

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008 ～ 2009
 課題番号：20790267
 研究課題名 (和文)
 マイクロアレイを用いた新生児～乳児期発症の難治性てんかん責任遺伝子の同定
 研究課題名 (英文)
 Identification of responsive genes for infantile epilepsy using genomic microarray
 研究代表者
 才津 浩智 (SAITSU HIROTOMO)
 横浜市立大学・医学部・助教
 研究者番号：40402838

研究成果の概要 (和文)：マイクロアレイによる染色体構造異常のスクリーニングを 30 症例で行い、女児症例における第 9 染色体長腕 (9q33.3-q34.11) 微細欠失の同定を通じて、大田原症候群の原因遺伝子 STXBP1 を世界に先駆けて報告した (Saito et al., *Nature Genetics*, 2008)。この発見は、シナプス小胞の開口放出障害が新生児～乳児期発症の難治性てんかんの病態に関与していることを強く示唆しており、全く新しいてんかんの発症機序を提唱するものであった。

研究成果の概要 (英文)：Thorough genomic microarray analysis of patients with infantile epilepsy, we identified a *de novo* microdeletion at 9q33.3-q34.11 in a patient with Ohtahara syndrome. Among the genes mapped within the deletion, STXBP1 was found to be mutated in four patients with Ohtahara syndrome, indicating that mutations of STXBP1 caused Ohtahara syndrome (Saito et al., *Nature Genetics*, 2008). This finding raised a novel mechanism in which aberration of synaptic vesicle release would cause epilepsy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人類遺伝学

キーワード：ゲノム、てんかん、乳児、大田原症候群、STXBP1

1. 研究開始当初の背景

新生児～乳児期発症の難治性てんかんには、大田原症候群 (early infantile epileptic encephalopathy with suppression burst: EIEE)、早期ミオクロニー脳症 (early myoclonic encephalopathy: EME)、West 症候群 (点頭てんかん) がある。大田原症候群や

早期ミオクロニー脳症の多くは乳児期早期に発症し、てんかん発作に加えて重度の精神運動発達遅滞と、脳波上顕著な suppression-burst を認めるのが特徴である。West 症候群はシリーズ形成性のスパズムと脳波上のヒプスアリスミアがよく知られている。脳形成異常、染色体異常、周産期低酸

素性脳障害などが原因として知られているが、明らかな原因がない特発性のものであり遺伝的な素因が存在する。EIEE と EME の多くは West 症候群に移行することから、これら 3 疾患には共通の遺伝背景が存在することが示唆されていた。現在までに同定された疾患責任遺伝子としては、家系例の解析から、X 染色体上に位置する 2 つの遺伝子 *ARX* (*aristalless* related homeobox), *CDKL5* (cyclin-dependent kinase-like 5) が報告されている。孤発例においても、男児の EIEE および West 症候群において *ARX* 変異が、女児の West 症候群において *CDKL5* 変異が報告されていた。しかしながら、同定された責任遺伝子変異で原因が説明できない症例が多数あり、他の遺伝子の関与が示唆されていた。

2. 研究の目的

新生児～乳児期発症の難治性てんかんのほとんどは孤発例であるため、従来行われてきた家系例による連鎖解析では責任遺伝子の単離に限界があった。このように孤発例がほとんどである疾患においては、転座や欠失といった染色体構造異常を手がかりとして疾患責任遺伝子を同定する手法が有効と考えられる。このアプローチの特徴は、1 例の染色体異常から遺伝子単離が可能であることであり、当研究室ではこの手法を用いてマルファン症候群の原因遺伝子の同定に成功していた。そこで本研究では、全ゲノム解析用マイクロアレイを用いて疾患に合併する染色体構造異常を網羅的に検索し、構造異常の領域から疾患責任遺伝子を同定するという従来とは異なる手法で、新生児～乳児期発症の難治性てんかんの新しい責任遺伝子の単離を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 新生児～乳児期発症の難治性てんかん患者に合併する染色体構造異常の検出

