

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 5 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2010～2012

課題番号：22689011

研究課題名（和文） 乳児期発症の年齢依存性てんかん性脳症における責任遺伝子の単離

研究課題名（英文） Identification of responsive genes for age-dependent infantile epileptic encephalopathy

研究代表者

才津 浩智（SAITSU HIROTOMO）

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：40402838

研究成果の概要（和文）：ゲノムマイクロアレイによる染色体コピー数異常の同定から、髄鞘化遅延と脳の広範な萎縮を伴うウエスト症候群の新規原因遺伝子 SPTAN1 の同定に成功した。その他、2 例の均衡型転座合併例の切断点を解析し、SRGAP2 と MEF2C 遺伝子異常がてんかん性脳症に関与していることを明らかとした。また、次世代シーケンサーを用いたエクソーム解析をいち早く導入し、大田原症候群の新規原因遺伝子 KCNQ2 と CASK を同定した。

研究成果の概要（英文）：We demonstrated that mutations in SPTAN1 cause West syndrome with myelination delay and atrophy of brain thought identification of a de novo microdeletion in a patient. We also clarified breakpoints of two balanced translocations, demonstrating involvement of abnormalities of SRGAP2 and MEF2C in epileptic encephalopathy. In addition, by whole exome sequencing, we identified mutations in KCNQ2 and CASK in patients with Ohtahara syndrome.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,200,000	2,460,000	10,660,000
2011年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2012年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

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：ゲノムマイクロアレイ、次世代シーケンサー、エクソーム解析、大田原症候群、ウエスト症候群、早期発症てんかん性脳症

1. 研究開始当初の背景

乳児期に発症する早期発症てんかん性脳症（年齢依存性てんかん性脳症）には、大田原症候群、ウエスト症候群（點頭てんかん）がある。大田原症候群の多くは新生児期に発症し、てんかん発作に加えて重度の精神運動発達遅滞と、脳波上顕著なサブプレッション-バーストを認めるのが特徴である。ウエスト

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、明確な原因がない特発性のものがあり遺伝的な素因が存在する。大田原症候群の多くはウエスト症候群に移行することから、両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。これまでに、X 染色体上に位置する 2 つの遺伝子 ARX, CDKL5 の変異と、我々が同定した STXBP1 遺伝子変異が、大田原症候群あるいはウエスト症候群の原因であることが知られていたが、これらの変異が見つからない症例も多く残されていたため、新たな責任遺伝子の同定が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究では、早期発症てんかん性脳症の新規原因遺伝子を同定することを目的とした。また、得られた新規原因遺伝子および既知の原因遺伝子が引き起こす臨床表現型についても詳細な検討を行った。

3. 研究の方法

(1) ゲノムマイクロアレイを用いた、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

(Affymetrix Genome-Wide Human SNP Array 6.0 や Cytogenetics 2.7M Array) を用いた染色体構造異常の検査を、乳児期発症の年齢依存性てんかん性脳症患者で行い、疾患遺伝子同定の手掛かりになる染色体構造異常を検出する。

(2) エクソーム解析による遺伝子変異の網羅的な解析

当初は、High resolution Melt 解析を用いた、候補遺伝子の変異スクリーニングを行っていたが、研究期間中により網羅的・効率的な変異解析系である、エクソーム解析が登場した。エクソーム解析は、ハイブリダイゼーションの技術を用い、ゲノム上のエクソン領域を選択的にキャプチャーし、高効率に濃縮してから次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行うことで、遺伝子をコードする領域の変異を網羅的かつ効率的に解析する手法である。そこで、エクソーム解析を解析に取り入れて大田原症候群患者における遺伝子変異を網羅的に調べた。

4. 研究成果

(1) 早期発症てんかん性脳症に合併する染色体構造異常の検出と新規原因遺伝子の同定

2010~2012 年度にかけて、早期発症てんかん性脳症計 148 症例を、アフィメトリクス社のゲノムマイクロアレイを用いて解析し、正常検体のコピー数多型データベースに登録の無いコピー数異常を 23 症例で同定した。

