

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24年 4月 1日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390312

研究課題名（和文） チャネル遺伝子変異をもつてんかん患者の難治化要因の解明

研究課題名（英文） Genetic modifiers of an intractable epilepsy with channel gene mutations

研究代表者

大守 伊織（OMORI IORI）

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403488

研究成果の概要（和文）：難治てんかんの一種である乳児重症ミオクロニーてんかん（ドラベ症候群）は電位依存性ナトリウムチャネル *SCN1A* 遺伝子変異によって発症する。本疾患の修飾因子を検索するため、患者 48 例に対し、電位依存性カルシウムチャネル *CACNA1A* 遺伝子解析を行った。*CACNA1A* 遺伝子変異/多型を 21 例に認め、これらの変異/多型のチャネルは機能獲得型の変化を示した。2 種類のチャネル変異をもつ動物（ラット）のてんかんの症状を比較すると、1 種類の変化をもつ動物よりも重症化が認められた。

研究成果の概要（英文）：Dravet syndrome is an intractable epileptic syndrome beginning in the first year of life. *De novo* mutations of *SCN1A*, which encode the Na_v1.1 neuronal voltage-gated sodium channel, are considered the major cause of Dravet syndrome. In this study, we investigated genetic modifiers of this syndrome.

We performed a mutational analysis of all coding exons of *CACNA1A* in 48 subjects with Dravet syndrome. Nine *CACNA1A* variants, including six novel ones, were detected in 21 of 48 subjects (43.8%). The electrophysiological properties of four of the five novel Ca_v2.1 variants exhibited biophysical changes consistent with gain-of-function.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2011年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：医歯薬学

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，てんかん，チャネル，難治，パッチクランプ，*SCN1A*，*CACNA1A*

1. 研究開始当初の背景

てんかんは有病率が高い疾患であり、日本には約100万人のてんかん患者がいると推測されている。60-70%は薬物療法が有効であるが、残りは適切な治療にも関わらず、十分な効果が得られない。30万人の難治てんかん患者が存在し、てんかんの難治化要因の基礎的研究は重要な課題である。

2. 研究の目的

難治てんかんの一種である乳児重症ミオクローニーてんかん（ドラベ症候群）の約80%の患者に電位依存性ナトリウムチャンネルSCN1A遺伝子変異が認められる。臨床遺伝学的所見およびモデル動物の実験知見から、SCN1A遺伝子異常を修飾する因子の存在が推測されるようになった。

本疾患の病態解明は、てんかんが難治化する機序の理解にもつながるものと考えられた。

3. 研究の方法

(1) 難治てんかん患者における遺伝的けいれん感受性遺伝子の解析

電位依存性カルシウムチャンネルの $\alpha 1$ サブユニットをコードするCACNA1A遺伝子の解析を行った。具体的にはCACNA1A遺伝子のエクソンをはさむようにイントロンにプライマーを設計し、全47コーディングエクソンをPCRで増幅。直接塩基配列決定法により、変異を検索した。

変異型CACNA1A遺伝子のcDNAを構築し、HEK293細胞に強制発現させ、パッチクランプ法を用いて、変異型チャンネルの電気生理学的特性を検討した。

(2) Scn1a 遺伝子変異ラット (HISS ラット) と Cacna1a 遺伝子変異ラット (GRY ラット) の交配によるてんかん表現型の変化の検討

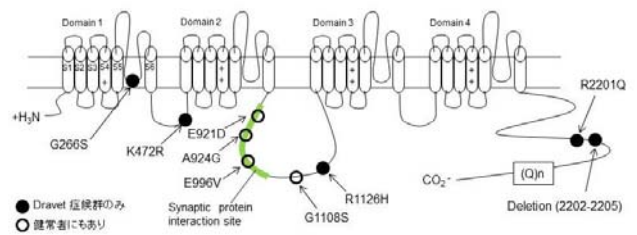
両遺伝子変異ラットは遺伝的背景が異なっていたため、F344/NSIc 近交系ラットに統一するように戻し交配を実施し、F12-F15世代において、HISS ラット、GRY ラット、ダ

ブル変異ラット (HISS ラットと GRY ラットの交配) 3群の表現型を検討した。身体所見 (6週齢から12週齢までの体重増加)、5週齢での高体温感受性けいれん、長時間脳波モニタリングによる6週齢から12週齢までの自発てんかん発作について比較した。

