

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2004～2008

課題番号：16109006

研究課題名（和文） てんかんの分子病態の解析

研究課題名（英文） Analysis of molecular biology of epilepsy

研究代表者

兼子 直 (KANEKO SUNAO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40106852

研究成果の概要：

(1)各種てんかん類型の責任遺伝子を同定し、モデル動物の基準を満たす世界初のヒトてんかん遺伝子導入モデル動物作出に成功した。このラットを用い、分子病態を解析し、病態補正の可能性、その臨界期の存在を明らかにし、根治療法開発への突破口を開いた。(2)遺伝情報から最適の抗てんかん薬(AED)の種類と至適量を選択する個別化治療開発の基本フレームを提案した。(3)てんかんの遺伝子診断用DNA chip(プロトタイプ)を世界に先駆けて開発した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	32,000,000	9,600,000	41,600,000
2005年度	17,800,000	5,340,000	23,140,000
2006年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007年度	13,600,000	4,080,000	17,680,000
2008年度	13,000,000	3,900,000	16,900,000
総計	92,200,000	27,660,000	119,860,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学・神経内科学

キーワード： ゲノム, シグナル伝達, 神経科学, 脳神経疾患, 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

てんかんは人口の0.6%が罹患する最も頻度が高い神経疾患である。しかし、その25-30%は抗てんかん薬(AED)で発作が抑制されず、外科治療可能な症例は年間500～6

00例に過ぎない。しかも現状のAED療法には発作型からAEDを選択し、至適投与量を探るというtry and errorの期間が付きまとい、医療経済的にも負担が大きいの。

2. 研究の目的

てんかんの責任遺伝子を明らかにし、遺伝情報に基づいたてんかんの個別化治療開発に必要な基本的資料を提案する。

3. 研究の方法

責任遺伝子の同定とその機能解析、AED への反応性予測に必要な遺伝要因を同定し、薬力学・薬物動態学的支援情報を組み込んだ個別化治療のデータベースを構築する。モデル動物としての3基準を満たす遺伝子改変動物を作出し、てんかんの分子病態解析から根治療法開発の可能性を探る。

4. 研究成果

(1) てんかんの責任遺伝子の同定

Juvenile myoclonic epilepsy(JME)の遺伝子 EFHC1 の同定(Nat Genet)、3人種間の EFHC1 の頻度同定 (Neurology, 2008)。全般発作症例で type Ca²⁺ channel 異常 (CACNA1G) (Hum Mutation, 2007)。KCNQ2、KCNQ3 変異を benign familial neonatal convulsion (BFNC)、benign neonatal convulsion(BNC)で同定した (Brain Dev, 2009、等)。BFNC で KCNQ2 の microsomal deletion を見だし一部症例は CHRNA4 の deletion を伴った(Neurology in revision)。BFIC で LGI4 遺伝子多型との関連を解析した (Human Genet in contribution)。乳児重症ミオクローニーてんかん(SMEI)、GEFS+で多数の SCN1A、SCN2A の変異を発見。SCN1A の変異を見出せなかった SMEI の 20% に microsomal deletion を同定 (Epilepsia, 2008)。JME、GEFS+、SMEI、BFNC・BNC・NFLE 患者で網羅的に K⁺チャネルを解析し、新たな変異と多数の SNPs を同定 (投稿中)。ゲノムワイドスクランで疾患感受性遺伝子群の loci を同定し (Epilepsy and Seizure, 2008)、異なる症例群(1000 症例)と新たな解析方法で座位を絞り込みつつある。側頭葉てんか

んモデル AP3M2 遺伝子欠損マウス (J Cell Biol)を作出し、てんかん症例で16個のAP3M2 遺伝子 SNPs を発見した (NCBI dbSNP database)。

(2) 遺伝子の機能解析とその迅速化方法の開発

同定した変異遺伝子の電気生理学的機能を解析し(Neurology, Epilepsia, Epilepsy Res, 等)、KCNQ3 の Q309R 変異は K⁺電流が発生しないことが BFNC の病態に関連する (Epilepsy Res, 2009)。同定した ADNFLE 遺伝子(CHRNA4 : S284L 変異)を組み込んだモデル動物の3基準を満たす世界初のてんかんモデルラット(S284L-TG)を作出し、その病態と睡眠中に発作が起こる原因を明らかにした (J Neurosci, 2008)。CHRNA4 の5種の変異(S284L、V287L、V287M、S280F と insL)の遺伝子改変ラットを作成し、BFNC の責任遺伝子 KCNQ2 (W309R)のノックインマウス、側頭葉てんかんモデル AP3M2 欠損マウスも作出了 (順次、特許出願中)。S284L-TG で epileptogenesis と ictogenesis に関わる脳内標的タンパク候補を同定し、XXX の治療で S284L-TG のてんかんは根治が可能であり、臨海時期が存在し、XXXによる治療で膜電位機能も正常化する (Nat Neurosci in preparation)。AP3M2 遺伝子欠損マウスは GABA 細胞内輸送動態の変化と temporoammonic pathway の異常亢進が、病態に関与する (J Cell Biol など)。DNA microarray 解析と PCR で染色体欠損部位に存在する遺伝子同定法を開発した (BBRC, 2006)。

