

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791039

研究課題名(和文) けいれん性疾患におけるSCN1A遺伝子非翻訳領域の網羅的変異解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of SCN1A noncoding region for epileptic disorders

研究代表者

中山 東城 (NAKAYAMA, Tojo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：40613302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：SCN1A非翻訳領域の変異、染色体微細構造異常による変異を検索した。SCN1A遺伝子前後の非翻訳領域をターゲットとしたプローブを作成し、SCN1A変異解析で変異を認めないDravet症候群、SCN1A関連性けいれん性疾患237症例に対し解析を施行した。その結果、SCN1A翻訳全領域を巻き込む体細胞モザイク欠失を2例同定した。アレイCGH、FISHでもモザイク欠失が確認された。7例において、SCN1A翻訳領域を含むヘテロ欠失が認められた。また、SCN1A非翻訳領域欠失の疑いのある症例が1例認められた。SCN1A翻訳領域を巻き込む体細胞モザイク欠失は、本研究で初めて明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the noncoding regions of the SCN1A gene for 237 patients with Dravet syndrome and its related disorders who did not show any SCN1A mutations by sequence analysis of all coding exons and exon-intron boundaries. We invented Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) assays with probes for the 5'non-coding exons, their upstream and downstream regions of SCN1A. Among 237 patients, we found two patients with mosaic microdeletion removing the entire coding exons and boundary regions. We validated the mosaicism by subsequent array CGH and FISH. We also identified seven patients with deletions involving the coding region. One patient Dravet syndrome also showed a possible deletion in the 5'noncoding region which is detected by MLPA only. This study provides the first case of mosaic microdeletion involving the SCN1A region, and indicates the critical involvement of this mosaic microdeletion in the molecular pathology of Dravet syndrome.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学

キーワード：SCN1A遺伝子 Dravet症候群 非翻訳領域 微小欠失 体細胞モザイク

1. 研究背景

Dravet 症候群 (乳児重症ミオクロニーてんかん) は、熱誘発性のけいれん発作とミオクロニー発作、欠神発作を特徴とする小児難治性てんかんのひとつであり、精神運動発達遅滞を含む発達障害がほぼ全例に認められる。その約 70 ~ 80% に脳神経細胞の電位依存型 Na チャネルをコードする *SCN1A* 遺伝子のヘテロ変異が認められる。*SCN1A* 変異は翻訳領域の塩基配列の点変異等であり、変異がチャネルの機能不全を引き起こすことによるハプロ不全が病因と考えられているが、変異を認めない残り約 20 ~ 30% の Dravet 症候群の遺伝学的病因はこれまで十分には解明されていなかった。

2. 研究の方法

本研究では、従来の Dravet 症候群に加え、疾患予後のよい *SCN1A* 関連性けいれん性疾患を対象に、*SCN1A* 非翻訳領域の変異を網羅的に検索する。*SCN1A* 非翻訳領域変異と臨床重症度との関連、病因となり得る必要かつ最少の転写制御領域を明らかにする。また近年、染色体微細構造異常や体細胞モザイクに伴う疾患発症は、従来考えられていた以上に単一遺伝子疾患を含む、種々の疾患の原因となっていることが明らかとなっている (Pham et al., Eur J Hum Genet 2014)。Dravet 症候群においても翻訳領域の微小欠失・重複が報告されているが (Marini et al., Epilepsia 2009)、その実態はまだ十分には把握されていない。本研究では、染色体微細構造異常による Dravet 症候群発症についても合わせて研究を行った。

3. 研究方法

今回の研究における最重要課題のひとつは、十分な数の解析対象症例の確保である。本研究の症例収集に当たっては、福岡大学小児科の廣瀬伸一教授の研究協力を仰ぎ、福

岡大学に収集されている、*SCN1A* 翻訳領域および、*PCDH19* 遺伝子変異解析で変異を認めない Dravet 症候群症例を研究対象とした。尚、本研究は、福岡大学附属病院倫理委員会、及び該当医療機関の倫理委員会の承認を得て行った。

Dravet 症候群では *SCN1A* 遺伝子前後の非翻訳領域が *SCN1A* の転写翻訳に関わっていることが先行研究で明らかになっていたことから (Nakayama et al., Hum Genet 2010)、*SCN1A* 遺伝子前後の非翻訳領域をターゲットとしたプローブを作成し、収集した症例に対し MLPA 法による非翻訳領域の微小欠失・重複解析を施行した。欠失・重複を認めた、もしくは疑われた症例に対しては変異の確認および領域長を決定するため、アレイ CGH 解析 (Agilent 180K)、*SCN1A* 領域の BAC クローンをプローブとする FISH 解析を施行した。

4. 研究結果

研究期間に *SCN1A* および、*PCDH19* 遺伝子変異解析で変異を認めない Dravet 症候群・*SCN1A* 関連性けいれん性疾患 237 症例について、MLPA 法を用いた解析を施行した。

その結果、7 症例において、*SCN1A* 翻訳領域を含むヘテロ欠失が認められた。これらの症例は *SCN1A* 翻訳領域をターゲットとした既成の MLPA プローブを用いても理論上は検出可能であったが、MLPA プローブ 1 か所のみ欠失や結果の再現性の問題から、ヘテロ欠失かどうか保留となっていた症例も含まれていた (表)。

