

平成 31 年 4 月 20 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05160

研究課題名(和文) 乳幼児てんかん性脳症の遺伝要因と分子病態の解明

研究課題名(英文) Elucidation for genetic basis and molecular pathology of infantile epileptic encephalopathy

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) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：乳児期発症てんかん性脳症症例の全エクソーム解析データを用いた網羅的遺伝子変異解析とコピー数異常の検出系により、50%を超える症例での遺伝子異常の同定を行った。また、全エクソーム解析で得られた遺伝子変異データに、他の脳神経疾患の大規模コホートでの遺伝子変異データを加えた疾患候補遺伝子の抽出により、PPP2R1A, CACNA1G, CSNK2A1, GABRB2を新規候補遺伝子として抽出した。更に、新規原因遺伝子のSLC12A5, CNPY3, CYFIP2, RHOBTB2を同定し、その細胞あるいはマウスモデルでの機能異常所見と合わせて報告し、乳幼児てんかん性脳症の分子病態の解明が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規原因遺伝子とその機能変化について知見を与えることにより、乳児期発症てんかん性脳症の分子病態の理解が進んだ。原因遺伝子変異が多く同定されることは、遺伝子診断できる症例が増えることを意味しており、現時点で約5割の症例で遺伝子診断が可能である。また、2遺伝子に関しては、遺伝子変異をノックインすることによるマウスモデルの確立に成功しており、更なる病態解明と治療薬の開発に繋がる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We identified genetic abnormalities in more than 50% of cases of infantile epileptic encephalopathies by comprehensive gene mutation analysis and copy number variation detection system using whole exome sequencing data. In addition, PPP2R1A, CACNA1G, CSNK2A1, and GABRB2 are identified as novel candidate genes through combining gene mutation data in other large-scale cohorts of brain and nervous diseases and in our study. Furthermore, we identified SLC12A5, CNPY3, CYFIP2 and RHOBTB2 as novel causative genes and reported them together with functional findings in their cell or mouse models. These studies advanced the elucidation of molecular basis of infantile epileptic encephalopathy.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：てんかん性脳症 新規責任遺伝子 エクソーム解析 マウスモデル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳幼児てんかん性脳症は、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。そのほとんどは孤発性であり、*de novo* の変異あるいはコピー数異常が主な原因である。これまでに乳幼児てんかん性脳症 889 例の全エクソーム解析を行い、*de novo* の変異およびコピー数異常を網羅的に検索することにより 353 例 (39.7%) で原因遺伝子異常が同定されていた。一方、自閉症、精神運動発達遅滞といった発達期脳神経疾患の大規模コホートをを用いた *de novo* の変異の報告も相次ぎ、脳神経疾患の分子基盤は一部オーバーラップしていることが明らかとなった。よって、新規の解析症例の増加に加えて、これら脳神経疾患の解析結果を加えてコホートサイズを増やしてメタ解析することにより、同定可能な新規責任遺伝子数が増加することが予想された。

また、次世代シーケンサーによって疾患の遺伝要因が急速に明らかになっていくなかで、機能解析による変異がタンパク質の機能に与える影響とその病態解析がより重要となっていた。

2. 研究の目的

本研究では、全エクソーム解析を推進することに加えて、他の脳神経疾患で報告されている遺伝子変異データを加えた解析を行うことでより多くの疾患責任遺伝子を同定する。更に、細胞あるいは動物モデルの作成による変異効果の評価と分子病態の解析を目指す。

3. 研究の方法

(1) 大規模コホート解析データを加えた疾患候補遺伝子の抽出

トリオ解析を行った 177 トリオの候補遺伝子変異データに加えて、てんかん性脳症 264 トリオ (Epi4K Consortium, Nature 2013)、自閉症 2508 トリオ (Lossifov et al., Nature 2014)、精神運動発達遅滞 1133 トリオ (The Deciphering Developmental Disorders Study, Nature 2014) のデータを加えて、*de novo* 変異および劣性遺伝形式の変異をもとに、共通する遺伝子変異の有無を調べた。

(2) 新規症例の全エクソーム解析

新規症例の全エクソーム解析を行い、網羅的遺伝子変異解析、および XHMM (Fromner et al., AJHG 2012) と Nord script (Nord et al., BMC genomics 2011) の 2 つのアルゴリズムを用いたコピー数解析 (リードデプスの情報を利用) を行った。

(3) 細胞モデルおよび変異ノックインマウスの作成による変異効果の評価と分子病態の解析

病的であることが強く疑われた変異に関しては、責任遺伝子を強制発現させた細胞モデルを用いて分子病態を解明した。また、個体での影響を調べるために、受精卵へ変異を導入して、変異ノックインマウスを作製した。

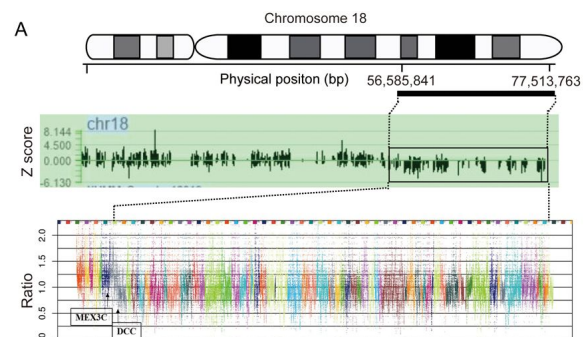
4. 研究成果

(1) 大規模コホート解析データを加えた疾患候補遺伝子の抽出

未同定の 177 トリオの候補遺伝子変異データに加えて、てんかん性脳症 264 トリオ、自閉症 3982 トリオ、知的障害/精神運動発達遅滞 1284 トリオを加えて、共通して *de novo* 変異を有する遺伝子を検索した。この解析によって、*PPP2R1A*、*CACNA1G*、*CSNK2A1*、*GABRB2* が新規候補遺伝子として抽出された。これらの遺伝子の変異は、間を置かず海外から論文報告が相次いでおり、本解析の有用性が示される結果であった。

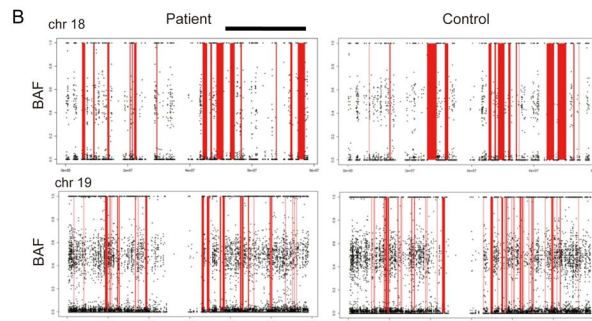
(2) 新規症例の全エクソーム解析

計 124 症例の全エクソーム解析を行い、70 症例 (56.5%) において原因遺伝子変異が同定された。このような極めて高い変異同定率は解析精度の高さを証明しており、同時に、全エクソーム解析の希少疾患の遺伝子診断における有用性を表している。また、70 症例のうち 6 症例はコピー数異常が原因であり、コピー数異常が重要な原因であることが再確認された。興味深いことに、6 例中 1 例は、モザイクの染色体欠失であった (図 1A)。このモザイク欠失を遺伝型情報加味して証明するために、H3M2 プログラム (Magi et al., Bioinformatics 2014) を用いて解析したところ、B アレル頻度のパターンがモザイク欠失パターンであり、遺伝型情報と



リードデプスの情報を組み合わせることで、より精度よくモザイクコピー数異常が検出できることが明らかとなった。また、複数名で変異が見つかった新規原因候補遺伝子も2つ同定できた。

図1. (A)XHMM (中段) および Nord 解析 (下段)による18番染色体長腕の欠失の検出。欠失の範囲は太線で示す。(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に発症したと考えられた。



(3) 細胞モデルおよび変異ノックインマウスの作成による変異効果の評価と分子病態の解析

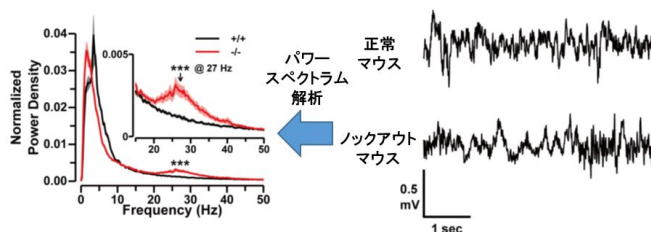
KCC2 変異体の機能解析 (Saitou et al., Sci Rep 2016)

乳児遊走性部分てんかんの患者3家系4症例で常染色体劣性遺伝形式の変異が同定されたカリウム-クロライド共役担体 (KCC2) 変異体の機能解析を、細胞モデルを用いて行い、患者はクロライドイオンを細胞外にくみ出す機能が強く低下した変異体とやや低下した変異体の2つを持つことが分かった。このことから、変異により KCC2 の機能が低下することで GABA やグリシンによる抑制力が低下し、神経回路の興奮性と抑制性のバランスが崩れることがてんかん発症に関わることが示唆された。

CNPY3 変異体の機能解析 (Mutoh et al., Am J Hum Genet 2018)