うち、7 症例においてご両親には認められない de novo の変化であることを確認した。ほ

とんどが既知のてんかん原因遺伝子、あるいはてんかんと関連が既に明らかになっている構造異常であったが、1 例の染色体欠失内にある遺伝子の変異スクリーニングから、髄鞘化遅延と脳の広範な萎縮を伴うウエスト症候群患者において de novo の SPTAN1 変異を同定した (Saito et al., Am J Hum Genet 2010)。SPTAN1 遺伝子は細胞構造の維持と膜タンパク質の局在化に関与することが知られている α -II スペクトリンをコードしている。我々は、患者で見つかった変異を有する α -II スペクトリンと β -II スペクトリンとのヘテロダイマーは構造的に不安定で、患者の細胞内においても、あるいは変異 α -II スペクトリンを一過性発現させたマウス神経細胞においても凝集していることを明らかにした。更に、変異 α -II スペクトリンを発現させた神経細胞では、軸索起始部におけるナトリウムチャネルの集積が障害されていることを明らかにした。本発見は、髄鞘形成遅延を伴う West 症候群の原因遺伝子を明らかにしたばかりでなく、神経細胞における軸索起始部の異常が West 症候群の発症に関与している可能性を示唆している。更に、これまでに 4 例の SPTAN1 新規変異症例が同定された。2 例で見つかった変異については、マウス神経細胞での発現実験を行い、 α/β スペクトリンヘテロダイマーの凝集を引き起こすことが観察された。また、変異の種類も 1 例を除いてインフレームの欠失あるいは挿入であり、我々の報告した 2 例と併せて考えると、ドミナントネガティブ効果を持つ変異によって、髄鞘化遅延と脳の広範な形成不全（とくに小脳・橋の低形成）が引き起こされると考えられた (Hamdan and Saito et al., Eur J Hum Genet 2011; Writzl et al., Epilepsia 2012)。

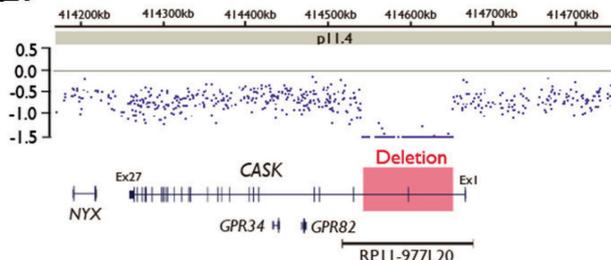
その他、de novo の均衡型転座の 2 例について、塩基レベルでの詳細な切断点解析を行った。1 例は、軸索ガイダンスに働く SRGAP2 遺伝子の断裂であり、患児のてんかんの原因となっていることが推測された (Saito et al., Am J Med Genet 2011)、もう 1 例は既知のてんかん原因遺伝子である MEF2C の上流 121.5-kb に切断点があり、MEF2C 発現調節の異常をもたらすことでてんかんの原因となったことが示唆された (Saito et al., Am J Med Genet 2011)。

(2) 大田原症候群患者のエクソーム解析による新規原因遺伝子の同定

2012 年度に大田原症候群の 12 症例に対してエクソーム解析を行った。患者に共通して変異を有する遺伝子を抽出したところ、その変異が予後良好の良性家族性新生児痙攣を引き起こすことが知られていた KCNQ2 のミスセ

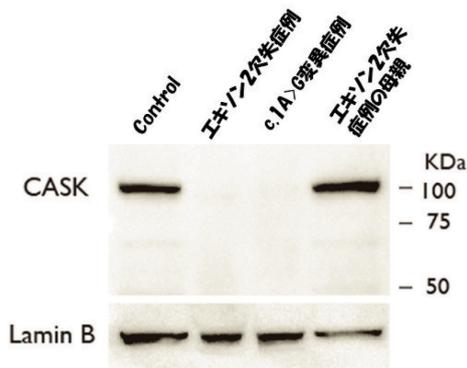
ンス変異を3症例に共通して認めた。その後のご両親の解析により、3つの変異は de novo 変異であることが明らかとなり、KCNQ2 変異が、最重症の難治性てんかんである太田原症候群を引き起こすことが明らかとなった (Saitzu et al., Ann Neurol 2012)。

