

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591198

研究課題名（和文） 小児脳疾患における介在ニューロンの病態解明

研究課題名（英文） Pathological role of interneurons in pediatric brain disorders

研究代表者 加藤光広

加藤 光広（KATOH MITSUHIRO）

山形大学・医学部・講師

研究者番号：10292434

研究成果の概要：新生児期に難治性のてんかん発作を発症し重度の発達遅滞をきたす大田原症候群の原因遺伝子(*ARX*)を明らかにした。*ARX* は大脳介在ニューロン(iN)の発生に関与する。大田原症候群の病態に iN が関与することが証明された。大田原症候群は精神遅滞(2~3 残基追加)やウエスト症候群(7 残基追加)よりも長いポリアラニン配列の伸長変異(11 残基追加)を有し、年齢依存性の発症機序・病態が反復配列の伸長数の違いによることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：小児神経学，年齢依存性てんかん性脳症，大田原症候群，ウエスト症候群，介在ニューロン，*ARX* 遺伝子，ポリアラニン病

1. 研究開始当初の背景

大脳皮質の神経細胞はグルタミン酸を神経伝達物質とする興奮性の投射ニューロン（錐体細胞）と、アミノ酪酸(GABA)を神経伝達物質とする抑制性の介在ニューロン（非錐体細胞または顆粒細胞）の二つに大別される。これまでは、70-80%を占める投射ニューロンが機能的に主に注目されていたが、数的には 20-30%の介在ニューロンのほうが、形態・生理・分子・シナプスの特徴においてより広範な表現型を示すことが明らかにされてきている(Markram et al. Nature Review Neuroscience 5;793-807,2004)。*ARX* 遺伝子

は GABA 作用性の介在ニューロンに特異的に発現し、胎生期における介在ニューロンの産生・移動・分化に関与する。我々は、*ARX* 遺伝子の変異によりヒトの脳形成障害「外性器異常を伴う X 連鎖性滑脳症(XLAG)」が起きることを明らかにし、介在ニューロンの選択的な障害によっておきる疾患を世界で初めて報告した(Kitamura et al. Nature Genetics 32;359-69,2002, Kato et al. Human Molecular Genetics 12;R89-96,2003)。また、同じ *ARX* 遺伝子の異なる変異が、脳形成障害を伴わないてんかん(West 症候群または点頭てんかん)の原因となることも明らかにした

(Kato et al. Neurology 61;267-8,2003)。同時期にフランスとオーストラリア・北欧の2つのグループは、ARX 遺伝子が X 連鎖性精神遅滞の原因であることを報告し(Stromme et al. Nature Genetics 30:441-5,2002; Bienvenu et al. Human Molecular Genetics 11:981-91,2002)、我々もさらに水無脳症や脳梁欠損症の原因であることを明らかにした(Kato et al. Human Mutation 23;147-59,2004)。このように ARX 遺伝子は、遺伝型と表現型の強い相関関係を示し、類をみない多彩な疾患を引き起こすが、共通の病態として介在ニューロンの関与があり、新しく「介在ニューロン病 interneuronopathy」の概念を提唱した(kato et al. J Child Neurology 20;392-7,2005, Kato Epilepsy Research 70;S87-95)。その後、滑脳症の原因遺伝子である DCX や LIS1 も、投射ニューロンに加え介在ニューロンの発生にも関わることが報告され、ヒト脳疾患においても介在ニューロンの重要性が注目されてきている。

2. 研究の目的

大田原症候群は 1976 年に日本ではじめて報告・確立された代表的な年齢依存性てんかん性脳症であり、新生児期に発症し、乳児期にウエスト症候群に変化し重度の発達遅滞をきたす。大田原症候群は脳形成障害に合併することが多く、症候性てんかんに分類され、原因遺伝子の解析が遅れていた。本研究では、小児脳疾患の病態解明のために、介在ニューロンの役割に着目して、遺伝子解析を行い、小児脳疾患における介在ニューロンの役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 検体採取・保存

