

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19790729

研究課題名（和文） 熱性けいれんの病態解析と疾患感受性遺伝子の同定

研究課題名（英文） Investigation of molecular mechanisms of febrile seizures and identification of the FS susceptibility genes

研究代表者

田中 珠美（TANAKA TAMAMI）

九州大学・大学院医学研究院・研究員

研究者番号：60423547

研究成果の概要：

4つの炎症性サイトカイン遺伝子（IL6、IL8、IL10、TNFA）のプロモーター領域の SNP について、FS 患者 249 例（単純型 186 例、複雑型 63 例）と対照 225 例で検討した。IL10-592A/C SNP に FS との有意な相関を認めため、プロモーター領域の 2 つの SNP（IL10-1082A/G, -819T/C）を追加してハプロタイプ解析を行った。さらに幼若ラットを用いた温熱誘発けいれんモデルで IL-10 の生体内での役割を調べた。IL10-592C アレルと IL10-1082A/-819C/-592C ハプロタイプの頻度は、対照と比較して FS において有意に少なかった。けいれん閾値温度は IL-10 を投与したラットでは生理食塩水群だけを投与した対照ラットと比較して有意に高かった。IL10 遺伝子は、IL1B 遺伝子とは反対に、熱性けいれんの遺伝的抵抗性に関連していることが示された。遺伝子関連解析は、動物モデルでの解析と組み合わせることで、熱性けいれん発症の分子機構を理解するのに有用な方法となる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	480,000	3,780,000

研究分野：小児科学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：熱性けいれん、遺伝子多型、関連解析

1. 研究開始当初の背景

熱性けいれんは感染や遺伝的要因など多因子が関わり発症する。患者の髄液や血清中の生化学的検討やモデル動物を用いた検討が行われてきたが、その病因・病態は不明な点が多い。孤発例の大部分は多因子遺伝の可能性が考えられ、これまでに熱性けいれん関連

てんかんである乳児重症ミオクロニーてんかんの原因遺伝子であるイオンチャネルや発熱関連物質の遺伝子多型を用いた関連解析が行われているが、少ないサンプル数の解析がほとんどで、解析結果について一定した見解が得られていない。

研究代表者が所属する研究室では、これまでにこれまでの報告で最多である約250例の非血縁熱性けいれん患者のDNAサンプルを集積し関連解析を行ってきた。その結果IL1B遺伝子プロモーター領域の多型が単純型熱性けいれん孤発例の発症と関連していることを明らかにした(Kira et al. *Neurosci Lett.* 2005)。症例数を増やして検討したところ、更にp値が小さくなることを見出している。

2. 研究の目的

熱性けいれんの病因・病態には異質性があり、発熱疾患による潜在的な脳障害によるものや、てんかんによる症例が一部含まれるが、本研究では、大部分の熱性けいれん患者の主要因であると想定される「純粋な熱性けいれん感受性素因」を最終的に明らかにしたいと考えている。この素因は1) 感染に対する全身性免疫応答。2) 高体温または発熱への中枢神経系の反応、の個人差を見出すことにより解明される。具体的には、病態解析として、熱性けいれん患者と発熱にもかかわらずけいれんを起こさなかった者との違いを明らかにするために、末梢血単核球の遺伝子発現を解析する。また原因解析として、候補遺伝子に関して関連解析を行い、疾患感受性遺伝子の同定を行う。

3. 研究の方法

病態関連分子の網羅的解析

1) 対象者よりの末梢血単核球の分離

インフォームドコンセントを得た後、熱性けいれん患者、および年齢・性が一致した健常コントロールから全血を採取し、LSM(ICN社)を用いて濃度勾配法により単核球を分離する。

2) 分離細胞からのmRNAの抽出と増幅

分離した細胞からRNA抽出キット(Isogen, ニッポンジーン社)とPhenol, Chloroform, Isoamyl Alcohol (Invitrogen社)のプロトコールにより高純度のRNAを抽出し、RNAリニア増幅キット(RiboAmp RNA Amplification Kit, Ambion社)を用いた増幅を行う。

