

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年4月24日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21249062

研究課題名（和文） ヒトてんかんの遺伝子改変モデル動物の作出と革新的治療の開発

研究課題名（英文） Development of genetically engineered animal models and novel therapeutic measures for human Epilepsy

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（和文）：

申請者が管理するてんかん遺伝子バンクを利用し、100種類以上のてんかんを引き起こす新規遺伝子異常を同定した。また、ヒトてんかんの責任遺伝子に変異を持つ遺伝子改変マウスの作出に成功し、その神経科学的、電気生理学的異常を証明した。これらの研究により、小児てんかん患者の遺伝子異常を迅速かつ継続的に同定・解析を行える施設、システムを確立した。現在分子病態に基づく治療法を開発中である。

研究成果の概要（英文）：

We have identified over 100 genetic abnormalities which cause epilepsy in our DNA bank. We have also successfully genetically engineered mice which harbor genetic abnormalities identified in human. These outcomes have established a system which allows rapid and continuous identification and analyses of genetic abnormalities in individuals with epilepsy. Now novel therapeutic measures based upon the pathogenesis of epilepsy are being developed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	19,600,000	5,880,000	25,480,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
総計	30,600,000	9,180,000	39,780,000

研究分野：内科系臨床医学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：小児神経学

1. 研究開始当初の背景

①“イオンチャネル異常による小児てんかん”に焦点をあて研究を続けてきた。これにより、申請者らは100種以上のてんかんの責任遺伝子変異をイオンチャネルに見出した。

②ヒトてんかんの遺伝子変異を遺伝子組換えで導入し、世界で初めて人間と同じ自発てんかん発作型を有するてんかんモデルラット作

出に成功した。

③独自の手法を用いた可変型ノックインマウス開発に成功した

2. 研究の目的

A. 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変異を同定する。

B. 見出された遺伝子変異を有するモデル動

物を作成し、その分子病態を明らかにする。
C. 分子病態に基づく革新的な治療法を開発する。

3. 研究の方法

A: てんかんの原因となる新規遺伝子変異の同定

同定された遺伝子変異による病態の生理学的検証

B: 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と病態解明
遺伝子組換えラット作出

可変型ノックインマウス作出

作出改変動物の症候学、電気生理学的異常の検証

C: 遺伝子改変動物を用いた病態に基づく革新的治療開発

病態に強く関係する分子を阻害する治療研究

D: ストップコドンを読み飛ばす新薬 PTC124 を用いた分子治療

E: てんかんの原因となる新規遺伝子変異を同定

F: 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

G: 遺伝子改変動物を用いた革新的治療開発

4. 研究成果

申請者が設立・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* で検証した。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成し、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* で明らかにした。

具体的には全国より「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 *SCN1A* の新規遺伝子異常を発見した。さらに、十数種の *KCNQ2* 遺伝子異常を発見し、その変異チャンネルの電気生理学的異常を *ex vivo* で検証した。加えて女性のみが罹患する *PCDH19* 関連てんかんの遺伝子異常を日本人患者で同定し論文として発表した。また、*KCNQ2* 遺伝子に変異を持つ可変型ノックインマウス(キックインマウス)三系統の作出に成功し、その神経科学的、電気生理学的異常を証明した。(論文投稿中)キックインマウス作出法の改良型である、キックインマウス *EX* 法を用いて、ノックインマウスの *SCN1A* の全翻訳領域に変異を導入出来るシステムを構築した。現在、その個体作出中である。

これらの研究により申請者らは、小児てんかん患者のイオンチャンネルの異常を迅速かつ継続的に同定・解析を行える施設、システ

ムを確立した。また遺伝子組換えラットの作出と、新しい手法の可変型ノックインマウスの作出が安定して行えるようになった。

今後も、遺伝子解析と動物作出によるてんかんの病態解明に努めるが、さらに、この一連の研究の最終目的である“分子病態に基づく革新的な治療法を開発”に展開する予定である。

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 29 件)

