

平成 21 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2006～2008

課題番号：18209035

研究課題名（和文）チャンネルを標的とした小児てんかんの遺伝子解析とモデル動物作出

研究課題名（英文）Genetic analyses and generation of genetic engineered animals for childhood epilepsy focusing on ion channel abnormalities.

研究代表者

廣瀬 伸一（HIROSE SHINICHI）

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：60248515

研究成果の概要：

設立・管理するてんかん遺伝子バンクを利用し、脳に発現するイオンチャンネルに的を絞り、遺伝子変異をスクリーニングし、あわせて発見された変異チャンネルの電気生理学的異常を *ex vivo* で検証する。

さらにヒトで発見されたチャンネル変異を持つてんかんモデル動物を作出し、チャンネルの異常がてんかんの発症へとつながる過程を明らかにし、てんかんの分子病態を *in vivo* で明らかにする。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	23,000,000	6,900,000	29,900,000
2007 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
年度			
年度			
総計	33,200,000	9,960,000	43,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：小児科学

キーワード：小児神経学

## 1. 研究開始当初の背景

大きな進歩がなかったてんかんの遺伝子研究であったが、チャンネルに的を絞ることにより、ここ 6 年の間に、てんかん・熱性けいれんの患者・家族の遺伝子から 20 種類以上の新しい遺伝子異常を同定した。“チャンネル病仮説”が、てんかんの遺伝子異常探索の作業仮説として有用であると実証した。

さらに、ヒトてんかんで発見された、アセチルコリン受容体の異常を持つモデル動物を作出した。作出動物はヒトのてんかん発作と酷似した発作を呈し、その病態解明をおこなった。これにより、世界

初のヒトてんかんの分子生物学的なモデル作出成功例となった。

## 2. 研究の目的

- （1）てんかん遺伝子バンクの資料をもとに、てんかんの責任遺伝子を同定する
- （2）見出された遺伝子変異を有するモデル動物を作出し、その分子病態を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- （1）てんかんの原因となる新規遺伝子変異を同定する

- ①変異のスクリーニング
- ②同定された遺伝子変異による病態の生理学的検証

(2) ヒトてんかんで発見された遺伝子変異を有する遺伝子改変動物の作出

- ①遺伝子組換えラット作出
- ②可変型ノックインマウス作出
- ③作出改変動物の症候学的、電気生理学的異常の検証

#### 4. 研究成果

##### (1) てんかんの原因となる新規遺伝子変異の同定

全国より「遺伝子診断依頼」として寄せられるサンプルより乳児重症ミオクロニーてんかんで100種類に及ぶの *SCN1A* の新規遺伝子異常を発見した。( *Epilepsia*, 2008, *Brain & Dev*, 2008 他)

##### (2) 遺伝子改変動物の作出

ヒトてんかんと同じ遺伝子異常を持つ遺伝子組換えラットの作出に成功した。( *J Neurosci* 2008) *KCNQ2* 遺伝子に変異を持つ可変型ノックインマウス三系統の作出に成功した。(論文準備中)

##### (3) その他てんかん病態研究

乳児重症ミオクロニーてんかんと熱性けいれんプラスの発症に *GABA<sub>A</sub>* 受容体の  $\gamma 2$  サブユニットが関係していることを見出した。(Fukuma et al. 論文投稿中)

