

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 24 年 4 月 23 日現在

機関番号： 11501
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21591312
 研究課題名（和文）年齢依存性てんかん性脳症の分子病態解明と分子シャペロン療法開発

研究課題名（英文）Molecular mechanism of age-dependent epileptic encephalopathy and the development of its molecular chaperone treatment.

研究代表者

加藤 光広（KATO MITSUHIRO）
 山形大学・医学部・講師
 研究者番号：10292434

研究成果の概要（和文）：脳形成障害を伴わない家族性の大田原症候群、2家系において *ARX* 遺伝子の終末エクソンに2つのフレームシフト変異を同定した。2家系の変異は、転写亢進に作用するアリストレスドメインを破壊し、転写抑制に作用するポリアラニン配列の伸長変異同様に機能獲得変異と考えられた。臨床的に想定されていた大田原症候群とウエスト症候群の関連性が分子病態的に解明された。

研究成果の概要（英文）：Two frameshift mutations in the terminal exon of the *ARX* gene were identified in two familial cases of idiopathic Ohtahara syndrome. The mutations demolish the aristaless domain, which activates its transcriptional function, and are supposed to be a gain-of-function mutation like an expansion mutation of the polyalanine tract. These findings revealed the molecular pathology of the relationship between Ohtahara syndrome and West syndrome, which was clinically assumed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,450,000	500,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,550,000	1,130,000	4,680,000

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：(1)てんかん、(2)ウエスト症候群、(3)大田原症候群、(4)介在ニューロン、(5)遺伝子、(6)ポリアラニン、(7)分子シャペロン、(8)ARX

1. 研究開始当初の背景

小児期におけるてんかんの有病率は 0.8～1%と言われ頻度が高い。抗てんかん薬と外科治療により多くは治療可能になってきたが、小児では年齢により異なる発作症状・脳波所見を呈し、一部のてんかん症候群では頻回の

てんかん発作に伴い知能障害や運動障害をきたし、年齢依存性てんかん性脳症とよばれる。そのなかでも大田原症候群は、1976年に日本の大田原らによってはじめて報告された乳児期早期に発症するてんかん性脳症であり、その多くは難治性でウエスト症候群

に移行し、神経学的予後だけでなく生命予後も不良な最重度のてんかん性脳症である。これまで大田原症候群は脳形成障害に併発する2次性疾患と考えられてきたが、我々は、世界で初めて大田原症候群の原因遺伝子として、2007年に国内の孤発例2例で *ARX* を (Kato et al. *Am J Hum Genet* 2007), 2008年に孤発例5例で *STXBPI* を (Saitsu et al. *Nat Genet* 2008) 明らかにした。我々は国内及び米国・イタリアとの共同研究において *ARX* が滑脳症やウエスト症候群の原因遺伝子でもあることを明らかにしており (下記研究業績 5,11,17,20 および Kato et al. *Neurology* 2003, Kato & Dobyns *Hum Mol Genet* 2003, Kitamura et al. *Nat Genet* 2002), *ARX* 遺伝子内のポリアラニン反復配列が、大田原症候群ではウエスト症候群よりも長く伸長しており、ポリアラニン配列の伸長数と発症年齢および重症度が相関することをみだし、てんかんにおける年齢依存性の分子機構の一端をはじめて明らかにした。

しかし他の年齢依存性てんかん性脳症で原因が判明したのはイオンチャネル異常による乳児重症ミオクロニーてんかんなどごく一部であり、レンノックス・ガストー症候群などでは全く原因がわかっていない。ウエスト症候群や大田原症候群でも遺伝子に異常を認めない原因不明の症例が多く存在し、特異的な治療法も未開発である。*STXBPI* の変異が見つかった症例は現時点で5例と少ないために遺伝型と表現型との関連性が明確ではなく、遺伝相談等、具体的な臨床応用には不十分であった。

その一方、近年 DHPLC 法などによる多数検体の一括処理によるハイスループット変異スクリーニングや CGH もしくは SNPs を用いた全ゲノム領域のマイクロアレイ解析が可能になり、われわれも応用し有効性を確認してきた。また、*ARX* のポリアラニン伸長が、3塩基反復配列のポリグルタミン病と同様に細胞内凝集体を形成し、細胞死をきたすことが報告され (Nasrallah et al. *J Cell Biol* 2004)、さらにポリアラニン伸長変異の眼咽頭筋ジストロフィーモデルマウスの症状が、蛋白保護・膜安定作用を有し分子シャペロンとして作用する非還元二糖のトレハロースの内服投与により、改善することが報告された (Davies et al. *Hum Mol Genet* 2006)。