3) DNAマイクロアレイ解析

Fluorescence Labeling Core Kit (TaKaRa社)を用いて蛍光ラベルした後、患者および健常人由来のmRNAをAtlas Glass Human 3.81 Microarray (Clontech社)にハイブリダイゼーションし、DNAマイクロアレイ解析装置FLA-8000を用いたスキャニングと解析ソフトウェアArray Versionによるデータ処理を行う。マイクロアレイデータ用統計解析ソフト(Gene Spring, Agilent社)を用いて有意な遺伝子の選定、クラスター解析を行う。

4) 疾患感受性同定に有用と思われる遺伝子を定量PCR法で確認

定量PCRはABI PRISM 7700 Sequence Detector (現有設備)を用いたリアルタイムPCR法で、その感度と特異度を調べ、生物学的マーカーとして使用可能かどうか検証する。

関連解析による熱性けいれん感受性遺伝子の同定

1) 候補遺伝子の選出

熱性けいれんやてんかんの病因・病態との関連がこれまでに報告されている分子・遺伝子を候補にして関連解析を行う。網羅的解析により熱性けいれんの病態に関連した分子あるいは遺伝子が選出できれば候補遺伝子として解析する。サイトカイン・神経栄養因子・神経伝達物質やその受容体、シグナル伝達関連分子がその候補遺伝子として推定される。未知の遺伝子に関してはホモロジーサーチによりその構造から機能を推定する。

2) 候補遺伝子における多形性の解析

候補遺伝子の機能的遺伝子多型を、パイオインフォマティクスを用いて検索する。遺伝子多型が未知である場合にはプロモーター領域を中心にダイレクトシーケンスを用いて機能変化をもたらす遺伝子多型を検索する。またHapMap (The International HapMap Consortium, Nature 2003)を参考に一塩基多型の選択とハプロタイプ解析を行う。

3) 遺伝子多型の同定法

多型領域を含むようにプライマーを設計し、採取したDNAを鋳型にしてPCR法で増幅する。PCR増幅はTaKaRa PCR Thermal Cycler Personalを用いて行う。遺伝子多型のうち一塩基多型についてはPCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)、TaqMan SNP Genotyping Assay (ABI社)で解析する。SSCPにはGene Gel Excel 12.5/24 (Pharmacia Biotech社)を、マイクロサテライト解析にはPRISM 310 genetic analyzer (Perkin-Elmer社)を用いる。田入れ区シーケンスが必要な場合にはPRISM 310 genetic analyzer (Perkin-Elmer社)を用いる。

4) 関連解析による熱性けいれん感受性遺伝子の同定

候補遺伝子の遺伝子型頻度、アレル頻度に関して臨床データ(年齢、性、単純型/複雑型、発症年齢、発作回数、家族歴など)をもとにサブグループに分けて統計解析を行う。

4. 研究成果

4つの炎症性サイトカイン遺伝子のプロモーター領域のSNP(IL6 -572C/G, IL8 -251A/T, IL10 -592A/C, TNFA -1037C/T)について、FS患者249例(単純型186例、複雑型63例)と対照225例で検討した。IL10 -592A/C SNPにFSとの有意な相関を認めため、プロモーター領域の2つのSNP(IL10 -1082A/G,

-819T/C) を追加してハプロタイプ解析を行った。さらに幼若ラットを用いた温熱誘発けいれんモデルで IL-10 の生体内での役割を調べた。IL10 -592C アレルと IL10 -1082A /-819C /-592C ハプロタイプの頻度は、対照と比較して FS において有意に少なかった(それぞれ $p=0.014, 0.013$)。けいれん閾値温度は IL-10 を投与したラットでは生理食塩水群だけを投与した対照ラットに比較して有意に高かった ($p=0.027$)。IL10 遺伝子は、IL1B 遺伝子とは反対に、熱性けいれんの遺伝的抵抗性に関連していることを示唆する。