表: 解析結果

結果	ほぼ確実	可能性あり
翻訳領域を含む欠失	7	0
非翻訳領域のみの欠失	0	1
モザイク欠失	3	3
波形不良	7	0
異常なし	216	0
合計	233	4

ほぼ確実 : 2つ以上の連続するプローブで再現性を持って欠失を確認
可能性あり: 1つのプローブのみの欠失、もしくは解析結果にばらつきあり

また、*SCN1A* 翻訳全領域を巻き込む体細胞モザイク欠失と考えられる症例が、複数例存在することが判明した。体細胞モザイクが疑われた症例は、東京女子医大の山本俊至先生との共同研究としてアレイ CGH による体細胞モザイク欠失の検証を行った。その結果、2 例についてアレイ CGH においても *SCN1A* 翻訳領域を含むモザイク欠失が認められた。この 2 症例については、さらに患者リンパ球を採取し、FISH によるモザイク欠失の確認を行った。一方、*SCN1A* 非翻訳領域のみに欠失を認める *SCN1A* 症例については、237 例中 1 例疑い症例が認められたが、MLPA 欠失プローブが 1 か所のみであったことから、真の欠失かどうかを確認するため、現在直接シーケンス法により変異確認を行っている。

広範囲のヘテロ欠失が認められた症例やモザイク欠失が認められた症例はいずれも Dravet 症候群の診断基準を満たしており、疾患の重症度と変異型には明らかな相関関係は見られなかった。

Dravet 症候群における *SCN1A* 領域を巻き込むヘテロ欠失・重複の頻度は、変異が認められていない Dravet 症候群の約 12%、Dravet 症候群全体の 2~3% 程度と推定されている (Marini et al., *Epilepsia* 2009)。本研究では、解析対象症例 237 例中、7 例 (3%) にヘテロ欠失を認めたと、これらの 7 名はいわゆる通常の欠失・重複解析が終了した症例であった。このことは、MLPA 等の欠失・重複解析では、技術的な問題等から、一種類の解析手法では確実な同定が難しい症例が存在することを意味している。また、複数例に認められた *SCN1A* 翻訳領域を巻き込む体細胞モザイク欠失は、これまで未報告であり、本研究で初めて明らかとなった。従来の MLPA 法で正常コピー数に該当するピークをモザイク欠失かどうか判断するためには、複数の手法での検証が必要不可欠である。また、今回解析した

DNA は白血球由来であるが、白血球中の DNA のモザイク率と、脳組織でのモザイク率は異なり得ることから、脳組織での体細胞モザイクの存在はあくまで推測の域を出ない。ただ一方で、複数症例で同様のことが見られることは、モザイク率は異なり得るものの、体細胞モザイク欠失が認められた症例の脳組織においても、疾患を発症し得る体細胞モザイク欠失があることを強く示唆している。今後、これらの結果の妥当性を検証し、Dravet 症候群の新たな疾患発症メカニズムとして論文発表する準備を進めている。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 2 件)

1. **Nakayama T**, Saitsu H, Endo W, Kikuchi A, Uematsu M, Haginoya K, Hino-Fukuyo N, Kobayashi T, Iwasaki M, Tominaga T, Kure S, Matsumoto N. *RBPJ* is disrupted in a case of proximal 4p deletion syndrome with epilepsy. *Brain Dev.* 2013 Aug 16. pii: S0387-7604(13)00230-1 [Epub ahead of print] (査読あり)

2. **中山東城**、福與なおみ、植松貢、呉繁夫、総説：てんかん症候群の疾患遺伝子 up to date、**日本小児科学会雑誌**、116 巻 9 号、pp1327-1336、2012。(査読なし)

(学会発表) (計 2 件)

1. **中山東城**、才津浩智、遠藤若葉、菊池敦生、植松貢、萩野谷和裕、福與なおみ、小林朋子、岩崎真樹、富永悌二、呉繁夫、松本直通. *RBPJ* 遺伝子異常を認めたてんかんを伴う近位 4p 欠失症候群の一例. **第 57 回日本人類遺伝学会**. 仙台. 10.22.2013.

2. **中山東城**. てんかんの遺伝学 up to date ~ 原因遺伝子が近年同定されたてんかん症候群 ~. 特別招待講演: **第 7 回日本てんかん学会関東甲信越地方会**. 東京. 6.15.2013.

(図書)(計1件)

1. **中山東城**、最近定義された遺伝子異常によるてんかん症候群、日本てんかん学会編、**てんかん専門医ガイドブック**、診断と治療社、初版(総ページ:320), pp267-268、2014.

6. 研究組織

研究代表者

中山 東城(NAKAYAMA, Tojo)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号:40613302

研究協力者

呉 繁夫(KURE, Shigeo)

東北大学・医学系研究科・教授

研究者番号:10205221

廣瀬 伸一(HIROSE, Shinichi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号:60248515

山本 俊至(YAMAMOTO, Toshiyuki)

東京女子医科大学・医学部・教授

研究者番号:20252851