全ゲノム解析用マイクロアレイ

(Affimatrix GeneChip Mapping 250K NspI または当教室で開発した BAC アレイ) を用いた染色体構造異常の検査を、30 例の新生児～乳児期発症難治性てんかん患者で行い、疾患責任遺伝子同定の手掛かりになる染色体構造異常を検出した。マイクロアレイで認められた異常については、蛍光 *in situ* hybridization

(FISH) 法や定量 PCR 法を用いて確認した後、御両親の検体を依頼し、その異常が両親由来かどうかを検査した。健常両親で認められない異常を患者が有していた場合 (*de novo* 変異) には、染色体異常が原因となって発症していると考え、異常領域に位置する遺伝子について以下に述べる変異スクリーニングを行った。

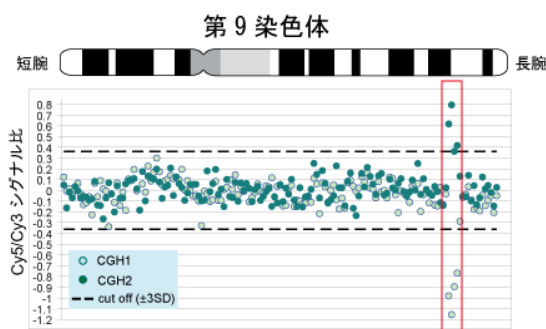
2) 疾患候補遺伝子の遺伝子変異スクリーニング

染色体異常領域から発現パターン・機能予測などを基に、疾患候補遺伝子を抽出し、他の患者での遺伝子変異スクリーニングを行った。申請者は、効率的に遺伝子変異スクリーニングを行うことが迅速な本研究の遂行に必須と考え、High resolution Melt (HRM) を用いた遺伝子変異スクリーニングの系を確立した。HRM は、PCR 産物の長さが 400bp 以内であればほぼ 100% ヘテロ二本鎖を検出可能で、感度も非常に優れていた。ヘテロ二本鎖と判断された検体に対してはシーケンスを行い、変異の種類と位置を同定した。遺伝子変異が同定された場合は、まず正常検体 200 例で同様の変異がないことを確認した後、御両親の検体を依頼し、その変異が両親由来かどうかを検査した。

4. 研究成果

(1) 大田原症候群患者における第 9 染色体長腕 (9q33.3-q34.11) 微細欠失の同定

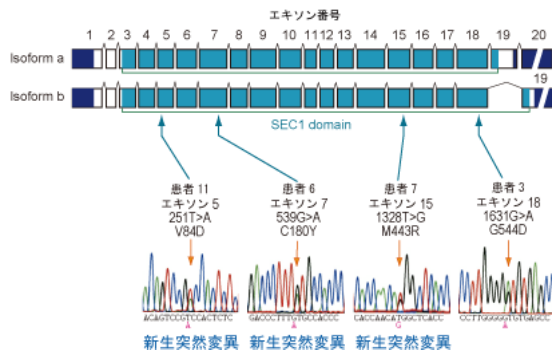
ゲノムアレイによる染色体構造異常のスクリーニングの結果、大田原症候群の女児症例において第 9 染色体長腕 (9q33.3-q34.11) 微細欠失を同定した (下図)。



この欠失はご両親には認められない *de novo* 変異であったため、大田原症候群の原因になっている可能性が非常に強いと考えられた。

(2) 候補遺伝子の変異スクリーニング

この欠失内には、40 以上の遺伝子が位置していた。申請者は、ノックアウトマウスの解析により、シナプス小胞の開口放出に重要な役割を果たすことが知られていた *STXBP1* 遺伝子を候補遺伝子と考え、13 名の大田原症候群患者で変異スクリーニングを行った。下図のごとく、4 名の患者で *STXBP1* のミスセンス変異が同定され、うち 3 つは *de novo* 変異であることを確認できた。*STXBP1* 遺伝子は神経細胞におけるシナプス小胞の開口放出に重要な役割を果たすことが知られている *MUNC18-1* タンパク質をコードしていた。申請者は、患者で見つかった変異を有する *MUNC18-1* は構造的に不安定で、また機能が著しく低下していることを明らかにした。



