

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293085

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子異常検出系を駆使した乳児期発症てんかん性脳症の遺伝学的解明

研究課題名(英文) Elucidation for genetic basis of infantile epileptic encephalopathy by using comprehensive genetic analysis

研究代表者

才津 浩智 (Saito, Hirotomo)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：40402838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：乳児期発症のてんかん性脳症症例に対して35あるいは50遺伝子をターゲットにしたターゲットエクソンキャプチャー(104症例)および全遺伝子をターゲットにした全エクソーム解析(623例)を施行し、乳児期発症てんかん性脳症の遺伝的要因の解明を行った。その結果、GNAO1、SLC35A2、PIGA、COG2、KCNB1の新たな責任遺伝子の同定に成功した。また、我々の研究成果を含め、世界的なてんかん性脳症の遺伝子解析の進展によって、約45%の患者で遺伝子診断が可能であった。

研究成果の概要(英文)：Target capture analysis against 35 or 50 epilepsy genes and whole exome sequencing was performed in 104 and 623 cases with infantile epileptic encephalopathy, respectively. We identified several new disease causing genes (GNAO1, SLC35A2, PIGA, COG2, KCNB1). With our analysis along with world-wide progress of genetics of infantile epileptic encephalopathy, approximately 45% of cases could be genetically diagnosed.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：遺伝子変異 てんかん性脳症 エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

乳児期発症のてんかん性脳症には、大田原症候群や West 症候群が含まれ、てんかん発作に加えて精神運動発達遅滞を呈する疾患群である。我々が報告した *STXBP1*, *SPTAN1*, *CASK*, *KCNQ2* を含めて 6 つの責任遺伝子しか同定されていない。また、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、てんかん性脳症における責任遺伝子変異の寄与度の解明と新たな責任遺伝子単離を行うことを目的とした。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) ターゲットエクソンキャプチャーを用いた網羅的遺伝子変異およびコピー数解析

Agilent 社の SureSelect カスタムキャプチャーデザインを用いて、35 あるいは 50 遺伝子に対する、ターゲットエクソンキャプチャーを用いた遺伝子変異およびコピー数解析を行った。

(2) 全エクソーム解析による遺伝子変異の網羅的な解析

ゲノム上の 9 割以上の遺伝子コード領域に関して変異解析が可能な全エクソーム解析を用いて、網羅的遺伝子変異およびコピー数解析を行った。コピー数異常はゲノムワイド解析が可能な The eXome Hidden Markov Model (XHMM, Fromer et al., Am J Hum Genet. 2012) を用いた解析と、遺伝子毎の詳細な解析が可能な Nord's script (Nord et al., BMC Genomics. 2011) を用いた解析を併用した。

4. 研究成果

(1) ターゲットエクソンキャプチャーを用いた網羅的遺伝子変異およびコピー数解析

H25 年度に、乳児期発症のてんかん性脳症の 104 症例に対して、既知の責任遺伝子、およびこれまでの解析で病的と考えられる変異が 1 症例以上で見つかった 35 あるいは 50 遺伝子に対する、ターゲットエクソンキャプチャーを用いた遺伝子変異およびコピー数解析を行った。その結果、29 症例 (27.9%) で責任遺伝子の変異/コピー数異常を検出した。対象遺伝子の遺伝子コード領域のカバー率はほぼ 100%と極めて良好で、ターゲットエクソンキャプチャーを用いた網羅的遺伝子解析の精度の良さが証明された。

	リードの平均の厚み	10 リード以上で読まれていた塩基の割合 (%)	20 リード以上で読まれている塩基の割合 (%)
ターゲットキャプチャー (48 検体の平均)	385.4	99.7	99.6
全エクソーム (62 検体の平均)	87.1	96.0	92.3

表1. 解析対象遺伝子のタンパク質コード領域に対するカバー率
ターゲットキャプチャーは 166kb (50 遺伝子) で、全エクソーム解析は 33Mb と、解析対象に大きな違いがあることに注意

(2) 全エクソーム解析による網羅的遺伝子変異およびコピー数解析

全エクソーム解析をてんかん性脳症 623 例に関して施行した (H25-27 年度)。本研究期間中、我々の教室を含めて世界中でてんかん性脳症の遺伝子解析が精力的に行われ、多くの責任遺伝子が同定された。その結果、驚くべきことに 279 例 (44.7%) で、疾患の原因と考えられる遺伝子異常を同定することができた。ターゲットキャプチャーの結果 (27.9%) と比較すると、いかに新規責任遺伝子の同定が進んだかが分かる。また、図 1 に示すように、全エクソーム解析データを用いたコピー数異常は有効であり、従来マイクロアレイ染色体検査を別に施行する必要があったが、今後は全エクソーム解析を行って網羅的遺伝子変異とコピー数異常を同時に解析することが遺伝子検査の主流となると考えられる。

