

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 6 月 1 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21591331

研究課題名（和文）

オリゴヌクレオチドアレイ解析を用いたけいれん性疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名（英文）

High resolution chromosomal microarray in febrile seizures.

研究代表者

中山純子（NAKAYAMA JUNKO）

茨城県立医療大学・付属病院・准教授

研究者番号：30433155

研究成果の概要（和文）：けいれん性疾患感受性遺伝子を同定するため、日本人熱性けいれん患者 40 名を対象としてオリゴヌクレオチド解析を行った。全染色体領域について解析を行い、134 カ所の欠失領域と 17 カ所の重複領域を検出した。これらのほとんどはすでに報告されている CNV（コピー数多型）であったが、遺伝子を含む 3 つの欠失領域と 4 つの重複領域が今回新たに同定された。これらのうち 8 番染色体 (8q13.3) と 5 番染色体 (5q14) の重複領域は既に報告のある熱性けいれん遺伝子座 (*FEBI*:8q13-q21, *FEBA*:5q14-q15) に含まれており、熱性けいれんの発症との関連についてさらなる研究が必要と考えられた。

研究成果の概要（英文）：To perform an extensive search for genomic rearrangements, molecular karyotyping was carried out with high-resolution oligonucleotide array technologies in 40 patients with familial febrile seizures. It showed 151 copy number alterations, 134 deleted regions and 17 duplicated regions. Although most of them are registered copy number variants (CNVs), three unregistered deleted regions and four unregistered duplicated regions contains several genes. Of these, two unregistered duplicated regions, 8p13.3 and 5q14, have been reported as the febrile seizure loci (*FEBI* and *FEBA*). Further investigation is required to determine whether these duplicated regions are related to the febrile seizures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2011 年度	600,000	180,000	780,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

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：けいれん性疾患、熱性けいれん、遺伝子、オリゴヌクレオチドアレイ、CNV

1. 研究開始当初の背景

けいれん性疾患は小児にみられる神経疾患のなかでもっとも頻度が高く、てんかんの

発症率は全人口の約1%である。一般的にてんかんよりも予後が良好と考えられている熱性けいれんの罹患率は、日本人では約8%と欧米と比較しても頻度が高い。家系解析や双生児研究などから、熱性けいれんの発症には遺伝素因が関与していることが古くから知られていた。熱性けいれんは、一般集団と比較して後にてんかんを発症する危険率が高く、長時間続くけいれん(けいれん重積)を引き起こすこともある。また熱性けいれんとてんかんのオーバーラップと考えられる Generalized epilepsy with febrile seizure plus (GEFS+) において、同一の遺伝子変異で両疾患が引き起こされることが報告されている。以上から熱性けいれんとてんかんの遺伝要因が一部共通である可能性があり、熱性けいれんの発症機序の解明がてんかんの発症機序の解明に結びつく可能性が示唆されている。

我々はこれまでに、59の日本人熱性けいれん家系を解析して2つの新しい熱性けいれん遺伝子座 (*FEB4*, *FEB6*) を報告した (Nakayama et al. 2000, 2004)。海外でも9つの熱性けいれん遺伝子座 (*FEB1*, *FEB2*, *FEB3*, *FEB5*, *FEB7*, *FEB8*, *FEB9*, *FEB10*, *FEB11*) が報告されているが、*FEB3* (*FEB3A: SCN1A*, *FEB3B: SCN9A*), *FEB8* (*GABRG2*), *FEB11* (*CPA6*) 以外の遺伝子座では責任遺伝子は同定されていない (Wallace et al., 1996; Johnson et al., 1993; Peiffer et al., 1999; Nabbout et al., 2002; Hedera et al., 2006; Audenaert et al., 2006; Nabbout et al., 2007; Dai et al., 2008; Salzmann et al., 2012)。また *SCN1A*, *SCN9A*, *GABRG2* についても同定されたのは少数の家系のみで、多くの熱性けいれん家系に共通した責任遺伝子は未だに同定されていない。