4. 研究成果

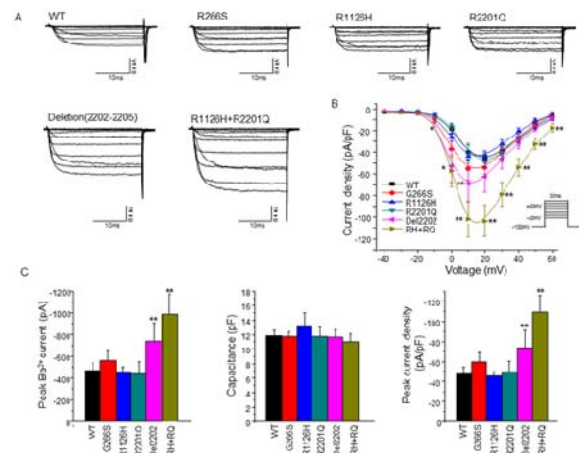
(1) 難治てんかん患者における遺伝的けいれん感受性遺伝子の解析

患者48人のうち21人 (43.8%) において9種類のCACNA1A遺伝子変異/多型が検出された。このうち6種類についてはこれまでに報告されていない新規変異/多型であった。変異/多型の大部分は、電位依存性カルシウムチャンネルの細胞内ドメインに存在し、神経伝達物質の放出にかかわる蛋白との相互作用が変化する可能性が示唆された。



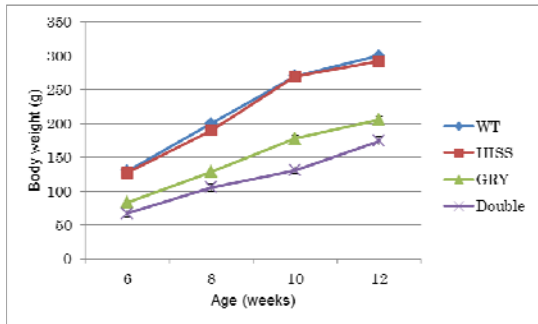
CACNA1A 遺伝子変異/多型の種類と場所

変異型CACNA1A遺伝子がコードするチャンネルは、電位依存性活性化において、Ba電流が正常型よりも大きく、機能獲得型を示した。

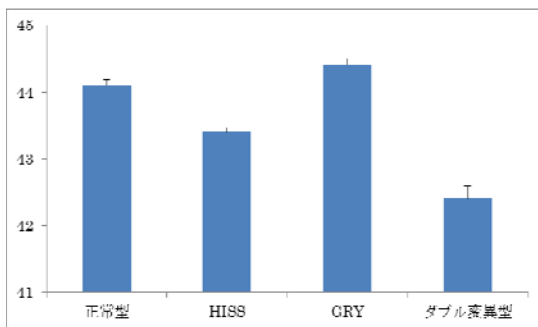


(2) HISS ラットと GRY ラットの交配によるてんかん表現型の変化

①身体所見：6週齢から12週齢までの体重増加曲線を下図に示す。ダブル変異ラットになると成長障害が重くなることが示された。



②高体温感受性けいれん：HISSラットは高体温感受性けいれんが認められるが、GRYラットは野生型と同等である。下図は、45℃の温浴負荷をかけた時に、痙攣が誘発された時の体温をグラフで示したものである。ダブル変異ラットにおいては、HISSラットに比し、低体温で誘発されており、けいれん閾値の有意な低下が認められた。



③自発てんかん発作：HISSラットに自発てんかん発作は認められず、GRYラットでは欠神発作が認められた。ダブル変異ラットでは、欠神発作と全般性強直間代発作とミオクロニー発作が認められた。ダブル変異ラットにおける欠神発作については、GRYラットよりも脳波上の棘徐波複合の持続時間が有意に長かった。

モデル動物を用いた実験から、Scn1a 遺伝子変異にCacna1a 遺伝子変異が加わると、成長障害がより顕著になること、熱性けいれんを起こしやすくなること、自発てんかん発作が新たに出現し多彩な発作症状が認められることが明らかになった。複数のけいれん感受性遺伝子が合わさることによって、てんかんが重症化することを示した意義は大きい。今後は、ヒトの患者で検出された遺伝子変異をもつモデル動物を作製し、両遺伝子のより詳細な相互作用について検討したい。