- 1). Kawai C, Minatogawa Y, Akiyoshi H, Hirose S, Suehiro T, Tone S. A Novel Mutation of Human Liver Alanine:Glyoxylate Aminotransferase Causes Primary Hyperoxaluria Type 1: Immunohistochemical Quantification and Subcellular Distribution. *Acta Histochem. cytochem.* 査読有、2012;45(2):121-9. doi:10.1267/ahc.11042
- 2). Shi X, Wang J, Kurahashi H, Ishii A, Higurashi N, Kaneko S, Hirose S. On the likelihood of *SCN1A* microdeletions or duplications in Dravet syndrome with missense mutation. *Brain Dev* 査読有、2012 ; 99 : 27-38.
- 3). Saitoh M, Shinohara M, Hoshino H, Kubota M, Amemiya K, Takanashi J, Hirose S, Mizuguchi M. Mutation of the *SCN1A* gene in acute encephalopathy. *Epilepsia* .査読有、2012: 1-7 doi:10.1111/j.1528-1167.2011.03402.x
- 4). Ono S, Yoshiura K, Kinoshita A, Kikuchi T, Nakane Y, Kato N, Sadamatsu M, Konishi T, Nagamitsu S, Matsuura M, Yasuda A, Komine M, Kanai K, Inoue T, Osamura T, Saito K, Hirose S, Koide H, Tomita H, Ozawa H, Niikawa N and Kurotaki N. Mutations in *PRRT2* responsible for paroxysmal kinesigenic dyskinesias also cause benign familial infantile convulsions. *J Hum Genet* .査読有、2012: 1-4 doi:10.1038/jhg.2012.23
- 5). Higurashi N, Shi X, Yasumoto S, Oguni K, Itomi K, Miyamoto A, Shirishi H, Kato T, Makita Y, Hirose S. *PCDH19* Mutation in Japanese Females with Epilepsy. *Epilepsy Res.* 査読有、2012;99:28-37 DOI:10.1016/j.epilepsyres.2011.10.014
- 6). Shi X, Yasumoto S, Kurahashi K, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Clinical spectrum of *SCN2A* mutations. *Brain Dev.* 査読有、2011;34 (7) : 541-5.