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 10ml（乳児では 5ml）を採取し、5ml を EDTA 入りの試験管に、5ml をヘパリン入りの試験管（乳児は EDTA 試験管のみ）に注入後混和し、DNA を抽出後、TE 緩衝液に溶解する。

(2) 既知遺伝子変異スクリーニング

すでにヒト疾患原因遺伝子として同定されている ARX 遺伝子の変異スクリーニングを行う。抽出 DNA を ARX 遺伝子の flanking intron を含め、PCR 法を用いて増幅後、電気泳動し、変異頻度が高いエクソン 2 の前半は直接塩基配列解析を行い、その他は DHPLC で変異スクリーニングを行い、異常なヘテロデュプレックスパターンを認めた PCR 産物について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。

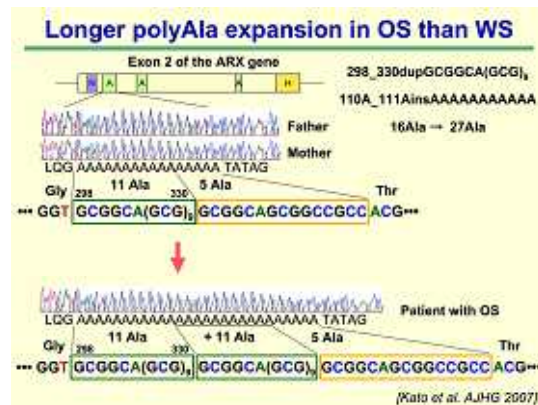
(3) 新規遺伝子探索

上記で異常を認めなかった症例について、高密度オリゴヌクレオチドアレイを用いて全ゲノム領域の変異解析を行う。

4. 研究成果

外性器低形成を伴う大田原症候群の 2 症例に ARX 遺伝子変異をみいだした。これは世界で初めての大田原症候群の原因遺伝子 (ARX) の報告である。ARX 遺伝子は GABA 作用性の脳介在ニューロンの発生に関与し、内部にポリアラニン配列を有し、アラニンの伸長数に応じ精神遅滞（2～3 残基追加）やウエスト症候群（7 残基追加）をきたす。大田原症候群では、既報告の伸長数よりも長い伸長変異（11 残基追加）を呈していた(図 1)。

図 1



これにより大田原症候群が、推測通り介在ニューロンの機能異常により生じることが証明された。ポリアラニンの伸長変異は、長さに比例して転写抑制機能が増強する機能獲得変異であり、年齢依存性の発症機序・病態が反復配列の伸長数の違いによることも明らかにされた。(図 2)

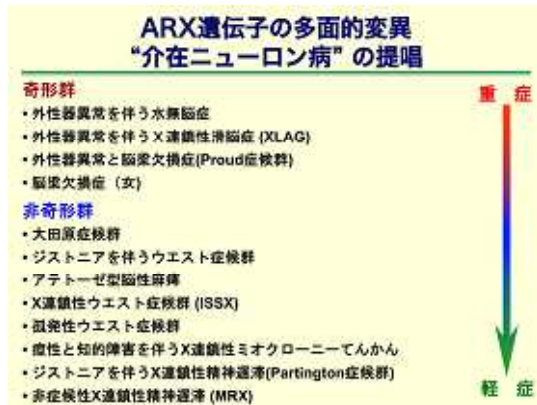
図 2



よって、大田原症候群は介在ニューロンの発

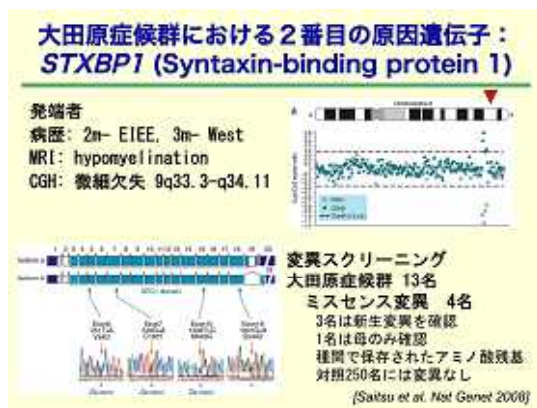
生に關与する ARX 遺伝子変異という共通基盤を，精神遲滞やウエスト症候群と共有し，介在ニューロン病と考えられる症例の存在が明らかにされた。(図3)

