

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K10079

研究課題名(和文)エクソーム解析による熱性けいれん疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Whole-exome sequencing of a large Japanese family with febrile seizures

研究代表者

中山 純子(Nakayama, Junko)

茨城県立医療大学・付属病院・准教授

研究者番号：30433155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：熱性けいれん疾患感受性遺伝子を同定することを目的として、日本人熱性けいれん大家系を対象としてエクソーム解析を行った。我々が以前報告したFEB4遺伝子座(5番染色体q14-q15領域)には疾患と関連していると考えられる変異は同定されなかったが、別の熱性けいれん遺伝子座であるFEB3遺伝子座(2番染色体q23-q24領域)に候補バリエーションが同定された。この家系以外の69の日本人熱性けいれん家系にはこの変異は同定されなかったが、本バリエーションが同定されたSCN9A遺伝子は、海外のグループからけいれん性疾患との関連の報告があり、本家系の熱性けいれんの発症にかかわっている可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

熱性けいれんは良性の疾患と考えられているが、その一部はのちにてんかんを発症したり重積発作をひきおこすことがある。そのため、熱性けいれんの疾患感受性遺伝子を同定して病態を解明することが、てんかんなどのより重篤な疾患の病態解明につながる可能性が期待される。今回同定されたチャンネル遺伝子のバリエーションは1家系のみには同定されていないが、同遺伝子の別のバリエーションが他の日本人熱性けいれん家系の疾患発症にかかわっている可能性もあるため、今後さらに解析が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To identify febrile seizure susceptible genes, we performed whole exome sequencing of seven FS patients who belong to a large Japanese family with FS (K1#1). We extensively searched for candidate variants located in the FEB4 region, but no strong candidates were detected using our filtering method. We identified a heterozygous variant (c.3335A>G; p.Ser1112Asn) in the sodium voltage-gated channel alpha subunit 9 gene (SCN9A) located on chromosome 2. Genotyping of this variant was performed for 270 subjects from Japanese families with FS. p.Ser1112Asn was not detected in any of the subjects analyzed except for the members from K1#1. Mutations in SCN9A have been reported to be associated with several disorders including FS and generalized epilepsy with febrile seizures plus. The functional effect of the variant remains to be elucidated. Experiments using model organisms may be required to examine the functional effect of the variant.

研究分野：医歯薬学

キーワード：熱性けいれん 遺伝子 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

けいれんは小児期にみられる神経疾患の中で最も頻度が高く、特に熱性けいれんは日本人では罹患率が約8%と欧米と比較しても頻度が高い。家系解析や双生児研究などから、熱性けいれんの発症には遺伝素因が関与していることが古くから知られていた。熱性けいれんは、一般集団と比較して後にてんかンを発症する危険率が高く、長時間続くけいれん(けいれん重積)を引き起こすこともある。また熱性けいれんとてんかんのオーバーラップと考えられる Generalized epilepsy with febrile plus (GEFS+)において、同一の遺伝子変異で両疾患が引き起こされることが報告されている。以上から熱性けいれんとてんかんの遺伝要因が一部共通である可能性があり、熱性けいれんの発症機序の解明がてんかんの発症機序の解明に結び付く可能性が示唆されている。

我々はこれまでに、日本人熱性けいれん家系を解析して2つの新しい熱性けいれん遺伝子座 (*FEB4*, *FEB6*) を報告した (Nakayama et al. 2000, 2004)。海外でも9の熱性けいれん遺伝子座 (*FEB1*, *FEB2*, *FEB3*, *FEB5*, *FEB6*, *FEB7*, *FEB8*, *FEB9*, *FEB10*, *FEB11*) が報告されているが、*FEB2* (EIG17) *FEB3* (SCN1A) と *FEB8* (GABRG2) *FEB11* (CPA6) 以外の遺伝子座では責任遺伝子は同定されていない (Wallace et al., 1996; Johnson et al., 1998; Peiffer et al., 1999; Nabbout et al., 2002; Hedera et al., 2006; Audenaert et al., 2006; Nabbout et al., 2007; Dai et al., 2008; Salzmann et al., 2012)。また、EIG17, SCN1A, GABRG2, CPA6 についても同定されたのは少数の家系のみで、多くの熱性けいれん家系に共通した責任遺伝子はいまだに同定されていない。てんかんの責任遺伝子であるイオンチャンネルなどを候補遺伝子とした関連解析の報告もあるが、グループ間で結果に差があり一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

精力的なポジショナルクローニングが行われていたにもかかわらず、多くの熱性けいれん遺伝子座で責任遺伝子は同定されていない。従来の方法では、一つ一つの遺伝子をシーケンシングしていくため多大な労力が必要で、遺伝子解析に時間がかかっていた。近年、次世代シーケンサーを用いて、様々な疾患の全エクソン領域の解析が行われるようになり、全染色体上の遺伝子の塩基配列の解析が可能となった。

