

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 6月 3日現在

機関番号：82611
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22659197
 研究課題名（和文） 新規解析技術を用いた難治性てんかんを伴う大脳皮質異形成の責任遺伝子の探求
 研究課題名（英文） An exploration of causative genes of focal cortical dysplasia with intractable epilepsy, using advanced technologies
 研究代表者
 伊藤 雅之（ITO MASAYUKI）
 独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター 神経研究所疾病研究第二部・室長
 研究者番号：50243407

研究成果の概要（和文）：てんかんの有病率は約1.0%で、その70%は小児期に罹患する比較的頻度の高い疾患である。このうち、小児難治性てんかんは他の障害を合併し日常生活を困難にすることがある。これらてんかんのうち、大脳皮質形成異常（FCD）を原因とするものは少なくない。FCDは大脳皮質の一部分に異形成がみられる疾患であり、臨床的には難治性てんかんを呈する。本研究では、cell sorting 技術と CGH アレイ解析を用いて FCD の原因遺伝子を探求する。

本研究は、当該倫理委員会の承認のもと行なった。対象は4例のFCDと診断され、研究の同意を得た患者DNAである。FCD病巣と血液からDNAを抽出し、Agilent CGH アレイ（SurePrint G3 human CGH マイクロアレイ 1M）を用いて解析を行なった。その結果、4症例に共通の遺伝子はなく、3症例に共通の遺伝子は2つ、2症例に共通の遺伝子は13あった。これら15遺伝子の機能と発現から6遺伝子に絞り込むことができた。今後、患者病理検体を用いた免疫組織化学やイムノブロット等を用いた validation を行い、病因性を追求する。

研究成果の概要（英文）：Intractable epilepsy in childhood has other problems and leads to be difficult to spend daily ability. The major cause of the epilepsy is focal cortical dysplasia (FCD), which shows characteristic dysplasia in a part of cerebral cortex. In the present study, we explore causative genes of FCD formation, using cell sorting technique and CGH (Comparative genomic hybridization) array analysis.

We used DNA samples of 4 FCD patients, whose parents agreed with the research usage under an informed consent. As a result, we obtained no 4-patient common abnormal gene, two 3-patient common abnormal genes and thirteen 2-patient common abnormal genes. Among them, we could pick up six genes for the candidates. We advance further analyses for the goal.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	0	1,200,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	2,800,000	480,000	3,280,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：難治性てんかん、大脳皮質異形成、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

てんかんの有病率は約1.0%で、その70%は

小児期に罹患する比較的頻度の高い疾患で、しばしば日常生活を困難にしている。小児難治性てんかんのうち、先天的な脳形成障害を伴うものは少なくない。近年、脳形成障害のてんかん病巣の脳外科手術による切除や離断などにより良好な経過を取ることがある。一方、こうした疾患の病因・病態の解明は病理標本を用いた免疫組織学的解析や電気生理学的解析にとどまっている。我々は、てんかんを有する滑脳症の GABA 作動性介在神経細胞の移動障害および滑脳症の原因遺伝子 FUKUTIN のヒト脳組織内の発現分布を明らかにし、病態解明をしてきた。また、難治性てんかんの大脳皮質形成異常 (FCD) の神経細胞の K-C1 イオンポンプの異常を解明し、分化異常を明らかにした。FCD は大脳皮質の一部分だけに異形成がみられる疾患である。本研究では、ゲノムの数的異常解析の CGH (Comparative genomic hybridization) アレイ技術と cell sorting 技術を用いて FCD の責任遺伝子の探求を行なう。

2. 研究の目的

小児難治性てんかんの多くは行動異常や知的障害を合併し、しばしば家庭生活や学校生活を困難にする。小児難治性てんかんの中で、先天性脳形成障害を原因とするものは少なくない。大脳皮質形成異常 (FCD) は大脳皮質の一部分に異形成がみられる疾患である。

近年の遺伝子解析技術はゲノムレベルでの網羅的解析を可能にした。新しい遺伝子解析技術である、凍結組織から神経細胞の DNA だけを取り出す cell sorting 法と CGH (Comparative genomic hybridization) アレイ法を用いて FCD の原因遺伝子を探求する。

3. 研究の方法

対象は、FCD と臨床および病理学的に診断された患者由来 DNA。FCD 病巣と血液から DNA を抽出し、高精度 CGH アレイの反応と解析を行なった。Qiagen DNA kit を用いて DNA 抽出を行なった。DNA の処理と CGH アレイの反応と解析した。1 μ g の DNA を Cy3、Cy5 で標識し、Agilent CGH アレイ

(SurePrint G3 human CGH マイクロアレイ 1M) にハイブリダイズ反応を 40 時間行なった。洗浄後、Agilent C scanner と control software でデータを収集し、Agilent Genomic Workbench で、4 症例について解析した。さらに、発現解析を行なった。

4. 研究成果

解析は、4 症例に共通の遺伝子の有無からはじめた。4 症例に共通の遺伝子はなく、3 症例に共通の遺伝子は 2 つ、2 症例に共通の遺

伝子は 13 あった。これらの機能と発現から 6 遺伝子に絞り込むことが出来た。今後、患者検体を用いた validation を進める。

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 9 件)