#### 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 19 件)

- 1) Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Itoh M, Mitsudome A, Hirose S. Developmental changes in *KCNQ2* and *KCNQ3* expression in human brain: possible contribution to the age-dependent etiology of benign familial neonatal convulsions. *Brain Dev* (査読有) 2008;30(5):362-9.
- 2) Kurahashi K, Wang J, Ishii A, Fukuma G, Hamachi A, Yonetani M, Ogawa A, Ohfu M, Inoue T, Yasumoto S, Hirose S. Progress in genetics of severe myoclonic epilepsy in fancy. In: Fukuyama Y, Takahashi T, editors. *Progress in Epileptic Disorders* (査読有) *Biology of Seizure Susceptibility in Developing Brain*. Paris: Editions John Libbey Eurotext Montrouge; 2008. p. 1-3.
- 3) Nomura Y, Karube K, Suzuki R, Guo Ying, Takeshita M, Hirose S, Nakamura S, Yoshida T, Kikuchi M, Ohshima K. High-Grade mature B-cell lymphoma with Burkitt-like morphology: Results of a clinicopathological study of 72 Japanese patients. *Cancer Science* (査読有) 2008 ; 99 (2) : 246-52
- 4) Uehara A, Nakamura Y, Shioya T, Hirose S, Yasukochi M, Uehara K. Altered *KCNQ3* potassium channel function caused by the W309R pore-helix mutation found in human epilepsy. *J Membr Biol* (査読有) 2008;222(2):55-63.
- 5) Wang JW, Kurahashi H, Ishii A, Kojima T, Ohfu M, Inoue T, Ogawa A, Yasumoto S, Oguni H, Kure S, Fujii T, Ito M, Okuno T, Shirasaka Y, Natsume J, Hasegawa A, Konagaya A, Kaneko S, Hirose S. Microchromosomal deletions involving *SCN1A* and adjacent genes in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* (査読有) 2008;49(9):1528-34.
- 6) Zhu G, Okada M, Yoshida S, Ueno S, Mori F, Takahara T, Saito R, Miura Y, Kishi A, Tomiyama M, Sato A, Kojima T, Fukuma G, Wakabayashi K, Hase K, Ohno H, Kijima H, Takano Y, Mitsudome A, Kaneko S, Hirose S. Rats Harboring *S284L ChRNA4* Mutation Show Attenuation of Synaptic and Extrasynaptic GABAergic Transmission and Exhibit the Nocturnal Frontal Lobe Epilepsy Phenotype. *J Neurosci* (査読有) 2008;28(47): 12465-76.
- 7) Huang MC, Okada M, Nakatsu F, Oguni H, Ito M, Morita K, Nagafuji H, Hirose S, Sakaki Y, Kaneko S, Ohno H, Kojima T. Mutation screening of *AP3M2* in Japanese epilepsy patients. *Brain Dev* (査読有) 2007;29(8):462-7.
- 8) Ogawa A, Hamamoto K, Hirose S, Fujikawa M, Mitsudome A. [Sympathetic skin response in patients with severe motor and intellectual disabilities] *No To Hattatsu* (査読有) 2007;39(5):347-50.
- 9) Ogawa A, Tomonoh Y, Hayashi H, Ohta E, R. K, Mori T, Utsunomiya H, Hirose S. A Type I split cord malformation is a significant pathomechanism of spina bifida aperta in neonates. *Med. Bull. Fukuoka Univ.* (査読有) 2007;34(4):261-6.
- 10) Ogawa A., Shirotani G, Hashimoto J, Hayashi H, Ninomiya S, Ohta, E., , Kinoshita R. M, T., Hirose S. Midazolam for the treatment of neonatal electroencephalography- confirmed seizures *Med. Bull. Fukuoka Univ.* (査読有) 2007;34(4):267-71.
- 11) Okumura A, Kurahashi H, Hirose S, Okawa N, Watanabe K. Focal epilepsy resulting from a de novo *SCN1A* mutation. *Neuropediatrics* (査読有) 2007;38(5):253-6.
- 12) Harada E, Nishiyori A, Tokunaga Y,