そのため本研究では、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析を行い、日本人熱性けいれん患者に共通な疾患遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

熱性けいれん罹患患者を含む70の日本人家系(172名の罹患患者を含む270名)を対象とした。そのうちの1家系は5名の熱性けいれん罹患患者と4名の熱性けいれん+無熱性けいれん罹患患者を含む3世代にわたる大家系(KI#1家系)である。熱性けいれんの診断はNIHの診断基準である「Consensus Development Panel (1980)」に基づき、病歴カルテおよび家族からの聞き取りにより小児科医が行った。本研究は筑波大学倫理員会で承認されたプロトコルに基づき両親と本人の同意(インフォームドコンセント、学童期以下の子どもについては両親の承諾)を得て行った。

(2) 方法

エクソーム解析

KI#1家系に含まれる7名の熱性けいれん患者の末梢血から抽出したDNAを断片化し、NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set (New England Biolabs) および SeqCap EZ Developer Library kit (NimbleGen; Roche)を用いてライブラリー調整を行った。次にNextSeq 500 シーケンサー (Illumina) を使用してシーケンシングを行った。アラインメントにはBurrows-Wheeler Aligner22 version 0.7.17 (<https://sourceforge.net/projects/bio-bwa/>) を使用した。参照配列データは human_g1k_v37.fasta (<ftp://ftp.broadinstitute.org/bundle/>) を使用し、変異リストファイルは dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP>) を使用した。パイプラインには Genome Analysis Toolkit24 (GATK) version 4.0 (<https://software.broadinstitute.org/gatk/best-practices/>) と Picard software (<http://broadinstitute.github.io/picard/>) を用いた。ANNOVAR23 software と SnpEff27 version 4.2 を使用してアノテーション付加を行った。

ジェノタイピング

検出されたバリエーションがK1#1家系以外の熱性けいれん家系にも存在しているかどうかを検討するために、TaqMan解析でジェノタイピングを行った。バリエーションのTaqManプローブとTaqMan Master Mix (Thermo Fisher Scientific Inc.) を使用してプロトコールに従って対象者のDNAのPCR増幅を行った。ABI 7900 (Thermo Fisher Scientific)を用いて蛍光強度の測定を行い、TaqMan Genotyper Software (Thermo Fisher Scientific)を用いてジェノタイプを決定した。

4. 研究成果

全エクソーム解析の結果、88683 のバリエーションが検出された。まず我々が以前報告した熱性けいれん遺伝子座 (FEB4) 領域について検討したところ、33 個のミスセンスバリエーションが検出されたが、いずれの変異も本家系と連鎖しておらず、疾患と関連していると考えられるバリエーションは検出できなかった。そのため、解析範囲を全染色体領域として、熱性けいれんと関連する遺伝子変異を抽出するためにフィルタリングを行った。その結果 52 個のバリエーションが検出され、そのうち rs224534 と rs141040985 の 2 つのバリエーションが、K1#1 の 7 人の被験者のうち 5 人以上で共有されていた。そのうち rs3224534 はホモ接合性であることおよびデータベース上頻度が 0.39 と頻度の高いバリエーションであったことから、疾患と関係のない多型と考えられた。

rs141040985 は、海外で報告されている熱性けいれん遺伝子座 (FEB3) に存在する SCN9A (Sodium voltage-gated channel, alpha subunit 9) 遺伝子の変異である (Figure 1)。SCN9A は 27 個のエクソンからなる遺伝子で、電位依存性ナトリウム チャネル Nav1.7 をコードしている。今回同定された c.3335G>A (p.Ser1123Asn) 変異は、進化の過程で種をこえて保存されているアミノ酸の変異であり、機能解析ソフトからも機能変化を生じる可能性が考えられた (Table 1)。SCN9A 遺伝子 の変異は、熱性けいれんや一部のてんかんを含むいくつかの疾患に関連していることが報告されており (Singh et al., 2009)、今回同定された変異が熱性けいれんの発症とかかわっている可能性が考えられた。

今回同定された変異は K#1 家系の罹患者 8 人中 7 人で検出されたが、1 名の患者 (III-3) はこの変異をもっていなかった (Figure 2)。熱性けいれんは多因子疾患であると考えられているため、III-3 患者 は表現型模写である可能性が考えられた。また熱性けいれん非罹患者である 1 名 (III-4) が本変異をもっていたが、本患者は診察時にまだ熱性けいれんを発症しうる年齢であったためその後発症した可能性もある。また熱性けいれんの遺伝様式は大家系では浸透率の低い優性遺伝を呈することがあるため原因遺伝子をもっているにもかかわらず発症しない可能性もありうる。

