

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：22101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25461557

研究課題名(和文)日本人における熱性けいれん疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Searching for the febrile seizure susceptibility genes in a Japanese population

研究代表者

中山 純子 (Nakayama, Junko)

茨城県立医療大学・公私立大学の部局等・准教授

研究者番号：30433155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：熱性けいれん疾患感受性遺伝子を同定するため、我々が以前報告したFEB4遺伝子座(5q14-q15)に存在し「5q14.3-q15微小欠失症候群」のてんかん発症との関連が示唆されているGPR98とMEF2C遺伝子について解析を行った。日本人熱性けいれん患者48名を対象として変異検索を行い、31個の遺伝子変異と1カ所の遺伝子重複領域を検出した。変異のほとんどはすでに報告されている多型であったが、GPR98遺伝子に1個のミスセンス変異が今回あらたに同定された。多型を用いた関連解析では有意な関連は認められず、これらが日本人に広く共通する熱性けいれん主要疾患感受性遺伝子である可能性は低いと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Microdeletions within chromosomal bands 5q14.3q15 were recently identified to underlie several neurological features including epilepsy. The GPR98 gene and the MEF2C gene are considered phenotypic candidate genes for this syndrome. This chromosomal region overlaps with FEB4 locus which we have previously reported. To investigate whether GPR98 and MEF2C are susceptibility genes for febrile seizures (FS), we performed a systematic search for mutations in 48 patients with familial FS. We detected 31 variants by direct sequencing and a duplicated region by multiplex ligation-dependent probe amplification. Although most of them were registered SNPs and copy number variants, one unregistered missense mutation was detected in GPR98. The association studies using detected SNPs did not find significant associations with FS. Our results indicate that genomic variations in GPR98 and MEF2C are not likely to be substantially involved in the etiology of FS in a Japanese population.

研究分野：医歯薬学

キーワード：熱性けいれん 遺伝子 日本人 遺伝子変異 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

熱性けいれんは小児のけいれんのなかでもっとも頻度が高く、日本人では罹患率が約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、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8つの熱性けいれん遺伝子座 (*FEB1*, *FEB2*, *FEB3*, *FEB5*, *FEB7*, *FEB8*, *FEB9*, *FEB10*)が報告されているが、*FEB3* (*SCN1A*, *SCN9A*)と *FEB8* (*GABRG2*)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)。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。

「5q14.3-q15領域微小欠失症候群」は2009年にCardosoらによって初めて報告された疾患群で、表現型としててんかん発作が認められる。本症候群では染色体の欠失領域が我々

が以前報告した *FEB4* 遺伝子座にあり、この症候群で認められるてんかんにかかわる遺伝子が熱性けいれんの発症にも関わっている可能性が考えられている。

2. 研究の目的

熱性けいれんの病態解明のため、日本人熱性けいれん患者に広く共通する疾患感受性遺伝子を同定することを目的とする。

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、「5q14.3-q15微小欠失症候群」患者の欠失領域からてんかんの候補遺伝子と考えられている *GPR98* (G-protein coupled receptor 98)と *MEF2C* (mad box transcription enhancer factor 2, polypeptide C)の2つの遺伝子を解析し、疾患との関わりを検討することを目標とする。

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48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ー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

ダイレクトシーケンス法による遺伝子変異検索

GPR98 遺伝子と *MEF2C* 遺伝子について、The UCSC Genome Browser (<https://genome.ucsc.edu/>)などのデータベースから遺伝子の塩基配列情報を得た。*GPR98* 遺伝子については全90エクソンのうち、

我々が以前 *MASS1* (monogenic audiogenic seizure-susceptible) 遺伝子としてすでに解析を終了している 35 エクソンのをのぞいた 55 エクソン領域、*MEF2C* 遺伝子についてはすべてのエクソン領域を増幅するプライマーを設計して PCR により増幅した。得られた PCR 産物を用いて、ABI PRISM 3100 DNA Sequencer (Life Technologies, Foster City, CA) により変異検索を行った。遺伝子変異が検出された場合は、まず dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) などのデータベースで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。データベース上に登録されていない変異のうちアミノ酸置換を伴うミスセンス変異については、一般コントロール集団の DNA サンプルを対象に、PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 法などを用いて多型かどうかを確認した。主な多型については、関連解析を行って疾患とのかかわりを検討した。統計解析には SIB-PAIR プログラムと Fisher's exact test を用いた。

MLPA 法による遺伝子変異検索

対象の DNA を熱変性させ、SALSA MLPA probemix P395-A1 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) を用いて、*MEF2C* 遺伝子の全エクソンおよび *GPR98* 遺伝子のエクソン 7 領域についてハイブリダイゼーション反応およびライゲーション反応を行い、PCR 増幅後に ABI PRISM 3100 DNA Sequencer を用いて電気泳動を行った。得られたデータを Coffalyser software (MRC-Holland) で解析し、各領域のコピー数を検討した。

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 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 CNV (copy number variation) であるかどうかを確認した。