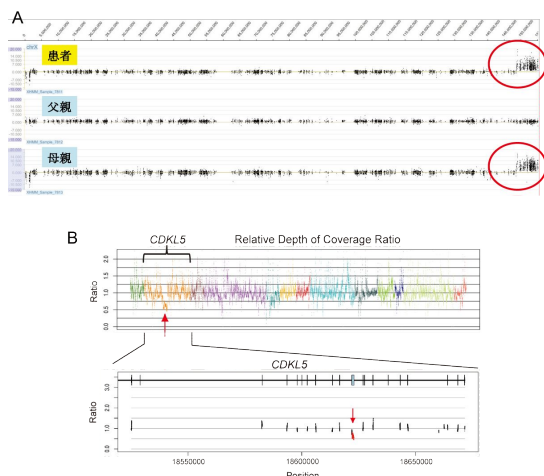


図 1. (A)XHMM 解析による X 染色体長腕の重複の検出(赤丸)。患児は MECP2 重複症候群と診断された。(B)Nord 解析による 1 エクソン欠失の同定。患児は *CDKL5* 遺伝子の欠失(赤矢印)によって点頭てんかんを発症したと考えられた。

また、病的と考えられる遺伝子変異が同定された 279 例では、10 例がコピー数異常を有しており、残り 269 例で見つかった遺伝子変異は、計 104 遺伝子に及んだ。遺伝子別には、*SCN1A* 変異が最も多く、*KCNQ2*、*CDKL5*、*SCN2A*、*SCN8A*、*STXBP1*、*KCNT1*、*PIGA*、*PCDH19* の順であった。これらの遺伝子の変異で計 129 症例(全体の 20.7%)に及ぶことから、これらわずか 9 遺伝子のターゲットリシーケンスが、コストを抑えた遺伝子検査としては、first line になる可能性が考えられた。

(3) トリオ(患児およびご両親)でのエクソーム解析による *de novo* 変異の網羅的スクリーニング

患児の全エクソーム解析で病的と考えられる遺伝子異常が見つからなかった症例のうち、141 症例でトリオ解析を施行した。*de novo* 変異の同定から複数の新規責任遺伝子を同定した：*GNAO1* (Nakamura et al., AJHG 2013)、*SLC35A2* (Kodera et al., Hum Mutat 2013)、*PIGA* (Kato et al., Neurology 2014)、*COG2* (Kodera et al., Clin Genet 2015)、*KCNB1* (Saitzu et al., Sci Rep 2015)。これらの研究成果により、乳児てんかん性脳症の原因には、糖鎖異常、カルシウム電流異常、カリウム電流異常、オートファジーの異常といった様々な異常が関与していることが明らかとなった。

(4) 既知の原因遺伝子が引き起こす臨床表現型

申請者および他の研究室から報告のあった新規遺伝子に関して、High resolution melting 法あるいは PCR 産物の次世代シーケンサーでのシーケンス法を用いて変異スクリーニングを行った。この方法を用いて多くの遺伝子に関して変異を有する患者を同定することに成功し、その臨床表現型について論文報告を行った：*GNAO1* (Saitzu et al., 2016)、*KCNH1* (Fukai et al., JHG 2016)、*NALCN* (Fukai et al., JHG 2016)、*DNM1* (Nakashima et al., Epilepsia 2016)、*KCNT1* (Ohaba et al., Epilepsia 2015)、*GRIN1* (Ohaba et al., Epilepsia 2015)、*SPTAN1* (Tohyama et al., JHG 2015)、*QARS* (Kodera et al., JHG 2015)、*BRAT1* (Saitzu et al., JHG 2014)、*TBL1XR1* (Saitzu et al., JHG 2014)、*PIGT* (Nakashima et al., Neurogenetics 2014)、*SCN8A* (Ohaba et al., Epilepsia 2014)、*PIGO* (Nakamura et al., Epilepsia

2014)、*PIGN* (Ohba et al. Neurogenetics 2014)、*SCN2A* (Nakamura et al., Neurology 2013)、*KCNQ2* (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 28 件)