図3



ARX に異常を認めなかった大田原症候群でさらに新規原因遺伝子探索を行い，アレイ解析により1例で微細欠失を認め，候補遺伝子解析により13例中4例で *STXBPI* 遺伝子に新生変異を同定した(図4)。*STXBPI* はシナプス小胞の開口放出に關与する MUNC18-1 蛋白質の遺伝子であり，神経伝達物質の分泌障害が大田原症候群の原因に關与していると考えられた。てんかんの原因としてこれまでイオンチャネルの遺伝子変異が多く報告されているが，シナプス小胞の開口放出障害という新しいてんかん発症機序を示唆する成果であり，今後てんかんの病態解明，治療戦略に対し新しい突破口を切り開くことができた。

図4



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)

Hiraki Y, Okamoto N, Ida T, Nakata Y, Kamada M, Kanemura Y, Yamasaki M, Fujita H, Nishimura G, Kato M, Harada N, Matsumoto N. Two new cases of pure 1q terminal deletion presenting with brain malformations. Am J Med Genet A 146: 1241-1247 (2008) 査読有

Saitou H, Kato M, Mizuguchi T, Hamada K, Osaka H, Tohyama J, Uruno K, Kumada S, Nishiyama K, Nishimura A, Okada I, Yoshimura Y, Hirai S, Kumada T, Hayasaka K, Fukuda A, Ogata K, Matsumoto N. De novo mutations in the gene encoding STXBPI (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. Nat Genet 40: 782-788, (2008) 査読有

Tohyama J, Akasaka N, Osaka H, Maegaki Y, Kato M, Saito N, Yamashita S, Ohno K. Early onset West syndrome with cerebral hypomyelination and reduced cerebral white matter. Brain Dev 30: 349-355, (2008) 査読有

Guerrini R, Moro F, Kato M, Barkovich AJ, Shiihara T, McShane MA, Hurst J, Loi M, Tohyama J, Norci V, Hayasaka K, Kang UJ, Das S, Dobyns WB: Expansion of the first PolyA tract of ARX causes infantile spasms and status dystonicus. Neurology 69:427-33, (2007) 査読有

Kato M, Saitoh S, Kamei A, Shiraishi H, Ueda Y, Akasaka M, Tohyama J, Akasaka N, Hayasaka K: A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). Am J Hum Genet 81:361-6, (2007) 査読有

Honda S, Hayashi S, Kato M, Niida Y, Hayasaka K, Okuyama T, Imoto I, Mizutani S, Inazawa J. Clinical and molecular cytogenetic characterization of two patients with non-mutational aberrations of the FMR2 gene. Am J Med Genet Part A 143A:687-693, (2007) 査読有

Shimokaze T, Kato M, Yoshimura Y, Takahashi Y, Hayasaka K: A case of acute cerebellitis accompanied by autoantibodies against glutamate receptor delta 2. Brain Dev 29:224-226, (2007) 査読有

Shiihara T, Kato M, Konno A, Takahashi Y, Hayasaka K. Acute cerebellar ataxia and consecutive cerebellitis produced by glutamate receptor delta2 autoantibody. Brain Dev 29:254-256, (2007) 査読有

加藤光広：神経細胞移動障害の分子機構。『日本小児科学会雑誌』111(11):1361-1374, 2007 査読無

〔学会発表〕(計 7 件)