ウエスト症候群の患者2家系3症例で常染色体劣性遺伝形式の変異が同定されたシャペロン分子 (CNPY3) のノックアウトマウス解析を行った。このマウスでは、体重増加不良や直腸温の低下に加えて、筋緊張の亢進、不安の低下や運動機能障害といった異常所見が観察され、生後4週以内に死亡した。また、脳波を測定したところ、患者と同様に周波数の高い速波成分の増大が観察された (図2)。CNPY3 は小胞体に局在し、自然免疫に重要な Toll 様受容体タンパク質などの正しい折り畳みと細胞内の分布に関与することが報告されていたが、我々の解析により、ヒトとマウスの脳機能にも重要であることが明らかとなった。変異マウスはよい動物モデルになると考えられ、更に研究することで病態解明に貢献し、効果的な治療法開発への寄与が期待される。

図2. 正常および *Cnpy3* ノックアウトマウスの脳波所見。パワースペクトラム解析によって、20-35Hz の速い周波数領域の増大が認められる。パワースペクトラム: 脳波データ中に含まれる各周波数成分の信号強度をグラフに示したもの



CYFIP2 変異体の機能解析 (Nakashima et al., Ann Neurol 2018)

乳幼児てんかん性脳症の4例で *de novo* 変異が同定された CYFIP2 変異体の機能解析を、細胞モデルを用いて行った。CYFIP2 は、細胞運動の際に重要なアクチン動態を制御する中心的な因子である WAVE 調節複合体を形成する分子であり、変異体を発現させた細胞においては、アクチンの過剰な集積が確認された。これらの結果から、CYFIP2 変異体をもつ患者においては WAVE 調節複合体の過剰な活性化が引き起こされており、アクチン動態の制御に異常をきたしている可能性が考えられた。

RHOBTB2 変異体の機能解析 (Belal et al., Hum Mutat 2018)

急性脳症を伴う難治性てんかん患者3名で *de novo* 変異が同定された非定型 G タンパク質 RhoBTB2 変異体の機能解析を、細胞および変異ノックインマウスモデルを用いて行った。RhoBTB2 は、Cu13 と結合してユビキチンリガーゼ複合体のアダプタータンパク質として機能し、自身もプロテアソームで分解されることが知られている。マウス神経芽細胞腫の Neuro2A 細胞で一過性発現させた野生型 RhoBTB2 は発現が弱く、プロテアソーム阻害剤である MG132 の添加で発現が増加し、Cu13 との共発現で発現が減少することが確認された。一方、患者で同定された変異体は発現量が増加しており、Cu13 との共発現でもその発現は変化なく、Cu13 複合体依存的な分解が障害されていることが示唆されたが、Cu13 との結合低下は認めなかった。変異ノックインマウスの解析では、ホモ接合性 R511Q 変異ノックインマウスでは成長障害が認められ、様々な自然発症のてんかん発作を示して生後6週までに死亡した。RhoBTB2 変異によって発現量が増加し、それがてんかん症状を引き起こすことが示唆されたが、どのような分子メカニズムで発症に繋がるのか、現在分子レベルの解析に取り組んでいる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 45 件)

- Chong PF, Saitsu H (著者8名中2番目). Deletions of *SCN2A* and *SCN3A* genes in a patient with West syndrome and autistic spectrum disorder. *Seizure*. 2018 60:91-93. doi: 10.1016/j.seizure. (査読あり)
- Belal H, ..Saitsu H (著者16名中最後). De novo variants in *RHOBTB2*, an atypical Rho GTPase gene, cause epileptic encephalopathy. *Hum Mutat*. 2018 Aug;39(8):1070-1075. doi: 10.1002/humu.23550. (査読あり)
- Akita T, ..Saitsu H (著者20名中最後). De novo variants in *CAMK2A* and *CAMK2B* cause neurodevelopmental disorders. *Ann Clin Transl Neurol*. 2018 29;5(3):280-296. doi: 10.1002/acn3.528. (査読あり)
- Nakashima M, et al (著者19名中18番目). De Novo Hotspot Variants in *CYFIP2* Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Ann Neurol*. 2018 83(4):794-806. doi: 10.1002/ana.25208. (査読あり)
- Mizuguchi T, et al (著者22名中21番目). Loss-of-function and gain-of-function mutations in *PPP3CA* cause two distinct disorders. *Hum Mol Genet*. 2018 15;27(8):1421-1433. doi: 10.1093/hmg/ddy052. (査読あり)
- Mutoh H, ..Saitsu H (著者18名中最後). Biallelic Variants in *CNYP3*, Encoding an Endoplasmic Reticulum Chaperone, Cause Early-Onset Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 2018 102, 321-329. doi: 10.1016/j.ajhg.2018.01.004. (査読あり)
- Hiraide T#, ..Saitsu H (著者13名中最後). De novo variants in *SETD1B* are associated with intellectual disability, epilepsy and autism. *Hum Genet*. 2018 137(1):95-104. doi: 10.1007/s00439-017-1863-y. (査読あり)
- Miyake N et al (著者33名中32番目). Biallelic *TBCD* Mutations Cause Early-Onset Neurodegenerative Encephalopathy. *Am J Hum Genet*. 2016 6;99(4):950-961. doi: 10.1016/j.ajhg.2016.08.005. (査読あり)
- Saitsu H, et al (筆頭著者). Impaired neuronal KCC2 function by biallelic *SLC12A5* mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci Rep*. 2016 20;6:30072. doi: 10.1038/srep30072. (査読あり)
- Nakashima M, et al (著者14名中13番目). *WDR45* mutations in three male patients with West syndrome. *J Hum Genet*. 2016 61(7):653-61. doi: 10.1038/jhg.2016.27. (査読あり)