てんかんの責任遺伝子であるイオンチャンネルなどを候補遺伝子とした関連解析の報告もあるが、グループ間で結果に差があり一定の見解が得られていない。

2. 研究の目的

精力的なポジショナルクローニングが行われているにもかかわらず、ほとんどの熱性けいれん遺伝子座で責任遺伝子が同定されていない理由のひとつとして、通常行われて

いるダイレクトシーケンス法による遺伝子解析では、遺伝子の欠失や重複といった構造的な変異を同定することができないことが考えられる。遺伝子の重複や欠失はこれまでごく一部の先天異常の原因と考えられていたが、近年の遺伝学の進歩により、common disease を含むヒトの形質に広くかかわっている可能性が示唆されてきた。一部のてんかんでもチャンネル遺伝子の欠失や重複が報告されており、熱性けいれんを含めた他のけいれん性疾患の原因が遺伝子の欠失や重複といった構造異常である可能性が考えられる。これまでに熱性けいれんについて全ゲノム上の欠失や重複をスクリーニングした報告は、解像度の低い BAC-CGH アレイで少数を対象にした報告が1報あるのみで、多くの熱性けいれん患者を対象にして高解像度のオリゴヌクレオチドアレイ解析を行った報告はない。

そのため本研究では、日本人の熱性けいれん患者を対象として、オリゴヌクレオチドアレイによる全ゲノムスクリーニングを行い、ゲノムの欠失や重複といった構造的な変異を同定し、疾患との関わりを検討することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

血縁関係の無い家族性熱性けいれんの発端者40名。熱性けいれんの診断は NIH の診断基準である「Consensus Development Panel (1980)」に基づき、病歴カルテおよび家族からの聞き取りにより小児科医が行った。本研究は筑波大学倫理委員会で承認されたプロトコルに基づき両親と本人の同意 (インフォームドコンセント、学童期以下の子供については両親の承諾) を得て行った。

(2) 方法

患者末梢血から抽出した DNA を用いて、Infinium BeadChip Human610-Quad DNA Analysis Kit または HumanCytoSNP-12v2.1 DNA Analysis BeadChip Kit (ともに Illumina 社) を用いてアレイ解析を行った。Infinium BeadChip Human610-Quad DNA Analysis Kit では全ゲノム上に平均2.7kb感覚で存在する55万個の SNP (single nucleotide

polymorphism: 一塩基多型)と6万個のCNV(copy number variation: コピー数多型)の遺伝子型を、HumanCytoSNP-12v2. DNA Analysis BeadChip Kit では全ゲノム上に平均9.7kb感覚で存在する30万個のSNPの遺伝子型を決定した。遺伝子型決定にはIllumina BeadArray Reader を用いた。データはIllumina BeadStudio Software またはIllumina GenomeStudio Software で解析を行い、ゲノム上の欠失や重複を検出した。

遺伝子の欠失や重複が検出された場合には、ヒトゲノム構造多型コンソーシアム(DGV: Database of Genomic Variants, <http://projects.tcag.ca/variation>) や The UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) などのデータベースを用いて、すでに報告されている一般集団でもみられるような多型であるかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) 既知の熱性けいれん遺伝子座における構造変異

これまでに報告されている11の熱性けいれん遺伝子座のうち、5つの遺伝子座に4カ所の欠失領域(8q13.3, 6q21.1, 21q22.11, 3q26.31)と2カ所の重複領域(8q13.3, 5q14)が同定された。

4つの欠失領域のうち2領域(6q24.1, 21q22.11)は既知の遺伝子が存在しない領域であった。残りの2領域(8q13.3, 3q26.31)は遺伝子のイントロン部分であったが、すでに報告のあるCNVであった(表1A)。

2つの重複領域はこれまでに報告のない構造変異で、既知の遺伝子が含まれている領域であった(表1B)。これらの中にはチャンネル遺伝子や発作性の神経疾患の原因と考えられている遺伝子もある。今後はさらに対象患者数を増やして同構造変異の有無を確認するとともに、熱性けいれん発症との関連の有無を検討していく予定である。

また熱性けいれんは頻度の高い多因子疾患であるため、今回同定されたすでに報告のあるCNVが発症に関わっている可能性も否定できない。そのため、これらのCNVについても伝達不平衡テスト(transmission

disequilibrium test: TDT)などを用いた関連解析により熱性けいれんとの関連を検討していく予定である。

表1 熱性けいれん遺伝子座における構造変異

A. 欠失領域

遺伝子座	染色体領域	大きさ	含まれる遺伝子	DGV 番号
<i>FEB1</i>	8q13.3	2kb	<i>EYA1</i>	Variation_10259
<i>FEB5</i>	6q24.1	40kb	なし	Variation_99730
<i>FEB7</i>	21q22.11	6kb	なし	Variation_73627
<i>FEB10</i>	3q26.31	9kb	<i>NAALADL2</i>	Variation_1653