2. 研究の目的

大田原症候群とウエスト症候群に代表される年齢依存性てんかん性脳症の分子病態を明らかにし、治療法開発を行うために、以下の3点について目標を立てた。

(1) 既知遺伝子の遺伝型・表現型相関解析-大田原症候群とウエスト症候群の他、レンノックス・ガストー症候群や早期ミオクロニーて

んかんに関してもリサーチリソースを集積し、既知遺伝子と臨床症状との関連性を明らかにする。

(2) 新規原因遺伝子同定-既知遺伝子に変異がない原因不明例に対して、候補遺伝子スクリーニングとマイクロアレイ解析による全ゲノム領域のコピー数変異スクリーニングを行い、新規原因遺伝子を同定し、正確かつ効率的な遺伝相談に役立てる。

(3) 治療法開発-ポリアラニン配列伸長に伴うタンパク質構造異常による細胞障害に対して、トレハロースによる分子シャペロン治療を培養細胞で試み、臨床応用への可能性を調べる。

3. 研究の方法

対象：乳幼児期に発症し発達障害を伴う年齢依存性てんかん性脳症 (大田原症候群, 早期ミオクロニーてんかん, ウエスト症候群, レンノックス・ガストー症候群など。脳奇形や代謝異常症, 低酸素性虚血性脳症など因果関係が明白な基礎疾患を有する症例は除外)

方法：全国の研究協力施設から血液・臨床情報を遺伝子解析同意書とともに取得し、既知遺伝子については DHPLC 法, MLPA 法を用いた変異スクリーニングシステムにより、変異陽性例と陰性例に分類する。変異陽性例については臨床情報と照合し遺伝型・表現型の相関解析を行う。変異陰性例についてはバイオインフォマティクスに基づく候補遺伝子の変異スクリーニングと、全ゲノム領域のコピー数変異スクリーニングを行い、新規原因遺伝子を同定する。治療法開発のために、*ARX* 遺伝子の野生型とポリアラニン配列を伸長させた変異型の cDNA を COS 細胞に導入し、培養液にトレハロースを添加し、細胞内封入体の形成と細胞死に与える影響をトレハロース添加の有無で調べる。

4. 研究成果

2家系の家族性大田原症候群において、*ARX* 遺伝子の終末エクソンであるエクソン5にそれぞれ異なる2つのフレームシフト変異をみいだした。エクソン5以外の *ARX* 遺伝子のフレームシフト変異は、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) によって翻訳蛋白の産生されないナル変異であり、機能喪失によって重度な脳形成障害の原因となる。しかし、2家系の症例では脳形成障害を認めず、ポリアラニン配列伸長変異によるウエスト症候群や精神遅滞に表現型は類似していた。*ARX* は転写因子であり、その基本機能は転写抑制である。ポリアラニン配列の伸長変異は転写抑制を増強させる機能獲得変異であり、*XLAG* をきたす機能喪失変異とは異なる。2家系の変異は、その位置からともにエクソン5に存在するアリスタ

レスドメインの転写・翻訳を阻害すると考えられた。アリストレスドメインは、ARX 遺伝子の構造において、唯一転写亢進に作用する部位である。一般に終末エクソン内のフレームシフト変異は NMD を逃れることが知られており、本研究の 2 家系においてもアリストレスドメインを欠損した不完全な ARX 蛋白が産生されていることが推測される。アリストレスドメインの欠損によって、転写抑制が増強されることが予想され、ポリアラニン配列の伸長変異同様に、本研究で見いだされたエクソン 5 のフレームシフト変異も機能獲得変異と考えられる。

本研究によって、ARX 遺伝子の機能獲得変異という共通する病態が、大田原症候群とウエスト症候群の間に明らかにされ、臨床的に想定されていた両者の関連性が分子病態レベルで世界で初めて解明された。

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 Saitsu H, Osaka H, Sugiyama S, Kurosawa K, Mizuguchi T, Nishiyama K, Nishimura A, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Kato M, Matsumoto N: Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2). *Am J Med Genet A* 2011(in press) 査読有
doi: 10.1002/ajmg.a.34363.
- ② Saitsu H, Igarashi N, Kato M, Okada I, Kosho T, Shimokawa O, Sasaki Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Harada N, Hayasaka K, Matsumoto N: De novo 5q14.3 translocation 121.5-kb upstream of MEF2C in a patient with severe intellectual disability and early-onset epileptic encephalopathy. *Am J Med Genet A* 2011;155A(11):2879-2884 査読有
doi: 10.1002/ajmg.a.34289.
- ③ Kato M: Going BAC or oligo microarray to the well: a commentary on Clinical application of array-based comparative genomic hybridization by two-stage screening for 536 patients with mental retardation and multiple congenital anomalies. *J Hum Genet* 2011;56(2):104-105 査読無
- ④ Saitsu H, Hoshino H, Kato M, Nishiyama K, Okada I, Yoneda Y, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Kubota M, Hayasaka K, Matsumoto N: Paternal mosaicism of an STXBPI mutation in OS. *Clin Genet* 2011;80(5):484-8 査読有
doi: 10.1111/j.1399-0004.2010.01575.x.
- ⑤ Saitsu H, Tohyama J, Kumada T, Egawa K, Hamada K, Okada I, Mizuguchi T, Osaka H, Miyata R, Furukawa T, Haginoya K, Hoshino H, Goto T, Hachiya Y, Yamagata T, Saitoh S, Nagai T, Nishiyama K, Nishimura A, Miyake N, Komada M, Hayashi K, Hirai S, Ogata K, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N: Dominant-negative mutations in alpha-II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. *Am J Hum Genet* 2010;86(6):881-891 査読有
- ⑥ Saitsu H*, Kato M*, Okada I, Orii KE, Higuchi T, Hoshino H, Kubota M, Arai H, Tagawa T, Kimura S, Sudo A, Miyama S, Takami Y, Watanabe T, Nishimura A, Nishiyama K, Miyake N, Wada T, Osaka H, Kondo N, Hayasaka K, Matsumoto N: STXBPI mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. *Epilepsia* 2010;51(12):2397-2405 (*co-first author) 査読有
doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02728.x.
- ⑦ Kato M, Koyama N, Ohta M, Miura K, Hayasaka K: Frameshift mutations of the ARX gene in familial Ohtahara syndrome. *Epilepsia* 2010;51(9):1679-1684 査読有
doi:10.1111/j.1528-1167.2010.02559.x.
- ⑧ Kanazawa K, Kumada S, Kato M, Saitsu H, Kurihara E, Matsumoto N: Choreo-ballistic movements in a case carrying a missense mutation in syntaxin binding protein 1 gene. *Mov Disord* 2010;25(13):2265-2267 査読有
- ⑨ Caglayan AO, Gumus H, Kato M: Two female siblings with West syndrome: Familial idiopathic West syndrome with genetic susceptibility and variable phenotypic expression. *J Pediatr Neurosci* 2010;5(2):147-149 査読有
- ⑩ 加藤光広. 脳形成障害・てんかんのトピック—年齢依存性てんかん性脳症と介在ニューロン病—. *脳と発達* 42:333-338, 2010 査読無
- ⑪ Miyata R, Hayashi M, Miyai K, Akashi T, Kato M, Kohyama J: Analysis of the hypothalamus in a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG). *Brain Dev* 2009;31(6):456-460 査読有
- ⑫ 加藤光広: 大田原症候群. 小児疾患におけ

る臨床遺伝学の進歩 各論 I. 日本人が
発見に関わった疾患遺伝子 小児科
Vol. 50 No. 7 金原出版株式会社
894-898, 2009 査読無

〔学会発表〕(計 50 件)