(3) 個別化治療の開発

AED のクリアランスを生理因子 (年齢、性別、体重) 環境因子 (AED 投与量、併用薬) 遺伝因子 (CYP 多型) から NONMEM 法で算出するモデルを設定し、AED の反応予測 (TDM, 2007, 2008; 等) transporter 多型と AED 反応の関

連を解析 (Br J Clin Pharmacol, 2008)。
世界初のプロトタイプのでんかん遺伝子診断用 DNA chip を開発した。個別化治療システムの基本フレーム (AED の作用機序、遺伝情報、CYP・transporter・脳内作用点の多型、NONMEM による AED クリアランスモデルを data base として設定

(<http://www.epigene.org/mutation/>)

(Expert Rev Clin Pharmacol, 2008) 詳細は国際てんかん学会 (ブタペスト 2009 年 6 月)、10 月の国際シンポジウム Pharmacogenomics in Epilepsy (弘前) で提案する。SCN1A 変異と重症度 (phenotype) はチャネル上のアミノ酸変異部位 (Neurology) とアミノ酸置換に関連する polarity, molecular volume, polar requirement, hydrophathy, isomeric point の解析から、SCN1A 変異を持つ症例の phenotype を推定可能である (J Med Genet 2009)。

(4)薬物動態学的・力学的特性の解析

AED 作用機序を標的タンパク中心に解析し (Pharmacogenet Genomics, 2008 等) 薬剤選択の根拠をまとめ (Expert Rev Clin Pharmacol, 2008) 製剤が異なる VPA の体内薬物動態を比較検討した (Drug Design, Development & Therapy, 2008)。

すべての CYP、transporter 遺伝子 (MDR1、MRP2) 型頻度を 1000 人の日本人で決定し、AED への反応性、日本人には存在しない多型を明らかにし (in preparation) さらに個別化治療に CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4/5 が重要で (Br J Clin Pharmacol, 2008、等)、transporter のインパクトは低いことも指摘した (Expert Rev Clin Pharmacol, 2008)。

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〕(報告書の件数 250 件)

1. Kanai K, Yoshida S, Hirose S, Oguni H, Kuwabara S, Sawai S, Hiraga A, Fukuma G, Iwasa H, Kojima T, and Kaneko S. Physico-chemical property changes of amino acid residue accompanied with missense mutations in *SCN1A* affect the epilepsy phenotype severity. JMG 2009; in press. 査読有
2. Sugiura Y, Nakatsu F, Hiroyasu K, Ishii A, Hirose S, Okada M, Jibiki I, Ohno H, Kaneko S, Ugawa Y. Lack of potassium current in W309R mutant KCNQ3 channel causing benign familial neonatal convulsions (BFNC). Epilepsy Res. 2009; 84(1): 82-5. 査読有
3. Nishio T, Ohta T, Kaneko S, and Shimizu T. Sequence Selection for Multiple Alignments of Transmembrane Proteins. Information 2009; 12: 235-42. 査読有
4. Abe T, Seo T, Ishitsu T, Nakagawa T, Hori M, Nakagawa K. Association between SCN1A polymorphism and carbamazepine-resistant epilepsy. Br J Clin Pharmacol 66, 304-307, 2008. 査読有
5. Okada Y, Seo T, Wanibuchi A, Hashimoto N, Higa Y, Ishitsu T, Nakagawa K. Population estimation of the effects of cytochrome P450 2C19 and 3A5 polymorphisms on zonisamide clearance. Ther Drug Monit 30, 540-543, 2008. 査読有
6. Yoshida S, Miyashita A, Kuwano R, Kojima T, Sasaki T, Zhu G, Kanai K, Fujita H, Hirose S, Kaneko S, & Epilepsy Genetic Study Group Japan. Genome-wide identification of febrile seizure and releted epilepsy