(Saitsu et al., Nature Genetics, 2008)。

本発見は、治療に抵抗性を示す重度のてんかん性脳症の原因遺伝子を明らかにしたばかりでなく、シナプス小胞の開口放出障害という新しいてんかんの発症機構を強く示唆する。今後、シナプス小胞の開口放出という観点からてんかんの病態の理解がすすみ、本疾患の新しい治療法の開発に大きく寄与することが期待される。

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 16 件)

- ① Nishimura A, Hiraki Y, Shimoda H, Nishimura G, Tadaki H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. *De novo* deletion of 1q24.3-q31.2 in a patient with severe growth retardation. *Am J Med Genet A*. 152A(5):1322-5, 2010
- ② Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saitsu H, Miyake N, Mizuguchi T, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinakagawa T, Yamamoto T. Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. *Genesis* 48(4):233-43, 2010
- ③ Zhao L, Saitsu H, Sun X, Shiota K, Ishibashi M. Sonic hedgehog is involved in formation of the ventral optic cup by limiting Bmp4 expression to the dorsal domain. *Mech Dev* 127(1-2):62-72, 2010
- ④ Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T and Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. *Am J Med Genet A* 149A(6):1224-1230, 2009
- ⑤ Komada M, Saitsu H, Kinboshi M, Miura T, Shiota K and Ishibashi M. Hedgehog signaling is involved in development

of the neocortex. *Development* 135(16):2717-27, 2008

- ⑥ Nishimura A, Takano T, Mizuguchi T, Saitsu H, Takeuchi Y, Matsumoto N. CDKL5 disruption by t(X;18) in a girl with West syndrome. *Clin Genet* 74(3):288-90, 2008
- ⑦ Mochizuki J, Saitsu H, Mizuguchi T, Nishimura A, Visser R, Kurotaki N, Miyake N, Unno N, Matsumoto N. Alu-related 5q35 microdeletions in Sotos syndrome. *Clin Genet* 74(4):384-91, 2008
- ⑧ Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K and Matsumoto N. *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nature Genetics* 40(6):782-8, 2008
- ⑨ Saitsu H and Shiota K. Involvement of the axially condensed tail bud mesenchyme in normal and abnormal human posterior neural tube development. *Congenit Anom (Kyoto)* 48(1):1-6, 2008
- ⑩ Sun X, Saitsu H, Shiota K and Ishibashi M. Expression dynamics of the LIM-homeobox genes, *Lhx1* and *Lhx9*, in the diencephalon during chick development. *Int J Dev Biol* 52(1):33-41, 2008

[学会発表] (計 7 件)

- ① Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T and Matsumoto N. (2009). Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split-foot malformation and hearing loss. 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Hawaii, USA 10月21日
- ② Saitsu H. 「Analysis of congenital anomalies by using microarray」 The 20th Fukuoka International Symposium on Pediatric/Maternal-Child Health Research, 2009年8月、Fukuoka, Symposium
- ③ 才津 浩智. 「発生生物学からみた Dysmorphology ～形態形成と遺伝子発現調節～」 第49回日本先天異常学会学術集会, 2009年6月、鹿児島, シンポジウム

④ Saitsu H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K and Matsumoto N (2008). *De novo* mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. 58th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, Philadelphia, USA

⑤ 才津 浩智, 加藤 光広, 水口 剛, 濱田 恵輔, 小坂 仁, 遠山 潤, 宇留野 勝久, 熊田 聡子, 西山 精視, 西村 章, 岡田 一平, 吉村 有紀子, 平井 秀一, 熊田 竜郎, 早坂 清, 福田 敦夫, 緒方 一博, 松本 直通 (2008). STXBP1 (MUNC18-1) をコードする遺伝子の *de novo* 変異によって大田原症候群が引き起こされる. 日本人類遺伝学会第 53 回大会, 横浜

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法

発明者: 松本直通、才津浩智

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類: 特許権

番号: 特願 2007-340147

出願年月日: 2007 年 12 月 28 日

国内外の別: 国内

名称: 大脳白質異常を伴う点頭てんかんの検出方法

発明者: 松本直通、才津浩智

権利者: 公立大学法人横浜市立大学

種類: 特許権

番号: 特願 2009-146055

出願年月日: 2009 年 6 月 19 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

才津 浩智 (SAITSU HIROTOMO)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号: 40402838

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: