

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591500

研究課題名(和文) HRM法と次世代シーケンサーによる早期発症てんかん性脳症の新規病因遺伝子同定

研究課題名(英文) Identification of novel causative genes for early-onset epileptic encephalopathies using HRM analysis and next-generation sequencer

研究代表者

加藤 光広 (Kato, Mitsuhiro)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10292434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：早期発症てんかん性脳症(EOEE)の遺伝的原因を明らかにするため、高感度融解曲線分析(HRM)法による既知遺伝子のハイスループット変異スクリーニングと次世代シーケンサーによる網羅的解析を行った。その結果、KCNQ2変異を大田原症候群12例中3例に、SCN2A変異をEOEE328例中15例に、SCN8A変異をEOEE7例で同定した。HRM法と次世代シーケンサーの組み合わせによって、EOEEの遺伝学的原因が効率的に明らかにされた。

研究成果の概要(英文)：To clarify the genetic background of early-onset epileptic encephalopathies (EOEE), we performed high-resolution melting (HRM) analysis as a high-throughput mutation screening method and whole exome sequencing (WES) analysis using next-generation sequencer (NGS). We identified KCNQ2 mutations in 3 of 12 patients with Ohtahara syndrome, SCN2A mutations in 15 of 328 patients with EOEE, and SCN8A mutations in 7 patients with EOEE. A combination of HRM analysis and WES analysis using NGS can efficiently detect the genetic cause of EOEE.

研究分野：小児神経学

キーワード：てんかん 大田原症候群 遺伝子解析 KCNQ2 SCN2A SCN8A イオンチャネル 全エクソーム解析

1. 研究開始当初の背景

てんかん性脳症は原因不明例が多く難治で、頻回のおてんかん発作に伴い知能障害や運動障害をきたすなど予後不良である。1995年に家族性の特発性てんかんの原因遺伝子がオーストラリアのグループによって初めて明らかにされてから (Steinlein et al. Nat Genet 1995)、イオンチャネルの遺伝子変異が主に良性てんかんの原因として数多く同定されたが、てんかん性脳症の原因解析は進んでいなかった。2002年にオーストラリアと欧州グループによって早期発症てんかん性脳症(EOEE)の一つである家族性ウエスト症候群において ARX 遺伝子変異が同定された(Stromme et al. Nat Genet 2002)。我々の日米グループは同雑誌に既に、同じ遺伝子が抑制性介在ニューロンの発生に関与し、その変異によって脳形成異常に伴い生直後から難治のおてんかん発作をきたすことを投稿し分子病態を明らかにしていたため(Kitamura et al. Nat Genet 2002)、早期発症てんかん性脳症の原因解析に本格的に着手し孤発性ウエスト症候群の原因遺伝子を明らかにした(Kato et al. Neurology 2003)。さらに、遺伝性とは考えられていなかった大田原症候群の原因遺伝子として、世界で初めて ARX (Kato et al. Am J Hum Genet 2007)と STXBP1(Saitsu, Kato et al. Nat Genet 2008)を明らかにしたほか、SPTAN1 が白質低形成を伴うウエスト症候群の原因遺伝子であることを同定した (Saitsu et al. Am J Hum Genet 2010)。この一連の研究は EOEE の分子病態を明らかにする画期的な成果として評価され、海外(韓国・ドイツ・イタリア)で招待講演を行い、日本人類遺伝学会(2008年)・日本てんかん学会(2009年)・日本小児科学会(2011年)の各賞を受賞した。2011年8月に国際てんかん学会に関連してフィレンツェで開催された遺伝性早期発症てんかん性脳症のワークショップでは、我々の遺伝解析と臨床コホート研究が他国に比べて質的にも量的にも優れていることを確認した。

2. 研究の目的

原因が判明したてんかん性脳症はまだ一部の症例であり、レンノックス・ガストー症候群など他の早期発症てんかん性脳症では原因が全くわかっていない。我々はこれまで DHPLC 法による変異スクリーニングやサンガー法による塩基配列解析、欠失や重複を検出するアレイ解析を用いてきたが、遺伝子解析技術の進歩と費用の低下は急速に進み、特に次世代シーケンサーは新規原因遺伝子の同定に有力なツールである他、読み取り精度や価格の問題が改善されれば、これまでの遺伝子診断法を一変させる可能性がある。次世代シーケンサーでは多数の遺伝子変異が同定されるため、病因遺伝子の確定のためには次世代シーケンサーによって同定された候補遺伝子を他の複数の症例で確認す

る必要があり、多数検体の一括処理による迅速なハイスループット変異スクリーニングが求められる。HRM(高感度融解曲線分析)法は、リアルタイム PCR 法を用いた融解温度曲線の違いによって塩基配列の違いを検出する方法であり、DHPLC 法よりも迅速に結果が得られコストも低く多数検体の処理に優れている。次世代シーケンサーと HRM 法を組み合わせることで、新規病因遺伝子の同定と効率的な遺伝子診断システムを構築するため、症例集積があり研究が先行している EOEE の解析を行う。

3. 研究の方法

対象疾患:EOEE(大田原症候群、早期ミオクロニー脳症、ウエスト症候群、レンノックス・ガストー症候群、乳児移動性部分発作、未分類例など)

試料採取:患者用説明書に基づき担当医師が、患者もしくは代諾者に遺伝子解析に伴う利益・不利益を説明し、文書で同意(同意書に署名)を得て、患者および両親から血液を採取し山形大学に送付する。リンパ球から DNA を抽出後、TE 緩衝液に溶解する。

臨床情報解析:臨床情報を PC に入力しデータベース化し、遺伝子変異と臨床的特徴の関連性を明らかにする。

HRM 法による既知遺伝子の変異スクリーニング:EOEE の原因遺伝子として既知の ARX, STXBP1, SPTAN1, CDKL5, SLC25A22 の 5 遺伝子と最近判明した JNK3, PLCB1 の 2 遺伝子について Primer3 を用いて、各遺伝子の近傍イントロンを含む全コードエクソンに対して HRM 法に適切な 350 塩基対以下になるようにプライマーを設計し、HRM 法で変異スクリーニングを行う。異常融解曲線を認められた検体についてサンガー法による塩基配列解析を行ない、野生型塩基配列と対照し変異を同定する。HRM 法で異常を認めない検体は新規原因遺伝子同定のリサーチリソースとして保管する

次世代シーケンサーによる新規病因候補遺伝子の選定:既知遺伝子変異が認められない症例に対して、Agilent 社の SureSelect もしくは Roche/Nimblegen 社の SeqCap EZ Exome を用いてゲノム上のエクソン領域を選択的にキャプチャーし、高効率に濃縮してから、HiSeq2000 もしくは Genome Analyzer IIx (ともに illumina 社)を用いて全エクソンシーケンシングを行う。この方法は、病的変異が集中するエクソンおよびスプライスサイトに対する極めて効率的な変異スクリーニングであり、RefSeq 遺伝子の 99%を解析可能である。また、健常のご両親の検体が得られる場合にはご両親も全エクソンシーケンシングを行い、患児での de novo 変異を探索する。

4. 研究成果

3年間でEOEE 221例のDNAと臨床情報が集積された。遺伝子解析については、初年度は、HRM法やSanger法によってARX変異とSTXBP1変異を除外した大田原症候群12例に対し次世代シーケンサーを用いた全エクソームシーケンス(WES)を行い、3例にKCNQ2のミスセンス変異を同定した(Saitsu, Kato, et al. Ann Neurol 2012))。2年度は、EOEE328例の解析(HRM287例、WESのみ6例、HRMとWES35例)を行い、大田原症候群9例、West症候群1例、分類不能5例にSCN2A変異を同定し、SCN2A変異がEOEEを引き起こすことを明らかにした。SCN2Aは電位依存性ナトリウムチャンネルNa_vα1.2を構成し、2004年に1歳発症のEOEE1例と良性家族性新生児乳児痙攣8家系で変異が報告され、主に良性てんかんの原因と考えられていた。本研究によって、SCN2Aは大田原症候群の第四の原因遺伝子であり、良性てんかんとてんかん性脳症の原因が共通することを明らかにした(Nakamura, Kato, et al. Neurology 2013)。今年度はSCN8A変異を分類不能のEOEE6例、乳児移動性部分発作1例で同定した(Ohba, Kato, et al. Epilepsia 2014)。本研究によってHRM法と次世代シーケンサーの組み合わせによって、EOEEの変異スクリーニングが効率的に行われることを明らかにした。KCNQ2, SCN2A, SCN8A以外の既知遺伝子は当初計画した7個の遺伝子以外にも、昨年度、乳児移動性部分てんかんの原因遺伝子としてKCNF1が同定されるなど、20個異常の候補遺伝子が存在する。HRM法は少ない遺伝子数を調べるには費用対効果の高い遺伝子変異スクリーニング法であるが、調べるエクソン数に比例して、費用と労力が増加してしまう。次世代シーケンサーの解析費用は急速に低下しており、選択した数十個の候補遺伝子のみを解析するカスタムキャプチャー法では、多数検体の一括処理を行うことができるため、遺伝子(もしくはエクソン)1個あたりの費用対効果はHRM法をしのぐようになりつつある。その一方、全エクソーム解析の費用も低下し、カスタムキャプチャー法との費用対効果比は急速に改善している。今後は次世代シーケンサーによるカスタムキャプチャー法と全エクソーム解析を併用して網羅的な変異スクリーニングを行う予定である。

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 19 件)

1. Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M,

- Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H: Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo SCN8A mutations. Epilepsia 2014;55(7):994-1000 doi: 10.1111/epi.12668 査読有
2. Nakamura K, Kato M, Osaka H, Yamashita S, Nakagawa E, Haginoya K, Tohyama J, Okuda M, Wada T, Shimakawa S, Imai K, Takeshita S, Ishiwata H, Lev D, Lerman-Sagie T, Cervantes-Barragan DE, Villarreal CE, Ohfu M, Writzl K, Gnidovec Strazisar B, Hirabayashi S, Chitayat D, Myles Reid D, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H: Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome. Neurology 2013;81(11):992-998 doi: 10.1212/WNL.0b013e3182a43e57 査読有
3. Kodera H, Kato M, Nord AS, Walsh T, Lee M, Yamanaka G, Tohyama J, Nakamura K, Nakagawa E, Ikeda T, Ben-Zeev B, Lev D, Lerman-Sagie T, Straussberg R, Tanabe S, Ueda K, Amamoto M, Ohta S, Nonoda Y, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Hayasaka K, King MC, Matsumoto N, Saitsu H: Targeted capture and sequencing for detection of mutations causing early onset epileptic encephalopathy. Epilepsia 2013;54(7):1262-1269 doi: 10.1111/epi.12203 査読有
4. Kato M, Yamagata T, Kubota M, Arai H, Yamashita S, Nakagawa T, Fujii T, Sugai K, Imai K, Uster T, Chitayat D, Weiss S, Kashii H, Kusano R, Matsumoto A, Nakamura K, Oyazato Y, Maeno M, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito K, Hayasaka K, Matsumoto N, Saitsu H: Clinical spectrum of early onset epileptic encephalopathies caused by KCNQ2 mutation. Epilepsia 2013;54(7):1282-1287 doi: 10.1212/WNL.0b013e3181f4d7bf 査読有
5. Saitsu H, Kato M, Koide A, Goto T, Fujita T, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Hayasaka K, Matsumoto N: Whole exome sequencing identifies KCNQ2 mutations in Ohtahara syndrome. Ann Neurol 2012;72(2):298-300 doi:

10.1002/ana.23620 査読有

〔学会発表〕(計 41 件)

1. 加藤光広:乳幼児てんかん性脳症の例の遺伝子診断－臨床症状から解析法の選択について. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会:東京 タワーホール船堀 2014 年 11 月 20-22 (シンポジスト)
2. 大場ちひろ、加藤光広、高橋悟、寺嶋宙、久保田雅也、川脇壽、松藤まゆみ、小島泰子、館野昭彦、中島光子、西山精視、鶴崎美德、三宅紀子、田中章景、才津浩智、松本直通: SCN8A の de novo 変異が原因となる乳児期早期発症の難治性てんかんについての検討. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会:東京 タワーホール船堀 2014 年 11 月 20-22 日
3. Kato M: Interneuronopathies and genetics of the epileptic encephalopathies. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress: Singapore, August 7-10, 2014 (招待講演)
4. 加藤光広:次世代シーケンス技術を用いた小児神経稀少難病研究の現状と今後. 第 117 回日本小児科学会学術集会:名古屋 名古屋国際会議場 2014 年 4 月 11-13 日 (教育講演)
5. Nakamura K, Saitsu H, Kato M, (他 27 名), Matsumoto N: Clinical spectrum of SCN2A mutations expanding to Ohtahara syndrome: Involvement of chromosomal aberrations in patients with early epileptic encephalopathy. 30th International Epilepsy Congress, June 23 – 27, 2013 Montreal, Canada
6. Kato M: The genetic background of cortical dysplasias. 2013 Cortical Dysplasia Symposium, Children's Epilepsy Association of Taiwan. January 13, 2013, Tainan, Taiwan (招待講演)
7. Kato M: Genetics in Epilepsy, update. Annual Autumn Meeting of the Korean Child Neurology Society, October 12, 2012, Busan, Korea (招待講演)

〔図書〕(計 6 件)

1. 加藤光広:その他のてんかん発作を呈する神経疾患の遺伝子異常. 日本てんかん学会編集 てんかん専門医ガイドブック 診断と治療社 東京 18-20, 2014

〔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 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Ped/medical/neurology_03.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 光広 (KATO MITSUHIRO)
昭和大学医学部・講師
研究者番号: 1 0 2 9 2 4 3 4

(2)研究分担者

高橋 信也 (TAKAHASHI NOBUYA)
山形大学医学部・医員
研究者番号: 2 0 5 3 6 9 5 8

菊池 貴洋 (KIKUCHI TAKAHIRO)
山形大学医学部・医員
研究者番号: 0 0 5 9 4 3 0 0

中村 和幸 (NAKAMURA KAZUYUKI)
山形大学医学部・医員
研究者番号: 2 0 4 3 6 2 1 5

(3)連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO NAOMICHI)
横浜市立大学医学(系)研究科(研究院)
教授
研究者番号: 8 0 3 2 5 6 3 8

才津 浩智 (SAITSU HIROTOMO)
横浜市立大学医学(系)研究科(研究院)
准教授
研究者番号: 4 0 4 0 2 8 3 8