図1



その他、X染色体上に位置する CASK 遺伝子の c.1A>G の de novo 変異を、別の大田原症候群の男児例で同定した。前述のゲノマイクロアレイによるコピー数の検討から、CASK 遺伝子のエクソン 2 を含んだ 111-Kb の欠失を、別の男児の太田原症候群患者で同定した (図 1)。CASK のエクソン 2 の欠失および変異の 2 名の患者ともに、リンパ芽球を用いたウエスタンブロット解析で CASK タンパク質の発現を認めず (図 2)、脳波上はサブ

図2



セッション-バーストパターンを呈し、著明な小脳低形成と先天奇形が認められたため、CASK のヌル変異が、男児において、小脳低形成を伴う太田原症候群を引き起こすことが明らかとなった (Saitzu et al., Epilepsia 2012)。

これらの大田原症候群の新規原因遺伝子 KCNQ2、CASK 変異は、我々が報告した STXBP1 とともに、新規検体でスクリーニングを行い、それぞれ 12 症例と 1 症例で変異を認めた。KCNQ2 変異の 12 例の臨床症状から、KCNQ2 変異は新生児期から乳児期にかけて発症するてんかんの主要な原因の一つであり、ほとんどの症例が大田原症候群と診断されることが明らかとなった (Kato et al., Epilepsia 2013)。

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 17 件)

*corresponding author(s)

1. Kato M, …*Saitzu H. (著者 27 名中最後) Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. Epilepsia (査読あり) in press DOI: 10.1111/epi.12200.
2. Yoneda Y, Haginoya K, …*Saitzu H (著者 35 名中最後) Phenotypic spectrum of COL4A1 mutations: porencephaly to schizencephaly. Ann Neurol. (査読あり) 73(1):48-57, 2013 DOI: 10.1002/ana.23736.
3. *Saitzu H et al., (著者 11 名中 1 番目) Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. Ann Neurol. (査読あり) 72(2):298-300, 2012 DOI: 10.1002/ana.23620.
4. *Saitzu H et al., (著者 13 名中 1 番目) CASK aberrations in male patients with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. Epilepsia (査読あり) 53(8):1441-1449, 2012 DOI: 10.1111/j.1528-1167.2012.03548.x.
5. Nonoda Y, …*Saitzu H. (著者 8 名中最後) Progressive diffuse brain atrophy in West syndrome with marked hypomyelination due to SPTAN1 gene mutation. Brain Dev (査読あり) 31. 2012 DOI: 10.1016/j.braindev.2012.05.002.
6. Writzl K, …*Saitzu H. (著者 9 名中最後) Early onset West syndrome with severe hypomyelination and coloboma-like optic discs in a girl with SPTAN1 mutation. Epilepsia (査読あり) 53(6):e106-10, 2012 DOI: 10.1111/j.1528-1167.2012.03437.x.
7. Hamdan F, Saitzu H (Co-first Author) et al., (著者 11 名中 2 番目) Identification of a novel in-frame de novo mutation in SPTAN1 in intellectual disability and pontocerebellar atrophy. Eur J Hum Genet (査読あり) 20(7):796-800, 2012 DOI: 10.1038/ejhg.2011.271.
8. *Saitzu H et al., (著者 14 名中 1 番目) Association of genomic deletions in the STXBP1 gene with Ohtahara syndrome. Clinical Genetics (査読あり) 81(4):399-402, 2012 DOI: 10.1111/j.1399-0004.2011.01733.x.
9. Yoneda Y, …*Saitzu H. (著者 12 名中最後) De novo and inherited mutations in