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 15 件)

- ① Kobayashi K, Ohtsuka Y, Ohmori I. Additional information regarding "Dravet syndrome: Inroads into understanding epileptic encephalopathies" *J Pediatr.* 2012 Mar;160(3):532-533. 査読有
- ② Okumura A, Uematsu M, Imataka G, Tanaka M, Okanishi T, Kubota T, Sudo A, Tohyama J, Tsuji M, Ohmori I, Naiki M, Hiraiwa-Sofue A, Sato H, Saitoh S, Shimizu T. Acute Encephalopathy in Children with Dravet Syndrome *Epilepsia* 2012 Jan; 53(1):79-86. Epub 2011 Nov 16. 査読有
- ③ Kobayashi K, Ohmori I, Ouchida M, Ohtsuka Y. Dravet syndrome with an exceptionally good seizure outcome in two adolescents. *Epileptic Disord.* 2011 Sep;13(3):340-4. 査読有
- ④ Hayashi K, Ueshima S, Ouchida M, Mashimo T, Nishiki T, Sendo T, Serikawa T, Matsui H, Ohmori I (Corresponding

- author). Therapy for hyperthermia-induced seizures in Scn1a mutant rats. *Epilepsia*. 2011 May;52(5):1010-7. 査読有
- ⑤ Mashimo T, Ohmori I, Ouchida M, Ohno Y, Tsurumi T, Miki T, Wakamori M, Takizawa A, Kato M, Hirabayashi M, Sasa M, Mori Y, Serikawa T. A missense mutation of the gene encoding voltage-dependent sodium channel (Na_v1.1) confers susceptibility to febrile seizures in rats. *J Neurosci*. 2010; 30 :5744-5753. 査読有
- ⑥ Kobayashi K, Ouchida M, Okumura A, Maegaki Y, Nishiyama I, Matsui H, Ohtsuka Y, Ohmori I (Corresponding author). Genetic seizure susceptibility underlying acute encephalopathies in childhood. *Epilepsy Res*. 2010; 91: 143-152. 査読有
- ⑦ 大守伊織, 林桂一郎. てんかん関連変異型ナトリウムチャンネルNa_v1.1に対する抗てんかん薬の薬理効果 **てんかん治療研究振興財団研究年報** 第21集 43-48 (2010) 査読無
- ⑧ 芹川忠夫, 大守伊織, 大内田守, 大野行弘, 鶴見東志子, 三木崇史, 若森実, 石原静, 吉田卓史, 滝沢明子, 加藤めぐみ, 平林真澄, 笹征史, 森泰生, 真下知士. ナトリウムチャンネル遺伝子 Scn1a 変異ラットの開発解析研究 **てんかん治療研究振興財団研究年報** 第21集、29-36 (2010) 査読無
- ⑨ 大守伊織, 大内田守, 以下4人略. Dravet症候群患者に認められたカルシウムチャンネル機能異常を引き起こす CACNB4 遺伝子変異 **岡山医学会雑誌** 2009 ; 1213 : 149-156. 査読無
- [学会発表] (計20件)
- ① 大守伊織, 大内田守, 以下4人略. 「てんかん関連電位依存性カルシウムチャンネルCav2.1変異は機能獲得特性を示す」第89回日本生理学会大会 2012年3月29-31日 松本
- ② 大守伊織, 大内田守, 以下3人略. 「Scn1a 遺伝子変異による熱性けいれんの二酸化炭素吸入療法」第45回日本てんかん学会 2011年10月6日-7日新潟
- ③ 大守伊織, 大内田守, 以下5人略. 「てんかん関連変異型電位依存性カルシウムチャンネルの電気生理特性」第34回日本神経科学大会 2011年9月14日-9月17日 横浜
- ④ 大守伊織, 小林勝弘, 大内田守, 以下4名略. 「急性脳症における遺伝性けいれん素因と SCN1A 遺伝子変異」第53回日本小児神経学総会 2011年5月26日-28日 新潟
- ⑤ 大守伊織「全般てんかん熱性痙攣プラスモデルラットの開発と臨床研究への応用」第44回日本てんかん学会ワークショップ てんかんモデル動物の研究から臨床応用へ 2010年10月15日 岡山
- ⑥ 奥村彰久, 大守伊織, 以下14人略 10番目. 「Dravet 症候群における急性脳症」第44回日本てんかん学会 2010年10月14-15日 岡山
- ⑦ 林桂一郎, 大守伊織 「Scn1a 遺伝子変異ラットを用いた熱性けいれんの個別化治療の開発」第44回日本てんかん学会 2010年10月14-15日 岡山
- ⑧ 林桂一郎, 大守伊織, 西木禎一, 真下知士, 以下2人略. 「Scn1a 遺伝子変異ラッ