今回検出された変異について、他の熱性けいれん家系のジェノタイピングを行ったが、本変異をもつ患者はいなかった。そのため、本変異は熱性けいれんの発症にかかわる可能性はあるが、日本人に広く共通する遺伝子変異ではないと考えられた。

今後は、本変異の生体での機能的影響を解明するために、細胞モデルや動物モデルなどを対象としたさらなる研究が必要と考えられた。

Table 1 The functional prediction of the identified variant in SCN9A

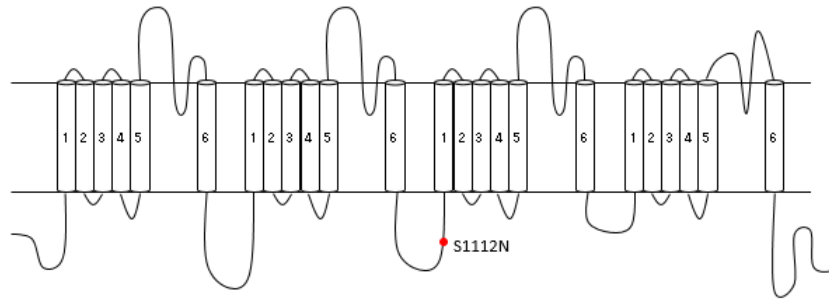
SNP ID	NM number	Consequence	Base	Codon	frequency	
			Change	Change	Japan(ToMMo)	All (GenomeAD_exome)
rs141040985	NM_002977	missense	G3335A	S1112N	0.0056	0.00008

SNP ID	Functional Prediction Algorithm			
	SIFT(a)	PolyP_100(b)	MutationAssessor(c)	Domain information
rs141040985	0.05	7.568	2.67 (Medium)	Sodium ion transport associated

(a) SIFT, the prediction of an alteration being deleterious (≤ 0.05) or tolerated. (b) PolyP_100, the prediction using logarithm of P-value of conservation across 100 species based on a model of neutral evolution. Positive score is predicted to measure conservation and negative score is predicted to measure acceleration. (c) MutationAssessor, the functional impact assessed based on evolutionary conservation of the altered amino acids in protein homologs. Predicted functional is represented by high or medium, predicted non-functional is represented by low or neutral.

Abbreviations: ToMMo, Tohoku Medical Megabank Organization; GenomeAD, The Genome Aggregation Database

A



B

	↓ S1112N
human	SCESSSSRNLR
rhesus	SCESSSQQLR
mouse	SCESSSRNRR
rat	SCESSSRNRK
dog	SCESSSRNLR
chicken	SGESSSANLK
x-tropicalis	SGESSSVKIK

Figure 1 (A) The probable location of *SCN9A* gene variant in voltage gated sodium channel. (B) Evolutionary conservation of *SCN9A* gene variant. Arrow indicates the variant.

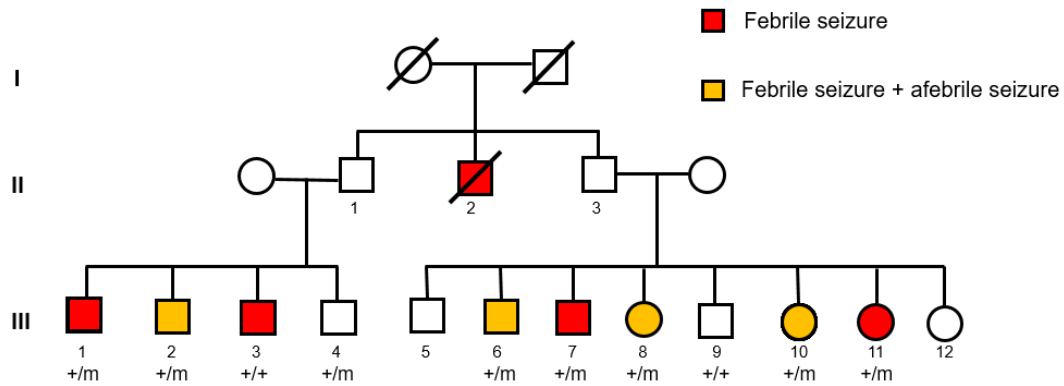


Figure 2 A Japanese FS pedigree (KI#1) with c.3335A>G mutation in the *SCN9A* gene. Genotypes are indicated for each individual. "+" means wild type; "m" means mutant.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Junko Nakayama
2. 発表標題 Whole-exome sequencing of a large Japanese family with febrile seizures
3. 学会等名 日本人類遺伝学会第65回大会
4. 発表年 2020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
研究分担者	野口 恵美子 (Noguchi Emiko) (40344882)	筑波大学・医学医療系・教授 (12102)	
研究分担者	岩崎 信明 (Iwasaki Nobuaki) (70251006)	茨城県立医療大学・保健医療学部・教授 (22101)	

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
---------	---------