- COL4A2, encoding the type IV collagen $\alpha 2$ chain cause porencephaly. Am J Hum Genet (査読あり) 13;90(1):86-90, 2012 DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.016.
10. *Saitsu H et al., (著者 7 名中 1 番目) A girl with early-onset epileptic encephalopathy associated with microdeletion involving CDKL5. Brain Dev (査読あり) 34(5):364-7, 2012 DOI: 10.1016/j.braindev.2011.07.004.
 11. *Saitsu H et al., (著者 13 名中 1 番目) Early infantile epileptic encephalopathy associated with the disrupted gene encoding Slit-Robo Rho GTPase activating protein 2 (SRGAP2). 158A(1):199-205. Am J Med Genet A (査読あり) DOI: 10.1002/ajmg.a.34363.
 12. *Saitsu H et al., (著者 16 名中 1 番目) Mutations in POLR3A and POLR3B Encoding RNA Polymerase III Subunits Cause an Autosomal-Recessive Hypomyelinating Leukoencephalopathy. 89(5): 644-51 Am J Hum Genet (査読あり) DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.10.003.
 13. *Saitsu H et al., (著者 14 名中 1 番目) 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 (査読あり) 155A(11):2879-84, 2011 DOI: 10.1002/ajmg.a.34289.
 14. Okada I, Hamanoue H, ...*Saitsu H. (著者 28 名中最後) SMOC1 is essential for ocular and limb development in humans and mice. Am J Hum Genet (査読あり) 7;88(1):30-41, 2011 DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.11.012.
 15. *Saitsu H et al., (著者 12 名中 1 番目) Paternal mosaicism of a STXBP1 mutation in Ohtahara syndrome. Clinical Genetics (査読あり) 80(5):484-488, 2011 DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01575.x.
 16. *Saitsu H et al., (著者 22 名中 1 番目) STXBP1 mutations in early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern. Epilepsia (査読あり) 51(12):2397-2405, 2010 DOI: 10.1111/j.1528-1167.2010.02728.x
 17. *Saitsu H et al., (著者 27 名中 1 番目) Dominant negative mutations in α -II spectrin cause West syndrome with severe cerebral hypomyelination, spastic quadriplegia, and developmental delay. Am J Hum Genet (査読あり) 11;86(6):881-91. 2010 DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.04.013.

[学会発表] (計 9 件)

1. Saitsu H. CASK aberrations in males with Ohtahara syndrome and cerebellar hypoplasia. 62th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics, 2012 年 11 月 9 日 Moscone Center (San Francisco, USA)
2. 才津浩智. CASK の null 変異は小脳低形成を伴う大田原症候群をひき起こす。人類遺伝学会第 57 回大会 2012 年 10 月 25 日 京王プラザホテル (東京都)
3. 才津浩智. De novo and inherited mutations in COL4A2, encoding type IV collagen $\alpha 2$ chain cause porencephaly 第 52 回日本先天異常学会学術集会 2012 年 07 月 07 日東京女子医科大学弥生記念講堂 (東京都)
4. 才津浩智. Mutations in POLR3A and POLR3B encoding RNA polymerase III subunits cause an hypomyelinating leukoencephalopathy 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2012 年 3 月 26 日山梨大学 (山梨県)
5. 才津浩智. α -II スペクトリンのドミナントネガティブ変異が髄鞘化障害を伴う West 症候群を引き起こす。第 51 回日本先天異常学会学術集会 2011 年 7 月 22 日シェーンバッハ砂防 (東京都)
6. 才津浩智. シンポジウム「染色体異常をめぐってーダウン症の病態解明ー」ダウン症候群の分子遺伝学的解析 2011 年 7 月 23 日シェーンバッハ砂防 (東京都)
7. 才津浩智. 年齢依存性てんかん性脳症の分子遺伝学的研究 第 55 回日本人類遺伝学会 (招待講演) 2010 年 10 月 29 日 大宮ソニックシティ (埼玉県)
8. 才津浩智. 新規 CNV 探索によるてんかん原因遺伝子の同定 第 18 回精神行動遺伝医学会 (招待講演) 2010 年 9 月 18 日 東北大学 (宮城県)
9. 才津浩智. 先天異常疾患のゲノム遺伝子解析 第 37 回日本マス・スクリーニング学会 (招待講演) ワークピア横浜 (神奈川県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: び慢性大脳白質形成不全症患者又は保因者の検出方法

発明者: 松本直通、才津浩智

権利者: 横浜市立大学

種類: 特許権

番号: 特願 2011-226488

出願年月日: 2011 年 10 月 14 日

国内外の別：国内

名称：孔脳症又は脳出血のリスクを予測する
方法

発明者：松本直通、才津浩智

権利者：横浜市立大学

種類：特許権

番号：特願 2011-247457

出願年月日：2011年11月11日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

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・准教授

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：