- doi:10.1016/j.braindev.2011.09.016
- 7). Kobayashi Y, Akasaka N, Ohashi T, Saitoh S, Tomonoh Y, Hirose S, Tohyama J. Early-onset absence epilepsy at eight months of age. *Epileptic Disord*. 査読有、2011;13(4):417-21.
- 8). Hwang SK, Makita Y, Kurahashi H, Cho YW, Hirose S. Autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy: a genotypic comparative study of Japanese and Korean families carrying the CHRNA4 Ser284Leu mutation. *J Hum Genet*. 査読有、2011; 56(8):609-12.
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03002.x
- 9). Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T. Retrospective multiinstitutional study of the prevalence of early death in Dravet syndrome. *Epilepsia* 査読有、2011;52(6):1144-9.
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03053.x
- 10). Sakauchi M, Oguni H, Kato I, Osawa M, Hirose S, Kaneko S, Takahashi Y, Takayama R, Fujiwara T. Mortality in Dravet syndrome: search for risk factors in Japanese patients. *Epilepsia*. 査読有、2011;52 Suppl 2:50-4.
doi: 10.1111/j.1528-1167.2011.03002.x
- 11). Tomonoh Y, Yasumoto S, Ihara Y, Fujita T, Nakamura N, Ninomiya S, Kodama R, Ideguchi H, Inoue T, Mitsudome A, Hirose S. Diagnosing nocturnal frontal lobe epilepsy: A case study of two children. *Seizure*. 査読有、2011;20(7):583-5.
doi:10.1016/j.seizure.2011.03.004
- 12). Wang W, Takashima S, Segawa Y, Itoh M, Shi X, Hwang SK, Nabeshima K, Takeshita M, Hirose S. The Developmental Changes of Na(v)1.1 and Na(v)1.2 Expression in the Human Hippocampus and Temporal Lobe. *Brain Res*. 査読有、2011; 1389(5):61-70.
doi:10.1016/j.brainres.2011.02.083
- 13). Yamakawa Y, Nakazawa T, Ishida A, Saito N, Komatsu M, Matsubara T, Obinata K, Hirose S, Okumura A, Shimizu T. A boy with a severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase deficiency. *Brain Dev*. 査読有、2011;34(2):107-12.
doi:10.1016/j.braindev.2011.05.003
- 14). Ishii A, Zhang B, Kaneko S, Hirose S. Positive association between benign familial infantile convulsions and LGI4. *Brain Dev*. 査読有、2010; 32:538-43.
doi:10.1016/j.braindev.2009.09.006
- 15). Ottman R, Hirose S. Genetic testing in the epilepsies—Report of the ILAE Genetics Commission. *Epilepsia*. 査読有、2010. ; 51(4) : 655-670
doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02429.x
- 16). Segawa Y, Hisano S, Matsushita M, Fujita T, Hirose S, Takeshita M, Iwasaki H. IgG subclasses and complement pathway in segmental and global membranous nephropathy. *Pediatr Nephrol*. 査読有、2010;25(6):1091-9.
doi 10.1007/s00467-009-1439-8
- 17). Shi X, Huang MC, Ishii A, Yoshida S, Okada M, Morita K, Nagafuji H, Yasumoto S, Kaneko S, Kojima T, Hirose S. Mutational analysis of GABRG2 in a Japanese cohort with childhood epilepsies. *J Hum Genet*. 査読有、2010;55(6):375-8.
doi:10.1038/jhg.2010.47
- 18). Sohda M, Misumi Y, Yamamoto A, Nakamura N, Ogata S, Sakisaka S, Hirose S, Ikehara Y, Oda K. Interaction of golgin-84 with the conserved oligomeric Golgi (COG) complex mediates the intra-Golgi retrograde transport. *Traffic*. 査読有、2010; 11:1552–66.
doi:10.1111/j.1600-0854.2010.01123.x
- 19). Takeyama Y, Yokoyama K, Takata K, Tanaka T, Sakurai K, Matsumoto T, Iwashita H, Ueda S, Hirano G, Hanano T, Nakane H, Morihara D, Nishizawa S, Yoshikane M, Anan A, Kakumitsu S, Kitamura Y, Sakamoto M, Irie M, Iwata K, Shakado S, Sohda T, Watanabe H, Hirose S, Hayashi H, Noritomi T, Yamashita Y, Sakisaka S. Clinical features of Wilson disease: Analysis of 10 cases. *Hepatol Res*. 査読有、2010;40(12):1204-11.
doi: 10.1111/j.1872-034X.2010.00728.x
- 20). Torisu H, Kira R, Ishizaki Y, Sanefuji M, Yamaguchi Y, Yasumoto S, Murakami Y, Shimono M, Nagamitsu S, Masuzaki M, Amamoto M, Kondo R, Uozumi T, Aibe M, Gondo K, Hanai T, Hirose S, Matsuishi T, Shirahata A, Mitsudome A, Hara T. Clinical study of childhood acute disseminated encephalomyelitis, multiple sclerosis, and acute transverse myelitis in Fukuoka Prefecture, Japan. *Brain Dev*. 査読有、2010;32(6):454-62.
doi:10.1016/j.braindev.2009.10.006
- 21). Weng WC, Hirose S, Lee WT. Benign convulsions with mild gastroenteritis: is it associated with sodium channel gene SCN1A mutation? *J Child Neurol*. 査読有、2010;25(12):1521-4. DOI:10.1177/0883073810370898
- 22). Chen S-J, Hirose S. Current Proceedings of Febrile Seizures and Related Epileptic Syndromes in SCN1A: from Bedside to

- Bench. J Med Sci. 査読有、
2009;29(4):167-72.
- 23). Ishii A, Fukuma G, Uehara A, Miyajima T, Makita Y, Hamachi A, Yasukochi M, Inoue T, Yasumoto S, Okada M, Kaneko S, Mitsudome A, Hirose S. A de novo KCNQ2 mutation detected in non-familial benign neonatal convulsions. Brain Dev. 査読有、
2009;31(1):27-33.
doi:10.1016/j.braindev.2008.05.010
- 24). Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, Kaneko S. Physicochemical property changes of amino acid residues that accompany missense mutations in SCN1A affect epilepsy phenotype severity. J Med Genet. 査読有、
2009;46(10):671-9.
doi: 10.1136/jmg.2008.060897
- 25). Kumakura A, Ito M, Hata D, Oh N, Kurahashi H, Wang JW, Hirose S. Novel de novo splice-site mutation of SCN1A in a patient with partial epilepsy with febrile seizures plus. Brain Dev. 査読有、
2009;31(2):179-82.
doi:10.1016/j.braindev.2008.06.001
- 26). Kurahashi H, Wang JW, Ishii A, Kojima T, Wakai S, Kizawa T, Fujimoto Y, Kikkawa K, Yoshimura K, Inoue T, Yasumoto S, Ogawa A, Kaneko S, Hirose S. Deletions involving both KCNQ2 and CHRNA4 present with benign familial neonatal seizures. Neurology. 査読有、
2009;73(15):1214-7.
- 27). Sakakibara T, Nakagawa E, Saito Y, Sakuma H, Komaki H, Sugai K, Sasaki M, Kurahashi H, Hirose S. Hemiconvulsion-hemiplegia syndrome in a patient with severe myoclonic epilepsy in infancy. Epilepsia. 査読有、
2009;50(9):2158-62.
doi: 10.1111/j.1528-1167.2009.02175.x
- 28). Shi X, Yasumoto S, Nakagawa E, Fukasawa T, Uchiya S, Hirose S. Missense mutation of the sodium channel gene SCN2A causes Dravet syndrome. Brain Dev. 査読有、
2009;31:758-62.
doi:10.1016/j.braindev.2009.08.009
- 29). Sugiura Y, Nakatsu F, Hiroyasu K, Ishii A, Hirose S, Okada M, Jibiki I, Ohno H, Kaneko S, Ugawa Y. Lack of potassium current in W309R mutant KCNQ3 channel causing benign familial neonatal convulsions (BFNC). Epilepsy Res. 査読有、
2009;84(1):82-5.
doi:10.1016/j.epilepsyres.2008.12.003