ウイルス核酸の受容体である Toll-like receptor (TLR)3、TLR7、TLR9 とこれらの機能を制御している UNC93B1 について、熱性けいれん発症との関連を明らかにするため、一塩基多型 (SNP) を用いて患者対照研究を行った。UNC93B1 の intron7 にある rs308328 において、熱性けいれん患者の G アレルの頻度 (36.8%) が対照 (29.7%) と比べ有意に高かった ($p=0.02$)。UNC93B1 遺伝子が熱性けいれん特に複雑型に関連することが示唆された。UNC93B1 は家族性単純ヘルペス脳炎の原因遺伝子であることが最近報告されており、ウイルスの直接侵襲による炎症性病変が、熱性けいれん特に複雑型の病態に関与している可能性がある。

中枢神経系の酸塩基平衡と呼吸調節に関与する遺伝子が、熱性けいれん発症に関与しているか明らかにするために、

【対象と方法】SLC4A3 (AE3) 遺伝子、SLC9A1 (NHE1) 遺伝子、SLC9A3 (NHE3) 遺伝子について一塩基多型 (SNP) を使用して患者対照研究を行った。HapMap (The International HapMap Consortium) を参考に検出力の強い SNP を選択した (rs635311; exon16 867Ala → Asp, rs5810; 3' UTR, rs2247114; exon16 799Cys → Arg)、熱性けいれん患者 249 名 (単純型孤発例 118 名、単純型家族例 68 名、複雑型 63 名) と健常対照 225 名について、TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて遺伝子型を決定し、カイ二乗検定で関連解析を行った。統計学的検討では遺伝子型頻度、アレル頻度に患者と対照で有意差を認めず、サブグループの解析でも有意差を認めなかった。動物モデルで観察される多呼吸は、ヒトの熱性けいれんの際には明らかでないことも多い。AE3 の 867Asp は特発性全般性てんかんに関連することが報告されている (Epilepsy Res. 2002)。今回検討した遺伝子は熱性けいれん感受性には関連しないと考えられた。

興奮性アミノ酸であるグルタミン酸はけいれんのメカニズムにおいて重要な役割を果たし、シナプス間隙においてグルタミン酸濃

度は厳格な制御を受けている。興奮性アミノ酸トランスポーターである EAAT2 遺伝子は、グルタミン酸の再取り込みに関連し、その発現が熱性けいれん感受性とパラレルに動いており、1-2 歳で発現が高く、その後緩やかに低下する (Neurosci Lett. 2007)。そこで EAAT2 遺伝子の 2 ヶ所の SNP について熱性けいれん患者 249 名 (単純型孤発例 118 名、単純型家族例 68 名、複雑型 63 名) と健常対照 225 名について、TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて遺伝子型を決定し、カイ二乗検定で関連解析を行った。統計学的検討では遺伝子型頻度、アレル頻度に患者と対照で有意差を認めず、サブグループの解析でも有意差を認めなかった。

GABA 受容体遺伝子の γ サブユニットの変異は熱性けいれん関連てんかんである熱性けいれんプラスの責任遺伝子の一つである (Nat Genet. 2001)。体温上昇時には GABA 受容体は神経細胞膜表面に trafficking され神経興奮の抑制作用を示すが熱性けいれんプラスで見られる遺伝子変異では trafficking が障害される。GABA 受容体の膜への trafficking に関与する分子である PRIP-1 について 2 ヶ所の SNP について、熱性けいれん患者 249 名 (単純型孤発例 118 名、単純型家族例 68 名、複雑型 63 名) と健常対照 225 名について、TaqMan SNP Genotyping Assay を用いて遺伝子型を決定し、カイ二乗検定で関連解析を行った。統計学的検討では遺伝子型頻度、アレル頻度に患者と対照で有意差を認めず、サブグループの解析でも有意差を認めなかった。

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 1 件)

Hoshina T, Yamaguchi Y, Ohga S, Kira R, Ishimura M, Takada H, Tanaka T, Hara T. Sjogren's syndrome-associated meningo-encephalomyelitis: cerebrospinal fluid cytokine levels and therapeutic utility of tacrolimus. J Neurol Sci. 2008 Apr 15;267(1-2):182-6. 査読あり

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 珠美 (TANAKA TAMAMI)

九州大学・大学院医学研究院・研究員

研究者番号：60423547

(2) 研究分担者

()

研究者番号：