*corresponding author(s)

1. *Saitzu H et al. (著者 22 名中 1 番目) Phenotypic spectrum of *GNAO1* variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. Eur J Hum Genet. (査読あり) Eur J Hum Genet. 2016 Jan;24(1):129-34. doi: 10.1038/ejhg.2015.92.
2. *Saitzu H et al. (著者 14 名中 1 番目) De novo *KCNB1* mutations in infantile epilepsy inhibit repetitive neuronal firing. Sci Rep. (査読あり) 2015 19;5:15199. doi: 10.1038/srep15199.
3. Ohba C,...*Saitzu H, *Matsumoto N. (著者 22 名中 21 番目) De novo *KCNT1* mutations in early-onset epileptic encephalopathy. Epilepsia. (査読あり) 2015 56(9):e121-8. doi: 10.1111/epi.13072.
4. Nakashima M, Saitzu H. (著者 20 名中 2 番目、筆頭共著者) Somatic Mutations in the *MTOR* gene cause focal cortical dysplasia type IIb. Ann Neurol. (査読あり) 2015 78(3):375-86. doi: 10.1002/ana.24444.
5. Ohba C,...*Saitzu H, *Matsumoto N. (著者 21 名中 20 番目) *GRIN1* mutations cause encephalopathy with infantile-onset epilepsy, and hyperkinetic and stereotyped movement disorders. Epilepsia. (査読あり) 2015 56(6):841-8. doi: 10.1111/epi.12987.
6. Tohyama J,...Saitzu H. (著者 9 名中最後) *SPTAN1* encephalopathy: distinct phenotypes and genotypes. J Hum Genet. (査読あり) 2015 60(4):167-73. doi: 10.1038/jhg.2015.5.
7. Kodera H,...*Saitzu H, *Matsumoto N. (著者 10 名中 9 番目) Mutations in the glutamyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. J Hum Genet. (査読あり) 2015 60(2):97-101. doi: 10.1038/jhg.2014.103.
8. Kodera H,...*Saitzu H (著者 10 名中最後) Mutations in *COG2* encoding a subunit of the conserved oligomeric golgi complex cause a congenital disorder of glycosylation. Clin Genet. (査読あり) 2015 87(5):455-60. doi:

- 10.1111/cge.12417.
9. *Saitu H et al. (著者 7 名中 1 番目) Compound heterozygous *BRAT1* mutations cause familial Ohtahara syndrome with hypertonia and microcephaly. *J Hum Genet.* (査読あり) 2014 59(12):687-90. doi: 10.1038/jhg.2014.91.
 10. *Saitu H et al. (著者 13 名中 1 番目) A girl with West syndrome and autistic features harboring a de novo *TBL1XR1* mutation. *J Hum Genet.* (査読あり) 2014 59(12):687-90. doi: 10.1038/jhg.2014.91.
 11. Ohba C,...*Saitu H. (著者 22 名中最後) Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo *SCN8A* mutations. *Epilepsia.* (査読あり) 2014 55(7):994-1000. doi: 10.1111/epi.12668.
 12. Kato M, *Saitu H. (著者 18 名中 2 番目、筆頭共著者) *PIGA* mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology.* (査読あり) 2014 6;82(18):1587-96. doi: 10.1212/WNL.0000000000000389.
 13. Nakamura K,...*Saitu H. (著者 12 名中最後) *PIGO* mutations in intractable epilepsy and severe developmental delay with mild elevation of alkaline phosphatase levels. *Epilepsia.* (査読あり) 2014 55(2):e13-7. doi: 10.1111/epi.12508.
 14. Kodera H,...*Saitu H (著者 20 名中最後) De novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter cause early-onset epileptic encephalopathy. *Hum Mutat.* (査読あり) 2013 34(12):1708-14. doi: 10.1002/humu.22446.
 15. Nakamura K,...*Saitu H. (著者 26 名中最後) De Novo mutations in *GNAO1*, encoding a G α subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet.* (査読あり) 2013 5;93(3):496-505. doi: 10.1016/j.ajhg.2013.07.014.
 16. Nakamura K,...*Saitu H. (著者 31 名中最後) Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology.* (査読あり) 2013 10;81(11):992-8. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a43e57.