[学会発表] (計 7 件)

1. Complications in a metachromatic leukodystrophy(MLD) patient's long-term-follow up:neurologic complications./ Takahito Inoue, Michitaka Yonekura, Takako Fujita, Yukiko Ihara, Yuko Tomonoh, Hitoshi Ideguchi, Sawa Yasumoto, Shiho Kodama, Shinichi Hirose. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases ,福岡 2010.3/7-10
2. The Neurological prognosis of organic academia/ Takako Fujita, Yukiko Ihara, Yuko Tomonoh, Shinya Ninomiya, Yurie Kodama, Hitoshi Ideguchi, Takahito Inoue, Sawa Yasumoto, Shinichi Hirose. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases ,福岡,2010.3/7-10
3. A Neuronal Ceroid-Lipofuscinosis case with Epilepsy and Sick Sinus Syndrome/ Yukiko Ihara, Yuko Tomonoh, Takako Fujita, Hiroshi Ideguchi, Takahito Inoue, Sawa Yasumoto, Shinichi Hirose ,The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases ,福岡,2010.3/7-10
4. Progressive myoclonus epilepsy due to Gaucher disease type 3 without hepatosplenomegaly/ Norimichi Higurashi, Shin-ichiro Hamano, Asako Tajima, Toya Ohashi, Hiroyuki Ide, Shinichi Hirose. The 1st Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases ,福岡 2010.3/7-10
5. てんかんの遺伝子研究の進歩とその臨床応用 第 21 回山梨神経学研究会 学術講演会, 廣瀬伸一 2009 年 6 月 2 日 山梨
6. てんかん遺伝子研究の進歩とその臨床応用 (招待講演) 南大阪小児疾患研究会, 廣瀬伸一 2010 年 2 月 6 日 大阪
7. Genetics of febrile Seizures and Related Conditions, 10th Asian & Oseanian Congress of Child Nuerology, Hirose S, 2009 年 6 月 10 日-13 日 Korea

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称 : 注意欠陥／多動性障害モデル非ヒト哺乳

乳動物

発明者：廣瀬伸一、高崎浩太郎

権利者：福岡大学

種類：特許

番号：特願 2009-188152

出願年月日：2009. 8. 14

国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

特願

番号：

取得年月日：

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.fukuoka-u.ac.jp/epilepsy/>

/

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

該当者無し

(3) 連携研究者

三角 佳夫 (MISUMI YOSHIO)

福岡大学・医学部・准教授

研究者番号：10148877

高野 行夫 (TAKANO YUKIO)

福岡大学・薬学部・教授

研究者番号：50113246

斎藤 亮 (SAITO RYO)

福岡大学・薬学部・講師

研究者番号：80122696

弟子丸 正伸 (DESHIMARU MASANOBU)

福岡大学・理学部・准教授

研究者番号：70309889

井上 隆司 (INOUE RYUJI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：30232573

桂林 秀太郎 (KATSURABAYASHI SHUTARO)

福岡大学・薬学部・助教

研究者番号：50435145

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・准教授

研究者番号：90211705