[学会発表](計 16 件)

- 才津浩智. 「発達期脳神経疾患の遺伝要因と分子病態の解明」 第 110 回東海臨床遺伝・代謝懇話会、2019 年 2 月 16 日、名古屋
- 才津浩智. 「発達期脳神経疾患の分子病態の解明」 第 24 回日本小児神経学会東北地方会、2018 年 11 月 10 日、山形市保健センター、山形
- 才津浩智. 「遺伝子診断技術」 第 28 回遺伝医学セミナー、2018 年 9 月 8 日、ホテル東急エキスポパーク、大阪
- 才津浩智. 「難治性疾患の全エクソーム解析」 *Endocrinology Debate and Global Exchange in Japan*、2018 年 7 月 22 日、東京マリオットホテル品川、東京
- 才津浩智. シンポジウム ゲノム医療の幕開け 「網羅的遺伝子解析による遺伝性疾患の診断」 第 58 回日本臨床化学会年次学術集会 2018 年 8 月 24 日、名古屋国際会議場、名古屋
- 才津浩智. シンポジウム 遺伝性先天異常症候群研究の最前線 「先天異常疾患と体細胞モザイク変異」 第 57 回日本先天異常学会学術集会 2017 年 8 月 26 日、早稲田大学、東京
- 才津浩智. 「遺伝カウンセラーが知っておくべき、網羅的遺伝子解析の実際と注意点」 2017 年度第一回認定遺伝カウンセラーセミナー 2017 年 6 月 23 日、近畿大学東大阪キャンパス、大阪
- Hiroto Saitso. Invited lecture [Genetic Diagnosis of Epileptic Syndrome Using Next Generation Sequencing] The 21th Annual & Scientific Meeting of Taiwan Child Neurology Society. 27 May 2017, Taipei, Taiwan
- Hiroto Saitso. Invited lecture [From identification of pathological variants to

understanding mechanisms of epileptic syndromes: novel genes and potential mechanisms] The 21th Annual & Scientific Meeting of Taiwan Child Neurology Society. 28 May 2017, Taipei, Taiwan

Hiroto Saito. [Recent Eponyms in Child Neurology: Three Men's Legacies] Identification of *STXBP1* mutations in patients with Ohtahara syndrome. 14th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 13 May 2017, Hilton Fukuoka Sea Hawk Hotel, Fukuoka, Japan

Hiroto Saito. Symposium [From genetics to physiology: for understanding molecular functions and disease mechanisms] Next-Generation Sequencing (NGS) uncovers molecules essential for human physiology. 第94回生理学会大会 2017年3月29日、アクトシティ、浜松

才津浩智. シンポジウム 小児遺伝と最新技術「次世代シーケンスによる分子病態の解明」第39回日本小児遺伝学会学術集会、慶應義塾大学三田キャンパス北館ホール、2016年12月9日、東京

才津浩智. 教育講演 「原因不明の小児神経疾患の遺伝子診断」 第46回小児神経学セミナー、2016年9月17日、湘南国際村センター、神奈川

才津浩智. 招待講演 「次世代シーケンス解析による遺伝子診断～原因不明症例における有用性～」New Insights of Molecular Genetics on Growth Disorders. 2016年7月9日、アポロ・ラーニングセンター、東京

才津浩智. 招待講演 「脳外科疾患における体細胞モザイク変異」 第5回 トランスレーショナルてんかん研究会 2016年5月13日、新潟グランドホテル、新潟

Hiroto Saito. Symposium 「Latest Applications of Automation Systems on the Next Generation Sequencing (NGS)」 10th International Conference of Clinical Laboratory Automation. 2016年4月22日、GLAD Hotel Yeouido, Seoul, Korea

〔図書〕(計 1件)

才津 浩智. メディカルレビュー社、Epilepsy 「難治性てんかんと体細胞変異」、2018、p.33-39

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.hama-med.ac.jp/education/fac-med/dept/biochemistry/index.html>

6. 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：柴崎 香織

ローマ字氏名：SHIBASAKI, kaori

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。