トを用いた抗てんかん薬の熱性けいれん抑制効果」第 87 回日本生理学会 2010 年 5 月 19-21 日 盛岡

- ⑨ Liu S, Ohmori I, Hayashi K, Nishiki T, Mashimo T, 以下 2 人略. 「*Scn1a* Mutant Rats Display Ataxia and Memory Deficit」第 87 回日本生理学会 2010 年 5 月 19-21 日 盛岡
- ⑩ 大守伊織「電位依存性ナトリウムチャンネル SCN1A 遺伝子変に伴うてんかん」第 130 回日本薬学会一般シンポジウム てんかん研究の展望～新しい抗てんかん薬の開発に向けて～2010 年 3 月 28 日 岡山
- ⑪ 林桂一郎, 大守伊織, 西木禎一, 真下知士, 以下 2 人略. 「熱性けいれんモデルラットを用いた最適治療薬選択の試み」てんかん学会中国四国地方会 2010 年 2 月 13 日 山口
- ⑫ 劉素梅, 大守伊織, 林桂一郎, 真下知士, 以下 2 人略. 「*Scn1a* 変異ラットにおける反復熱性けいれんが脳機能に及ぼす影響」てんかん学会中国四国地方会 2010 年 2 月 13 日 山口
- ⑬ 真下知士, 大守伊織, 大内田守, 以下 6 人略. 「熱刺激誘発けいれん感受性ラットの開発: 新たな熱性けいれんモデルとして」第 32 回日本神経科学大会 2009 年 9 月 16 日-18 日名古屋
- ⑭ Ohmori I, Ouchida M, 以下 7 名略 Cav2.1 dysfunction may be a genetic modifier of severe myoclonic epilepsy in infancy 学会名 36th International Congress of Physiological Sciences 開催地 Kyoto, Japan 発表年 July27-August1. 2009
- ⑮ 大守伊織, 御牧信義, 大内田守. 「2 種類のチャンネル機能異常をもつ乳児重症

ミオクロニーてんかん」第 51 回日本小児神経学会総会 2009 年 5 月 28 日-30 日 米子

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
○出願状況 (計 4 件)

名称: てんかん波を伴う疾患治療剤
発明者: 大内田守, 大守伊織, 改田祐子
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-164770 号
出願年月日: 平成 22 年 7 月 22 日
国内外の別: 国内

名称: ドラベ症候群の発症可能性の判定方法およびその利用
発明者: 大守伊織, 大内田守
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-018705 号
出願年月日: 平成 22 年 1 月 29 日
国内外の別: 国内

名称: てんかん波を伴う疾患治療剤
発明者: 大内田守, 大守伊織, 改田祐子
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/65845
出願年月日: 平成 23 年 7 月 12 日
国内外の別: 国外

名称: ドラベ症候群の発症可能性の判定方法およびその利用
発明者: 大守伊織, 大内田守
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: PCT/JP2011/051636
出願年月日: 平成 23 年 1 月 27 日
国内外の別: 国外

○取得状況 (計 1 件)

名称: ドラベ症候群の早期診断を可能にするためのデータを取得する方法及びその利用
発明者: 大守伊織, 大内田守, 大塚頌子
権利者: 岡山大学
種類: 特許
番号: 特許第 4 4 6 1 2 6 3 号
取得年月日: 平成 22 年 2 月 26 日
国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://seiril.med.okayama-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大守 伊織 (OMORI IORI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20403488

(2) 研究分担者

大内田 守 (OUCHIDA MAMORU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：80213635

(3) 連携研究者

真下知士 (MASHIMO TOMOJI)

京都大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：80397554