- Watanabe Y, Kuriya N, Kumashiro R, Kuno T, Kuromaru R, Hirose S, Ichikawa K, Yoshino M. Late-onset ornithine transcarbamylase deficiency in male patients: prognostic factors and characteristics of plasma amino acid profile. *Pediatr Int* (査読有) 2006;48(2):105-11.
- 13) Hirose S. A new paradigm of channelopathy in epilepsy syndromes: intracellular trafficking abnormality of channel molecules. *Epilepsy Res* (査読有) 2006;70 Suppl 1:S206-17.
  - 14) Ito M, Yamakawa K, Sugawara T, Hirose S, Fukuma G, Kaneko S. Phenotypes and genotypes in epilepsy with febrile seizures plus. *Epilepsy Res* 2006;70 Suppl (査読有) 1:S199-205.
  - 15) Kanaumi T, Hirose S, Goto Y, Naitou E, Mitsudome A. An infant with a mitochondrial A3243G mutation demonstrating the MELAS phenotype. *Pediatr Neurol* 2006;34(3):235-8.
  - 16) Kanaumi T, Takashima S, Hirose S, Kodama T, Iwasaki H. Neuropathology of methylmalonic acidemia in a child. *Pediatr Neurol* (査読有) 2006;34(2):156-9.
  - 17) Kanaumi T, Takashima S, Iwasaki H, Mitsudome A, Hirose S. Developmental changes in the expression of GABA<sub>A</sub> receptor alpha 1 and gamma 2 subunits in human temporal lobe, hippocampus and basal ganglia: an implication for consideration on age-related epilepsy. *Epilepsy Res* (査読有) 2006;71(1):47-53.
  - 18) Ogawa A, Hirose S, Yasumoto S, Ohfu M, Mitsudome A. Ictal midline epileptiform discharges in benign familial neonatal convulsions. *Med. Bull. Fukuoka Univ.* (査読有) 2006;33(4):305-7.
  - 19) Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Hirose S, Wakabayashi K, Kaneko S. Involvement of Ca<sup>(2+)</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> releasing system in interleukin-1β-associated adenosine release. *Eur J Pharmacol* 査読有 2006;532(3):246-52
- [学会発表] (計 19 件)
- 1) A Girl with bronchiolitis obliterans presenting recurrent lobar atelectasis / Fujiwara C., Yoshikane Y., Tanaka M., Hiratsuka M., Iwasaki N., Shirakusa T., Yamaguchi S., Hirose S. 25<sup>th</sup> International Congress of Pediatrics (2007,8.25-30.Athenes, Greece)
  - 2) Predictors of surgical treatment for patent ductus arteriosus in extremely low birth weight infants / Yoshikane Y., Mori T., Yukitake K., Hirose S. 25<sup>th</sup> International Congress of Pediatrics (2007,8.25-30.Athenes, Greece)
  - 3) Fetal infection of *Hilicobacter cinaedi* manifested by fetal distress and mucous diarrhea at birth. / Ohta E., Fujiwara C., Mori T., Ogawa A., Adachi M., Obama H., Kawarabayashi T., Yamaguchi S., Ono J., Hirose S. 25<sup>th</sup> International Congress of Pediatrics (2007,8.25-30.Athenes, Greece)
  - 4) Micro deletional Mutation of SCN1A in Individuals with Severe Myoclonic Epilepsy in Fancy(SMEI) and Borderline SMEI/ Wang J., Kurahashi K., Hamachi A., Yonetani M., Inoue T., Ogawa A., Hirose S, Yasumoto S., Kaneko S. 27<sup>th</sup> International Epilepsy Congress 2007.7.8-12 Singapore
  - 5) Midazolam for the treatment of neonatal EEG-confirmed seizures/ Ogawa A., Shiratani G., Hashimoto J., Mori S., Yukitake K., Hirose S. 27<sup>th</sup> International Epilepsy Congress (2007.7.8-12 Singapore)
  - 6) Recent advances in the genetics of epilepsy Joint/ Hirose S. 7<sup>th</sup> Human Genome Organization(HUGO) (2008.4. 1-7 Cebu, Philippine)
  - 7) A De Novo *KCNQ2* Mutation Detected in Benign Neonatal Convulsions: Possible Involvement Of Genes responsible for Rare Inherited Epilepsy in Idiopathic Epilepsy / Ishii A., Fukuma G., Uehara A., Yasukochi M., Miyajima T., Makita Y., Hamachi A., Yonetani M., Inoue T., Okada M., Kaneko S., Hirose S. The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research (2008.5.3-6, Hawaii, USA) Perinatal Characteristics of Early-Onset Sepsis in Neonatal Intensive Care Unit in Recent Years. / Tsutsumi M., Ohta E., Inoue T., Kinoshita R., Nakamura M., Mori T., Hirose S. The 4<sup>th</sup> Congress of Asian Society for Pediatric Research (2008.5.3-6, Hawaii, USA)
  - 8) The Application of Genetic Tests for Epilepsy-are there Guidelines for Clinicians?/Hirose S. 7<sup>th</sup> Asian & Oceanian Epilepsy Congress Xiamen, China (2008-5.15-18,Xiamen)
  - 9) Genome-Wide Identification of Febrile Seizure and Related Epilepsy Phenotype Loci/ Miyashita A., Kuwano R., Kojima T., Sasaki T., Zhu G, Kanai K., Fujita K., Hirose S, Kaneko S. 7<sup>th</sup> Asian & Oceanian Epilepsy Congress (2008.5.15-18, Xiamen, China)
  - 10) EEG Findings on Headache with MELAS/ Ihara Y., Fujita T., Inoue T., Yasumoto S., Mitsudome A., Hirose S. (2008.5.15-18, Xiamen, China)
  - 11) Myoclonic-Astatic Epilepsy with Focal Spike Discharge may have Unfavourable Prognosis / Ideguchi H., Inoue T., Ninomiya S., Fujita T., Nakamura N., Yasumoto S., Hirose S.

