想される。これまで診断された症例数が少ない原因として、他の疾患と誤断されていること、年齢とともに症状が消失し神経予後も良いこと、この疾患の認知度が低いことが挙げられる。そこで、全国の医療機関に、アンケート調査を行い、症例の経験のあった施設を対象に臨床像を調査する。具体的には、家族歴、診断年齢、周産期歴、症状、検査・画像所見、診断に至るまで行われた治療、臨床経過、予後、現在の問題点などである。これらの詳細な臨床像をまとめて、診療ガイドラインを作成する。

2) グリシン作動性神経伝達系に関与する遺伝子解析

これまで、驚愕病の責任遺伝子として、グリシン作動性神経伝達系に関与する遺伝子が **3** つ (**GLRA1, SLC6A5, GLRB**) 同定されている (**Harvey RJ, et al: Trends in Genetics, 2008**)。驚愕病の患者およびご家族の同意を得た後、これらの **3** つの遺伝子解析を行い、確定診断を行う。また、異常を認めなかった症例に関して、グリシン作動性神経伝達系に関与する他の遺伝子を解析する。さらに、遺伝子型と表現型の関連を検討する。

3) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・病態解析・薬剤スクリーニング

驚愕病の病態を解明するために、患者さんの線維芽細胞あるいはリンパ球から **iPS** 細胞を樹立した後、神経細胞に分化する。正常健康人由来 **iPS** 細胞から分化させた神経細胞と比較して、グリシン受容体形成能、グリシン受容体の局在、グリシン受容体のリガンドやグリシン受容体拮抗薬を用いた細胞膜の分極などを検討する。また、細胞膜の分極を回復させる薬剤を同定するために、抗てんかん薬を中心とした薬剤スクリーニングを行う

今回の研究によって、驚愕病の臨床像および遺伝子解析を検討し、世界初の診療ガイドラインを作成することによって、驚愕病の患者さんが適切な診療を受けることが可能となり、医療の均てん化に貢献し、また、この疾患の病態を解明でき、さらに、効果的な薬剤を同定することによって患者さんの症状を改善あるいは消失させることができるため、患者さんの **QOL/ADL** の向上に寄与できると考えた。

3. 研究の方法

1) 日本人の驚愕症の臨床像、自然歴の調査、診療ガイドラインの作成

まず、我々が日本での驚愕病の臨床像の特徴 (Mine J, et al. Dev Med Child Neurol, in press) を記載したパンフレットを作成する。その後、全国の小児科、神経内科および精神科の医療機関に、パンフレットとともに症例の有無の疫学調査を行う。症例の経験のあった施設を対象に、詳細な臨床像をアンケート調査する。調査内容は、家族歴、診断年齢、周産期歴、症状 (筋硬直、驚愕反応、腹部ヘルニア、股関節脱臼、けいれん、無呼吸、チアノーゼ発作、腸閉塞、発達障害、学習障害) その症状の発症年齢および消失時期、驚愕反応による外傷の既往およびその回数と転帰、検査 (尿、血液) 所見、他覚所見 (身長、体重、肢位、腹部膨満、筋緊張、モロー反射、Nose-tapping test) 画像所見 (レントゲン、CT、MRI) 生理学的所見 (脳波、筋電図) 診断に至るまでの鑑別した疾患、治療およびその治療効果、リハビリテーション、遺伝子カウンセリングの有無、予後、現在の問題点である。これらの詳細な臨床像をまとめるとともに、これまでの諸外国のデータ (Thomas RH, et al. Brain, 2013) と比較検討を行う。最終的に、驚愕病の診療ガイドラインを作成して、各医療機関に配布する。また、この疾患は、他の疾患と間違えて診断されていたり、単なる体質として見なされている可能性があるため、各関連学会で驚愕病の啓発に努める。

2) グリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子異常の解析

次に、驚愕病と診断されたあるいは疑わしい症例について、本人あるいは家族の同意を得た後、これまで同定されている3つの遺伝子 (GLRA1, SLC6A5, GLRB) について、PCR法、SSCP法および直接塩基配列決定法などを用いて遺伝子変異を検索する (Mine J, et al. Dev Med Child Neurol, in press)。遺伝子異常が見つからなかった場合、Southern blot法およびRealtime-PCR法を用いて、遺伝子量を測定して、遺伝子量の減少の有無を検討する。これまでの報告では、これらの3つの遺伝子異常は驚愕病の80%に認められるが、残りの20%は同定されていない。遺伝子変異も遺伝子量の異常も認めない症例に関して、グリシン作動性神経伝達系に関与する他の遺伝子 (SLC6A9, SLC32A, SLC6A17 など) について上記と同じ方法で検索をする。それでも遺伝子異常を認めなかった例においては、網羅的に遺伝子を検索するために次世代シーケンスを用いる。遺伝子異常を認めた症例については、その臨床像と遺伝子異常の関係を検討し、さらに、遺伝子異常の有無での臨床像の比較検討も行う。

3) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・病態解析・薬剤スクリーニング

驚愕病の患者で同定された遺伝子異常が驚愕病発症への関与を明らかにすることを目的として、患者さんの線維芽細胞あるいはリンパ球に、L-Myc, Klf4, Oct4, Sox2, Lin28 の5つのベクターおよびp53shRNAを導入して疾患特異的 iPS 細胞を樹立する。その後、神経増殖因子や分化誘導因子などを加えて、神経細胞に分化させる。これまで正常健康人から作成済みの iPS 細胞から同様に神経細胞に分化させる。これらの神経細胞を用いて、グリシン受容体形成能 (免疫染色、Western blot 法) グリシン受容体の安定性 (pulse chase radiolabelling 法) グリシン受容体の細胞内局在 (免疫染色) グリシンの取り込み能 ([³H]Glycine uptake アッセイ) 神経細胞膜の分極能、クロール流入能および電流振幅 (Whole-cell current recording, Single channel recording, patch clamp) を検討する。また、グリシン受容体のリガンドであるグリシン、タウリン、□アラニン、グリシン受容体に結合する5HT₃受容体拮抗薬を用いて、神経細胞膜の分極能、クロール流入能および電流振幅を検討する。さらに、抗てんかん薬を中心とした薬物スクリーニングを行い、疾患特異的神経細胞の機能を回復される薬剤を同定する。

4. 研究成果

1) 日本人の驚愕症の臨床像、自然歴の調査、診療ガイドラインの作成

全国の医療機関 **1394** 施設一次調査を行った。回収率は **59%** であり、うち症例の経験を有する施設は **25** 施設 (**3.0%**) であった。経験を有する施設へ二次調査を送付し、臨床像 (家族歴、診断年齢、周産期歴、症状、その症状の発症年齢および消失時期、他覚所見、各種検査および画像所見、診断に至るまでの鑑別した疾患、治療およびその治療効果、リハビ

リテーション、遺伝子カウンセリングの有無、予後、現在の問題点など)についてアンケートをおこなった。**18施設(72%)**より回答があった。うち**17症例**は小児科領域であり、**4症例**は成人領域であった。小児領域の約半数は遺伝子検査で確定されていたが、成人領域では遺伝子検査で確定された例はなかった。

また**2)**の遺伝子異常の解析結果と併せ臨床像を解析し、診断基準案を作成した。その後、平成**30**年度から令和元年度にかけ日本小児科学会、日本小児神経学会、日本神経学会、日本精神神経学会、日本成育新生児学会でパブリックコメントを募った。この結果を踏まえ、診療ガイドラインを作成し各学会において世界初となる診断基準の承認を得た。

2) グリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子異常の解析

驚愕病が疑われる症例について、全国から検体の提供を受け、本人あるいは家族の同意を得た後、グリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子(**GLRA1,SLC6A5,GLRB**)の解析を**PCR**法、**SSCP**法および直接塩基配列決定法などを用いて検索した。遺伝子変異も遺伝子量の異常も認めない症例に関しては、グリシン作動性神経伝達系に關与する他の遺伝子(**SLC32A, SLC6A17**など)について上記と同じ方法で検索を行った。平成**28**年度から令和元年度の間に、**39**症例の解析を行い、うち**13例**(**GLRA1**遺伝子変異)、**1例**(**SLC6A5**遺伝子変異)でグリシン作動性神経伝達系に関連する遺伝子異常を認めた。

3) 疾患特異的 iPS 細胞の樹立・病態解析・薬剤スクリーニング

疾患特異的 **iPS** 細胞の樹立については、我々の施設では正常健康人の線維芽細胞から **iPS** 細胞を樹立し、神経細胞への分化が可能となっている。現在は正常健康人の血液検体のリンパ球から **iPS** 樹立、神経細胞への分化を試みている。神経細胞への分化が確立すれば、患者検体から疾患特異的 **iPS** 細胞の樹立を試みる。

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 0件）

1. 発表者名 美根潤
2. 発表標題 臨床像・遺伝学的検査に基づいた驚愕病の診断基準の検討
3. 学会等名 第121回日本小児科学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 美根潤
2. 発表標題 驚愕病における全国調査（第一報）：遺伝子検査の重要性
3. 学会等名 第51回日本てんかん学会
4. 発表年 2017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