- phenotype loci. *Epilepsy & Seizure* 2008; 1(1): 30-9. 査読有
7. **Kaneko S**, Yoshida S, Kanai K, Yasui-Furukori N, & Iwasa H. Development of individualized medicine for epilepsy based on genetic information. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2008; 1(5): 661-81. 査読有
 8. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Ueno S, Mori F, Takahata T, Saito R, Miura Y, Kishi A, Tomiyama M, Sato A, Kojima T, Fukuma G, Wakabayashi K, Hase K, Ohno H, Kijima H, Takano Y, Mitsudome A, **Kaneko S**, Hirose S. Rats harboring S284L *Chrna4* mutation show attenuation of synaptic and extrasynaptic GABAergic transmission and exhibit the nocturnal frontal lobe epilepsy phenotype. *J Neurosci*. 2008; 28(47): 12465-76. 査読有
 9. Wang JW, Kurahashi H, Ishii A, Kojima T, Ohfu M, Inoue T, Ogawa A, Yasumoto S, Oguni H, Kure S, Fujii T, Ito M, Okuno T, Shirasaka Y, Natsume J, Hasegawa A, Konagaya A, **Kaneko S**, Hirose S. Microchromosomal deletions involving SCN1A and adjacent genes in severe myoclonic epilepsy in infancy. *Epilepsia* 2008;49(9):1528-34. 査読有
 10. Medina MT, Suzuki T, Alonso ME, Duron RM, Matinaz IE, Bailey JN, Bai D, Inoue Y, Yoshimura I, **Kaneko S**, Montoya MC, Ochoa AJ, Tanaka M, Machado-Salas J, Fujimoto S, Ito M, Hamano S, Sugita K, Ueda Y, Osawa M, Oguni H, Rubio-Donnadieu F, Yamakawa K, and Deidacio-Escueta AV. Novel mutations in Myoclonin1/EFHC1 in sporadic and familial juvenile myoclonic epilepsy. *Neurology* 2008; 70(22 Pt 2): 2137-44. 査読有
 11. Yoshida S, Okada M, Zhu G, **Kaneko S**. Carbamazepine prevents breakdown of neurotransmitter release induced by hyperactivation of ryanodine receptor. *Neuropharmacology*. 2007; 52(7): 1538-46. 査読有
 12. Singh B, Monteil A, Bidaud I, Sugimoto Y, Suzuki T, Hamano S, Oguni H, Osawa M, Alonso ME, Delgado-Escueta AV, Inoue Y, Yasui-Furukori N, **Kaneko S**, Lory P, Yamakawa K. Mutational analysis of CACNA1G in idiopathic generalized epilepsy. Mutation in brief #962. Online. *Hum Mutat*. 2007; 28(5): 524-5. 査読有
 13. Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, Takeuchi T, Itohara S, Yanagawa Y, Obata K, Furuichi T, Hensch TK, Yamakawa K. Na_v1.1 Localizes to Axons of Parvalbumin-Positive Inhibitory Interneurons: a Circuit Basis for Epileptic Seizures in Mice Carrying an *Scn1a* Gene Mutation. *J Neurosci* 2007; 27(22): 5903-14. 査読有
 14. Kojima T, Mukai W, Fuma D, Ueda Y, Okada M, Sakaki Y, **Kaneko S**. Determination of genomic breakpoints in an epileptic patient using genotyping array. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341:792-796. 査読有
 15. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Ueno S, Wakabayashi K, **Kaneko S**. Effects of interleukin-1beta on hippocampal

- glutamate and GABA releases associated with Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releasing systems. *Epilepsy Res.* 2006; 71(2-3): 107-16. 査読有
16. Zhu G, Okada M, Yoshida S, Mori F, Hirose S, Wakabayashi K, Kaneko S. Involvement of Ca^{2+} -induced Ca^{2+} releasing system in interleukin-1beta-associated adenosine release. *Eur J Pharmacol.* 2006; 532(3): 246-52. 査読有
17. Inoue K, Yamada J, Ueno S, and Fukuda A. Brain-type creatine kinase activates neuron-specific K^+ -Cl⁻ co-transporter KCC2. *J Neurochem.* 2006. 96(2): 598-608. 査読有
18. Yoshida S, Okada M, Zhu G, Kaneko S. Effects of zonisamide on neurotransmitter exocytosis associated with ryanodine receptors. *Epilepsy Res.* 2005; 67(3): 153-62. 査読有
19. Mori F, Okada M, Tomiyama M, Kaneko S, Wakabayashi K. Effects of ryanodine receptor activation on neurotransmitter release and neuronal cell death following kainic acid-induced status epilepticus. *Epilepsy Res.* 2005; 65(1-2): 59-70. 査読有
20. Okada M, Yoshida S, Zhu G, Hirose S, Kaneko S. Biphasic actions of topiramate on monoamine exocytosis associated with both soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors and Ca^{2+} -induced Ca^{2+} -releasing systems. *Neuroscience.* 2005; 134(1): 233-46.