[学会発表](計 20 件)

1. 才津浩智. 特別講演 「発達期脳神経疾患の遺伝要因の解明」 第 173 回東北小児神経学研究会(四季会)、2016 年 2 月 7 日、アゼリアヒルズ(仙台)
2. 才津浩智. 特別講演 「次世代シーケンサーが切り開く発達期脳神経疾患の

- 原因解明」 第 44 回日本小児神経学会東海地方会、2016 年 1 月 23 日、名古屋大学医学部(名古屋)
3. 才津浩智. 特別講演 「次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子解析」 第 22 回遺伝性疾患に関する出生前診断研究会、2016 年 10 月 3 日、九州大学医学部同窓会館(福岡)
 4. 才津浩智. 「網羅的遺伝子異常検出系を駆使した乳幼児てんかん性脳症の遺伝要因の解明」 第 5 回都医学研シンポジウム、2015 年 11 月 12 日、一橋講堂(東京都)
 5. 才津浩智. 招待講演 「次世代シーケンスが切り開く 疾患の原因解明」 日本人類遺伝学会第 60 回大会、2015 年 10 月 16 日、京王プラザホテル(東京都)
 6. 才津浩智. 招待講演 「乳幼児てんかん性脳症の遺伝要因の解明」 第 67 回大阪小児てんかん研究会、2015 年 3 月 14 日、ホテルグランヴィア大阪(大阪)
 7. 才津浩智. シンポジウム「エクソーム解析による包括的遺伝子診断(乳幼児てんかん性脳症の遺伝子診断)」 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会、2014 年 11 月 20 日、タワーホール船堀(東京都)
 8. 才津浩智. 招待講演 「次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子診断」 2014 アジレントゲノミックスフォーラム 2014 年 6 月 4 日、国際ファッションセンター(東京都)
 9. 才津浩智. Progress of the Year 2014 1: ジストニア・パーキンソン症の最近の進歩 「WDR45 変異によるオートファジー障害が脳内に鉄沈着を伴う神経変性症を引き起こす」 第 55 回日本神経学会学術大会、2014 年 5 月 21 日、福岡国際会議場(福岡)
 10. 才津浩智. シンポジウム「次世代シーケンサーによるてんかんを伴う知的障害の網羅的遺伝子解析」 第 117 回日本小児科学会学術集会、2014 年 4 月 11 日、名古屋国際会議場(名古屋)
 11. 才津浩智. ランチョンセミナー 「加速する発達期脳神経疾患の原因解明」 第 58 回日本人類遺伝学会、2013 年 11 月 23 日、江陽グランドホテル(仙台)
 12. 才津浩智. シンポジウム「次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断」 ヒトと NGS: 医療・科学・社会. NGS 現場の会第 3 回研究会、2013 年 9 月 4 日、神戸国際会議場(神戸)
 13. 才津浩智. 招待講演 「遺伝子検査と新規遺伝子同定におけるイルミナシーケンサーの運用」 イルミナ次世代シー

- ケンサーユーザーフォーラム 2013 年 6 月 27 日、ヒューリックホール(東京都)
14. 才津浩智 . シンポジウム「次世代シーケンスによる先天異常疾患の責任遺伝子の同定」第 53 回日本先天異常学会学術集会, 2013 年 7 月 22 日、千里ライフサイエンスセンター(大阪)
 15. 才津浩智 . 招待講演「早期発症てんかん性脳症の遺伝学的解明 ~ 次世代シーケンスの活用 ~」第 55 回日本小児神経学会学術集会, 2013 年 6 月 1 日、iichiko 総合文化センター(大分)

〔図書〕(計 3 件)

1. 才津 浩智 . 日本小児医事出版社、増刊号 臨床医が知っておきたい先天異常 「次世代シーケンスによる遺伝子診断の進歩」, 2013 年、p31-27
2. 大場 ちひろ、才津 浩智、松本 直通 . 羊土社、実験医学増刊 ゲノム 医学・生命科学 研究 「次世代シーケンスによるメンデル遺伝性疾患の責任遺伝子解明」, 2013 年、p2461-2467
3. 才津 浩智 . 医歯薬出版株式会社、「次世代シーケンスによるてんかんの分子診断」, 2015 年、p549-554

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：小児期のてんかんおよび不随意運動をきたす疾患の検出方法
発明者：松本直通、才津浩智
権利者：公立大学法人横浜市立大学
種類：特許
番号：特願 2013-123660
出願年月日：2013 年 06 月 12 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：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

才津 浩智 (SAITSU HIROTOMO)
浜松医科大学・医学部・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

小寺 啓文 (KODERA HIROFUMI)
横浜市立大学 博士研究員
研究者番号：70637884