B. 重複領域

遺伝子座	染色体領域	大きさ	含まれる遺伝子	DGV 番号
<i>FEB1</i>	8q13.3	1.3Mb	<i>MSC, TRPA1, KCNB2</i>	なし
<i>FEB4</i>	5q14	800kb	<i>COX7C</i>	なし

(2) 熱性けいれん遺伝子座以外の全染色体領域における構造変異

残りの全染色体領域において、130カ所の欠失領域と15カ所の重複領域が検出された。

① 欠失領域

130カ所の欠失領域のうち、86領域は既知の遺伝子が存在しない領域であったが、44領域には遺伝子が存在していた。DGV データベース検索および UCSC データベース検索により、44領域のうち41領域はこれまでに報告されているCNVであったが、3領域はこれまでに報告のない構造変異であることが確認された(表2A)。これらの新たに同定された欠失領域に存在する遺伝子には、既知の症候群や難聴、ミオパチーの原因として知られているものもあったが、けいれんとの関係については不明であった。

② 重複領域

15カ所の重複領域のうち、7領域は既知の遺伝子が存在しない領域であったが、8領域には遺伝子が存在していた。データベース検索により、遺伝子が存在する8領域のうち6領域はこれまでに報告されているCNVであったが、2領域はこれまでに報告のない構造変異であることが確認された(表2B)。これらの新たに同定された重複領域に存在する遺伝子には、症候性てんかんの原因として知ら

れているものもあったが、熱性けいれんとの関係については不明であった。

表2 熱性けいれん遺伝子座以外に同定されたこれまでに報告のない構造変異

A. 欠失領域

染色体領域	大きさ	含まれる遺伝子
2q31.1	3kb	<i>BBS5</i>
12q21.31	410kb	<i>PTPRQ, MYF6, MYF5, LIN7A</i>
18q21.31	1.6kb	<i>NEDD4L</i>

B. 重複領域

染色体領域	大きさ	含まれる遺伝子
8p23.3	330kb	<i>DLGAP2, CLN8</i>
16q23.2	625kb	<i>DYNLRB2, CDYL2</i>

今後はさらに対象患者数を増やしてこれらの構造変異の有無を確認するとともに、関連解析などを用いてこれらの構造変異と熱性けいれんとの関連を検討していく予定である。

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 6 件)

①Lee HY, Nakayama J, Xu Y, Fan X, Karouani M, Shen Y, Pothos EN, Hess EJ, Fu YH, Edwards RH, Ptacek LJ. Dopamine dysregulation in a mouse model of paroxysmal nonkinesigenic dyskinesia. *J Clin Invest* (2012) 122:507-518. 査読有

②Tanaka R, Iwasaki N, Hayashi M, Nakayama J, Ohto T, Takahashi M, Numano T, Homma K, Hamano K, Sumazaki R. Abnormal brain MRI signal in 18q-syndrome not due to dysmyelination. *Brain Dev* (2012) 34:234-237. 査読有

③中山純子、岩崎信明. 熱性けいれんと遺伝子異常. *小児科診療* (2011) 74:879-883. 査読無

④Kamo M, Ohyama M, Kosaki K, Amagai M, Ebihara T, Nakayama J, Ishiko A. Ichthyosis follicularis, alopecia, and photophobia syndrome: a case report and a

pathological insight into pilosebaceous anomaly. *Am J Dermatopathol* (2011) 33:403-406. 査読有

⑤Nakayama J, Iwasaki N, Shin K, Sato H, Kamo M, Ohyama M, Noguchi E, Arinami T. A Japanese case of ichthyosis follicularis with atrichia and photophobia syndrome with an MBTPS2 mutation. *J Hum Genet* (2011) 56:250-252. 査読有

⑥Nakayama J. Progress in searching for the febrile seizure susceptibility genes. *Brain & Dev* (2009) 31:359-365. 査読有

[学会発表] (計 2 件)

①中山純子. Seizures in IFAP syndrome: a case report and review of the literature. 第14回乳幼児けいれん研究会. 2012年2月18日、東京

②中山純子. 小児けいれん性疾患の遺伝学的背景-熱性けいれんを中心に-. 日本小児科学会茨城地方会. 2010年2月21日、つくば(茨城)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 純子 (NAKAYAMA JUNKO)
茨城県立医療大学・付属病院・准教授
研究者番号: 30433155

(2) 研究分担者

有波 忠雄 (ARINAMI TADAO)
筑波大学・人間総合科学研究科・教授
研究者番号: 10212648

岩崎 信明 (IWASAKI NOBUAKI)
茨城県立医療大学・保健医療学部・教授
研究者番号：70251006