査読有

21. Huang CW, Ueno S, Okada M, Kaneko S. Zonisamide at clinically relevant concentrations inhibits field EPSP but not presynaptic fiber volley in rat frontal cortex. *Epilepsy Res* 2005; 67:51-60. 査読有
22. 査読有 Suzuki T, Delgado-Escueta AV, Aguan K, Alonso ME, Shi J, Hara Y, Nishida M, Numata T, Medina MT, Takeuchi T, Morita R, Bai D, Ganesh S, Sugimoto Y, Inazawa J, Bailey JN, Ochoa A, Jara-Prado A, Rasmussen A, Ramos-Peek J, Cordova S, Rubio-Donnadieu F, Inoue Y, Osawa M, Kaneko S, Oguni H, Mori Y, and Yamakawa K. Mutations in EFHC1 cause juvenile myoclonic epilepsy. *Nat Genet* 2004; 36(8): 842-9. 査読有
- 他 228 件

〔学会発表〕(計 76 件)

1. Kaneko S, Yoshida S, Kanai K, Iwasa H, Yasui-Furukori N, and Epilepsy Genetic Study Group Japan. Development of individualized medicine for epilepsy based upon genetic polymorphisms. 2008 International Conference on Pharmacogenomics (Joint Conference with the 14th Annual Meeting of the PRACP), 2008.4.9-12, Busan, KOREA , 他 75 件

〔図書〕(計 1 件)

1. 兼子直. てんかんの生物学的背景 - 病態解明から個別化治療の開発へ - . てんかん - 臨床的側面 - . 松下正昭, 加藤敏, 神庭重信編. 精神医学対話. 1002-14. 2008.5.31, (株)弘文堂・東京

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

名称: てんかんモデル非ヒトモデル哺乳動物

発明者: 兼子直, 廣瀬伸一

権利者: 兼子直, 廣瀬伸一

種類: 特願

番号: 2008-031002

出願年月日: 平成21年2月10日

国内外の別: 国際(PCT), 他1件

取得状況(計6件)

名称: けいれん性疾患に関連する遺伝子変異
とけいれん性疾患診断方法

発明者: 小島俊男, 廣瀬伸一, 岡田元宏, 兼子直

権利者: 小島俊男, 廣瀬伸一, 岡田元宏, 兼子直

種類: 特願

番号: 2005-155133

出願年月日: 2006.12.7 公開

国内外の別: 国内

名称: てんかんモデル動物(CHRNA4:S284L)

発明者: 廣瀬伸一, 兼子直, 岡田元宏, 斉藤亮

権利者: 廣瀬伸一, 兼子直, 岡田元宏, 斉藤亮

種類: 特願

番号: 2004-062907

出願年月日: 2005.9.15 公開

国内外の別: 国際(PCT), 他4件

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

兼子 直(KANEKO SUNAO)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 40106852

(2)研究分担者

和田 一丸(WADA KAZUMARU)

弘前大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号: 60241486

岡田 元宏(OKADA MOTOHIRO)

三重大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 10281916

古郡 規雄(YASUI-FURUKORI NORIO)

弘前大学・医学部附属病院・講師

研究者番号: 20333734

清水 俊夫(SHIMIZU TOSHIO)

弘前大学・大学院理工学研究科・教授

研究者番号: 00110750

小島俊男(KOJIMA TOSHIO)

理化学研究所・ゲノム情報比較解析研究チ

ーム・チームリーダー

研究者番号: 00311349

上野 伸哉(UENO SHINYA)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 00312158

福澤 雅志(FUKUSAWA MASASHI)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号: 10231557

中川 和子(NAKAGAWA KAZUKO)

熊本大学・大学院医学薬学研究部・教授

研究者番号: 20284747

廣瀬 伸一(HIROSE SHINICHI)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号: 60248515

山川 和弘(YAMAKAWA KAZUHIRO)

理化学研究所・神経遺伝研究チーム・チ

ームリーダー

研究者番号: 30241235

(3)連携研究者

佐藤 敬(SATOH KEI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 20125438

辻 省次(TSUJI SHOJI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号: 70150612

桑野 良三(KUWANO RYOZO)

新潟大学・脳研究所・准教授

研究者番号: 20111734

荒木 喜美(ARAKI KIMI)

熊本大学・発生医学研究センター・准教

授

研究者番号: 90211705

若林 孝一(WAKABAYASHI KOICHI)

弘前大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号: 50240768