- (2008.5.15-18, Xiamen, China)
- 12) Non-convulsive Status Epilepticus of Temporal Lobe Epilepsy Misdiagnosed as a Psychosomatic Disease / Fujita T., Nakamura N., Inoue T., Ninomiya S., Ihara Y., Tomonou Y., Ideguchi H., Yasumoto S., Mitsudome A., Hirose S. (2008.5.15-18, Xiamen, China)
- 13) Psychomotor Retardation Aggravated by Infantile Non-convulsive Status Epileptics in Angelman Syndrome / Ninomiya S., Nakamura N., Fujita T., Ideguchi H., Inoue T., Yasumoto S., Hirose S. (2008.5.15-18, Xiamen, China)
- 14) The present Status and Problem of Prenatal Screening of Congenital Heart Defects; 4 Major Referral Centers in Kyushu, Japan / Yoshikane Y., Yoshizato T., Maeno Y., Nishibatake M., Kam N., Fusazaki N., Hirose S. The 2<sup>nd</sup> Asia-Pacific Congress of Pediatrics Cardiology and Cardiac Surgery (2008-5.27-30, Korea)
- 15) Retrospective Analysis of Prenatally Detected Congenital Heart Defects: Six-year Experience of 4 Institutions in Japan / Yoshikane Y., Yoshizato T., Meno Y., Nishibatake M., Kan N., Fusazaki N., Hirose S. 15<sup>th</sup> Congress of the FAOPS 2008 5.20-24, Nagoya)
- 16) Study of Septicemia Due to Enterobacter Cloacae in a Tertiary Neonatal Intensive Care Unit during 1997-2007 / Ohta E., Setoue T., Tsutsumi M., Inoue S., Kinoshita R., Nakamura M., Mori T., Ogawa A., Hirose S. 15<sup>th</sup> Congress of the FAOPS 2008 5.20-24, Nagoya)
- 17) Prognoses of the Neonates of Multiple Births Admitted in NICU in recent Years / Inoue T., Tsutsumi M., Kinoshita R., Ohta E., Nakamura M., Mori T., Hirose S. 15<sup>th</sup> Congress of the FAOPS 2008 5.20-24, Nagoya)
- 18) Mutational analysis for repetitive febrile seizures and sporadic febrile seizures plus in Japanese Hirose, S., 8th European Congress on Epileptology (9.18-26, 2008, Berlin)
- 19) Benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes following benign neonatal seizures resulting from a mutation of *KCNQ2* 8th European Congress on Epileptology (9.18-26, 2008, Berlin)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3件)

1. 名称: 変異導入遺伝子およびそれを導入したノックイン非ヒト動物

発明書: 廣瀬伸一

権利者: (独) 科学技術振興機構

産業財産権の種類: 特許

番号: 特願 2008-273446

出願年月日: H20. 10. 23

国内

2. 名称: てんかんモデル非ヒト哺乳動物

発明書: 廣瀬伸一

権利者: (独) 科学技術振興機構

産業財産権の種類: 特許

番号: 特願 2008-031002

出願年月日: H20. 2. 12

国内

3. 名称: てんかんモデル非ヒト哺乳動物

発明書: 廣瀬伸一

権利者: (独) 科学技術振興機構

産業財産権の種類: PCT 出願

番号: PCT/JP200\*9/052230

出願年月日: H21. 2. 10

国外

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 伸一 (HIROSE SHINICHI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 60248515

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

三角 佳生 (MISUMI YOSHIO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号: 10148877

上原 明(UEHARA AKIRA)  
福岡大学・医学部・准教授  
研究者番号：60140745

荒木 喜美(ARAKI KIMI)  
熊本大学・学内共同利用施設・准教授  
研究者番号：90211705

斎藤 亮(SAITO RYO)  
福岡大学・薬学部・講師  
研究者番号：80122696

高野 行夫(TAKANO YUKIO)  
福岡大学・薬学部・教授  
研究者番号：50113246

弟子丸 正伸(DESHIMARU MASANOBU)  
福岡大学・理学部・准教授  
研究者番号：70309889