- ① Inoue T, Kawawakia H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K, Kimura-Ohba S, Inoue T, Hirose S, Shiomi M, Itoh M. A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution and imagings. *J Neurol Sci* 2013;327:65-72. doi: 10.1016/j.jns.2013.01.038. Epub 2013 Feb 16. (査読あり)
- ② Nagai S, Saito Y, Endo Y, Saito T, Kenji Sugai K, Ishiyama A, Komaki H, Nakagawa E, Sasaki M, Ito K, Saito Y, Sukigara S, Ito M, Goto Y, Ito S, Matsuoka K. Hypoalbuminemia in early-onset dentatorubral-pallidolusian atrophy due to leakage of albumin in multiple organs. *J Neurol* 2013;260:1263-1271. doi: 10.1007/s00415-012-6787-9. Epub 2012 Dec 23. (査読あり)
- ③ Arai A, Saito T, Hanai S, Otsuki T, Nakagawa E, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal maturation and differentiation of neocortical neurons in epileptogenic cortical malformation: unique distribution of layer-specific marker cells of focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly. *Brain Res* 2012;1470:89-97. doi: 10.1016/j.brainres.2012.06.009. Epub 2012 Jul 1. (査読あり)
- ④ Sakakibara T, Sukigara S, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Imbalance of interneuron distribution between neocortex and basal ganglia: Consideration of epileptogenesis of focal cortical dysplasia. *J Neurol Sci* 2012; 323: 128-133. doi: 10.1016/j.jns.2012.08.035. Epub 2012 Sep 16. (査読あり)
- ⑤ Sakakibara T, Saito T, Otsuk T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Sato N, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki M,

Goto Y, Itoh M. Delayed maturation of neurons of focal cortical dysplasia IIA and IIB: consideration from specific neocortical-layer marker expression. *J Neuropathol Exp Neurol* 2012; 71 (8): 741-749. DOI: 10.1097/NEN.0b013e318262e41a (査読あり)

- ⑥ Itoh M, Tahimic CGT, Ide S, Otsuki A, Sasaoka T, Noguchi S, Oshimura M, Goto Y, Kurimasa A. Methyl CpG-binding protein isoform MeCP2_e2 is dispensable for phenotypes but essential for embryo viability and placenta development. *J Biol Chem* 2012; 287 (17): 13859-13867. doi: 10.1074/jbc.M111.309864. Epub 2012 Feb 28. (査読あり)
- ⑦ Kuki I, Kawawaki H, Okazaki S, Kimura S, Nakano T, Fukushima H, Inoue T, Tomiwa K, Itoh M. Progressive leukoencephalopathy with intracranial calcification, congenital deafness and developmental deterioration. *Am J Med Genet A* 2011;155:2832-2837. doi: 10.1002/ajmg.a.34256. Epub 2011 Sep 30. (査読あり)
- ⑧ Saito T, Hanai S, Takashima S, Nakagawa E, Okazaki S, Inoue T, Miyata R, Hoshino K, Akashi T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical layer-formation of the human developing brains and lissencephalies: consideration of layer-specific markers expression. *Cereb Cortex* 2011;21:588-596. doi: 10.1093/cercor/bhq125. Epub 2010 Jul 12. (査読あり)
- ⑨ Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Arai A, Otsuki T, Sasaki M, Goto Y, Itoh M. Abnormal development of neurons in focal cortical dysplasia: neuronal mis-maturation from an immunohistochemical consideration. *Seizure* 2010;19:274-279. doi: 10.1016/j.seizure.2010.04.003. Epub 2010 May 8. (査読あり)

[学会発表] (計 6 件)

- ① Itoh M, Okazaki S, Kawawaki H, Inoue T, Goto Y. GABAergic interneurons lead to the epileptogenesis: Interneuron pathology associated with ARX mutation. Symposium 1, Basic Science. The 10th European Congress on Epileptology. London, UK, 1, October, 2012.
- ② Itoh M, Inage Y, Kitamura K, Goto Y, Halliday WC. GABAergic interneuron

pathology: ARX normal development and its mutation. The 10th European Congress of Neuropathology, Edingburgh, UK, 5-9 June, 2012.

- ③ Itoh M, Hanai S, Saito T, Nakagawa E, Sasaki M, Otsuki T, Goto Y. Abnormal maturation of non-dysmorphic neurons in focal cortical dysplasia: immunohistochemical considerations. The 29th International Epilepsy Congress, Rome, Italy, 28 August-1 September, 2011.
- ④ Sakakibara T, Saito T, Otsuki T, Takahashi A, Kaneko Y, Kaido T, Saito Y, Nakagawa E, Sugai K, Sasaki K, Goto Y, Itoh M. Defferent pathophysiology of focal cortical dysplasia IIA and IIB: specific neocortical-layer marker expression. The 29th International Epilepsy Congress, Rome, Italy, 28 August-1 September, 2011.
- ⑤ Itoh M, Okazaki S, Miyata R, Inoue T, Masaharu Hayashi M, Goto Y. ARX contributes to development and differentiation of endocrine cells in human pancreas. The 93rd Annual Meeting & Expo, Boston, USA, 4-7 June, 2011.
- ⑥ Saito T, Okazaki S, Inoue T, Sasaki M, Goto Y, Hayashi M, Itoh M. Neocortical Layer-formation of Human Developing brains and lissencephalies: Consideration of layer-specific marker expression. The 17th International Congress of Neuropathology, Salzburg, Austria, 11-15, September, 2010.

[図書] (計 2 件)

- ① 伊藤雅之. てんかんの病理. 最新医学別冊. 新しい診断と治療の ABC 74. てんかん. 最新医学社. 大阪. 72-82pp, 2012.
- ② 伊藤雅之. 急性脳症の病理. 小児科臨床ピクシス 28 急性脳炎・脳症. 中山書店. 東京. 16-21pp., 2011.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊藤 雅之 (ITO MASAYUKI)
独立行政法人 国立精神・神経医療研究センター・神経研究所疾病研究第二部・室長
研究者番号: 50243407