Kato M, Nakamura K, Matsumoto N, Osaka H, Hayasaka K: Candidate genes (ARX, CDKL5, and SLC25A22) mutation screening for early-onset epileptic encephalopathy. The 4th Congress of the Asian Society for Pediatric Research, Honolulu, Hawaii, USA; May 3-6, 2008

Kato M: Interneuronopathy bridging the gap between brain malformations and functional disorders. The 3rd German-Japanese Symposium Pediatric Neurology, Munich, Germany; September 9-10, 2008

Kato M, Saitoh S, Shiraishi H, Tohyama J, Akasaka N, Hayasaka K: Early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome) is caused by longer polyalanine expansion mutation of the ARX gene than West syndrome. The 9th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Cebu; January 24-27, 2007

Kato M, Saitoh S, Kamei A, Shiraishi H, Ueda Y, Akasaka M, Tohyama J, Akasaka N, Hayasaka K: A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes Ohtahara syndrome. The 10th Annual Meeting of the Infantile Seizure Society International Symposium on Biology of Seizure Susceptibility, Tokyo; April 7-8, 2007

Goto Y-I, Nakagawa E, Takano K, Inazawa J, Okazawa H, Kato M, Kubota T, Kurosawa K, Saitoh S, Nanba E, Matsumoto N, Toda T, Wada T: Construction of research resource depository in Japan and molecular genetics study on genetic diseases with mental retardation. The 13th International Workshop on Fragile X and X-Linked Mental Retardation, Venezia Lido, Italy; October 3-6, 2007

Sudi J, Kato M, Mancini G, Toutain A, Das S, Christian S, Dobyns W: Severe mutations of ARX are associated with an abnormal phenotype in most heterozygous females but not in mothers of affected children. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA; October 23-27, 2007

Kato M, Saitoh S, Kamei A, Shiraishi H, Ueda Y, Akasaka M, Tohyama J, Akasaka N, Kumada S, Kubota M, Nakamura K, Hayasaka K: Early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst (Ohtahara syndrome) is caused by a longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene. 57th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics, San Diego, USA; October 23-27, 2007

〔図書〕(計 5 件)

Kato M, Saitoh S, Kamei A, Shiraishi H,

Ueda Y, Akasaka M, Tohyama J, Akasaka N, Hayasaka K: Genetic etiology of age-dependent epileptic encephalopathies in infancy: longer polyalanine expansion in ARX causes earlier onset and more severe phenotype. Biology of Seizure Susceptibility in Developing Brain. Progress in Epileptic Disorders Series, Vol. 6 Editions John Libbey Eurotext, Montrouge (Paris), France 75-86, 2008

加藤光広: 脳形成障害. 五十嵐隆総編集 岡明専門編集「小児科臨床ピクシス 小児てんかんの最新医療」2章 てんかんの原因 中山書店 東京 28-31, 2008

加藤光広: 神経系の発生, 中枢神経系奇形, migration の異常. 有馬正高監修「小児神経学」2章. 神経形成異常 診断と治療社 30-39, 2008

加藤光広: 脳回形成異常(無脳回, 厚脳回, 多小脳回, 滑脳症). 『小児中枢神経疾患の画像診断 2008』小児内科 2007 Vol. 39 増刊号 東京医学社 198-202, 2007

加藤光広: 中枢神経系の発生異常の遺伝学的背景. 『小児神経学の進歩』第 36 集 診断と治療社 47-57, 2007

〔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

<http://www.id.yamagata-u.ac.jp/Ped/pedi.top.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 光広(KATOH MITSUHIRO)

山形大学・医学部・講師

研究者番号: 10292434

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

小島 俊男(KOJIMA TOSHIO)

理化学研究所・応用システムバイオロジー研究チーム・チームリーダー

研究者番号: 00311340

中村 和幸(NAKAMURA KAZUYUKI)

山形大学・医学部・医員

研究者番号: 20436215