- ① Kato M, Guerrini R: Early-onset epileptic encephalopathies (EOEE) with *ARX* abnormalities. Genetically determined early onset epileptic encephalopathies: from phenotype to diagnostic algorithms, Florence, Italy, August 26-27, 2011 (invited lecture for the workshop)
- ② Kato M, Scheffer IE: EOEE with *STXBPI* abnormalities. Genetically determined early onset epileptic encephalopathies: from phenotype to diagnostic algorithms, Florence, Italy, August 26-27, 2011 (invited lecture for the workshop)
- ③ Kato M: Analysis of a cohort of Japanese patients with EOEE and overview of treatment issues. Genetically determined early onset epileptic encephalopathies: from phenotype to diagnostic algorithms, Florence, Italy, August 26-27, 2011 (invited lecture for the workshop)
- ④ Kato M: *ARX* gene as a genetic marker for catastrophic neurological disorders and related conditions. The 10th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Dague, Korea; June 10-13, 2009 (invited lecture for the Hot Topic Symposium)
- ⑤ Kato M. (21 名 1 番目): Haploinsufficiency of *STXBPI* is an important cause for Ohtahara syndrome, but not for cryptogenic West syndrome. 8th Asian & Oceanian Epilepsy Congress, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, October 21-24, 2010
- ⑥ Tohyama J, Kato M, Matsumoto N. (7 名 6 番目): A new clinical epileptic syndrome caused by *SPTANI* mutation. 8th Asian & Oceanian Epilepsy Congress, Melbourne Convention and Exhibition Centre, Melbourne, Australia, October 21-24, 2010
- ⑦ Kato M, Koyama N, Ohta M, Miura K, Hayasaka K: Frameshift mutations in the terminal exon of *ARX* cause Ohtahara syndrome. American Epilepsy Society 63rd Annual Meeting, Boston, USA, December 4-8, 2009
- ⑧ Kato M. (15 名 1 番目): Clinical spectrum of Ohtahara syndrome caused by *STXBPI* mutation. The 28th International Epilepsy Congress, Budapest, Hungary; June 28- July

2, 2009

- ⑨ 加藤光広: 脳形成異常とてんかん. ランチオンセミナー. 第 45 回日本てんかん学会総会, 2011 年 10 月 6 日, 新潟市 朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター
- ⑩ 加藤光広: 脳形成障害の遺伝型と表現型. 第 52 回日本神経病理学会 シンポジウム「脳形成障害とオミックス」講演, 2011 年 6 月 3 日, 京都市 京都テルサ
- ⑪ 加藤光広: てんかんと遺伝子. 山形県小児科医会総会 特別講演, 2011 年 5 月 22 日, 山形市 ホテルキャッスル
- ⑫ 加藤光広: 介在ニューロンとシナプスからみたてんかん性脳症の病態. 第 37 回多摩てんかん懇話会 特別講演, 2010 年 12 月 11 日, 東京都立川市 アミューたちかわ (立川市民会館)
- ⑬ 加藤光広: 大脳皮質形成障害の新しい視点—*ARX* と介在ニューロン病. 第 41 回慶応ニューロサイエンス研究会 招待講演, 2010 年 11 月 6 日, 東京都新宿区 慶應大学医学部北里講堂
- ⑭ 加藤光広: 画像と分子病態からみた乳児期の難治てんかん. シンポジウム 2「てんかん症候群に対する多面的アプローチ」シンポジスト. 第 44 回日本てんかん学会総会, 2010 年 10 月 15 日, 岡山市 岡山コンベンションセンター
- ⑮ 加藤光広: 遺伝子からみた大田原症候群とウエスト症候群の病態. 第 23 回埼玉小児神経学懇話会 特別講演, 2010 年 2 月 27 日, さいたま市 大宮ソニックシティー
- ⑯ 加藤光広: てんかん性脳症の分子病態. 第 74 回大阪小児神経学懇話会 特別講演, 2010 年 2 月 25 日, 大阪市 ガーデンシティクラブ大阪オリオン
- ⑰ 加藤光広: 乳幼児期てんかん性脳症の分子遺伝学的発症機構. 第 10 回北海道小児神経症例検討会, 2010 年 1 月 23 日, 札幌市 KKR 札幌ホテル
- ⑱ 加藤光広: 脳形成障害・てんかんのトピックス—年齢依存性てんかん性脳症と介在ニューロン病—. 第 51 回日本小児神経学会総会 教育講演, 2009 年 5 月 29 日, 米子市 米子コンベンションセンター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 光広 (KATO MITSUHIRO)
山形大学・医学部附属病院・講師
研究者番号: 10292434

(2) 研究分担者

中村 和幸 (NAKAMURA KAZUYUKI)

鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：20436215

(3) 連携研究者

後藤 薫 (GOTO KAORU)
山形大学・医学部・教授
研究者番号：30234975

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)
横浜市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号：80325638