4. 研究成果

(1) *GPR98* 遺伝子に同定された遺伝子変異

ダイレクトシーケンス法により、26 の遺伝子変異が同定された。そのうち 11 変異がエクソン内に存在しており、残りの 15 変異はイントロン領域に存在していた。エクソン内の 11 の遺伝子変異のうち、7 つの変異 (c.9743G>A, c.10411G>A, c.11954T>C, c.14042T>C, c.14515C>G, c.17626A>G, c.18475A>G) はアミノ酸置換を伴うミスセンス変異であったが、残りの 4 つの変異 (c.9927T>G, c.11682C>T, c.16248C>T, c.18741G>A) はアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であった。c.14042T>C (p.Met4681Thr) 変異は 1 名の患者のみにみられたが、データベース上でも報告はなく、100 名のコントロール DNA でもみとめられなかった。残りの 6 つのミスセンスのうち、c.11954T>C (p.Ile3985Thr) 変異についてもデータベース上に報告がなかったが、コントロール DNA には約 2% の頻度で認められ、多型と考えられた。c.14042T>C 変異以外の 6 つのミスセンス多型について、熱性けいれん 62 家系 231 名を用いて Transmission disequilibrium test による関連解析を行ったが、熱性けいれんとの有意な関連は認められなかった (表 1)。

MLPA 法を用いてエクソン 7 のコピー数を検討したが、全患者で欠失や重複は認められなかった。

表 1 *GPR98* 遺伝子多型と熱性けいれんとの TDT 解析結果

| Polymorphism | Allele | Transmitted | Not transmitted | P |
|--------------|--------|-------------|-----------------|-------|
| c.9743G>A | G | 37 | 37 | 1.000 |
| | A | 37 | 37 | |

| | | | | |
|------------|---|----|----|-------|
| c.10411G>A | G | 25 | 22 | 0.771 |
| | A | 22 | 25 | |
| c.11957T>C | T | 2 | 1 | 1.000 |
| | C | 1 | 2 | |
| c.14515C>G | C | 13 | 7 | 0.263 |
| | G | 7 | 13 | |
| c.17626A>G | A | 30 | 38 | 0.396 |
| | G | 38 | 30 | |
| c.18475A>G | A | 9 | 6 | 0.607 |
| | G | 6 | 9 | |

(2) MEF2C 遺伝子に同定された遺伝子変異

ダイレクトシーケンス法により 6 つの遺伝子変異が同定された。そのうち 1 つの変異がエクソン内に存在しており、残りの 5 変異はイントロン領域に存在していた。エクソン内に存在した c.642C>T (p.Asn214=) 変異はデータベース上に既に登録されているアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であった。これらの変異について、熱性けいれん患者における各変異のアレル頻度と HapMap-JPT (<https://catalog.coriell.org/1/NHGRI>) データベース上の日本人集団におけるアレル頻度を比較したが、熱性けいれんとの有意な関連はみとめられなかった (表 2)。

MLPA 法を用いた解析では、1 名の患者においてエクソン 1 の重複が同定されたが、DGV データベースにすでに登録されている CNV であった (nsv980696)。

表 2 MEF2C 遺伝子多型と熱性けいれんとの関連解析結果

| Variants | Minor Allele | Allele Frequencies | | P |
|--------------|--------------|--------------------|--------------------------------|-------|
| | | This study | Japanese controls (HapMap-JPT) | |
| c.258+155T>G | G | 0.167 | 0.189 | 0.744 |
| c.403-211A>G | G | 0.457 | 0.431 | 0.788 |
| c.403-139A>G | G | 0.457 | 0.433 | 0.796 |
| c.590-95G>T | T | 0.083 | 0.071 | 0.66 |

| | | | | |
|--------------|---|-------|------|------|
| c.638-102T>C | C | 0.010 | n.a. | n.a. |
| c.642T>C | T | 0.021 | n.a. | n.a. |

* n.a.: not applicable

本研究で行われた関連解析では、GPR98 遺伝子と MEF2C 遺伝子のいずれも熱性けいれんとの有意な関連がみとめられなかったことから、これら 2 つの遺伝子が日本人熱性けいれん発症に広く共通する主要な疾患感受性遺伝子である可能性は低いと考えられた。しかし、GPR98 遺伝子については、以前我々が熱性けいれんの 1 家系でナンセンス変異 (c.8495C>A: p.Ser2832Ter) を報告しており (Nakayama et al., 2002)、一部の熱性けいれん家系では疾患の発症にかかわっている可能性は否定できない。今回 1 家系で認められた c.14042T>C (p.Met4681Thr) 変異も含めて、GPR98 遺伝子と熱性けいれん発症とのかかわりについては、今後さらに検討していく必要があると考えられた。

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 2 件)

Shimajima K, Tanaka R, Shimada S, Sangu N, Nakayama J, Iwasaki N, Yamamoto T. A novel homozygous mutation of GJC2 derived from maternal uniparental disomy in a female patient with Pelizaeus-Merzbacher-like disease. J Neurosci (2013) 330:123-126. 査読有

Nakayama J, Kinugasa H, Ohto T, Tanaka R, Nakayama T, Noguchi E, Arinami T, Iwasaki N. Monozygotic twins with de novo ZIC2 gene mutations discordant for the type of holoprosencephaly. Neurology (2016) 86:1456-1458. 査読有

[学会発表](計 1 件)

Nakayama J, Hamano K, Iwasaki N, Arinami T, Noguchi E. Mutation analysis of the myocyte enhancer factor 2C gene (MEF2C) in Japanese patients with febrile seizures. The 13th International Congress of Human Genetics. 2016年4月6日、Kyoto

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 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

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

野口 恵美子 (NOGUCHI, Emiko)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：40344882

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