

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：37111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791201

研究課題名(和文)小児交互性片麻痺の分子病態の解明

研究課題名(英文)The clarification of molecular pathology of alternating hemiplegia of childhood.

研究代表者

石井 敦士(Ishii, Atsushi)

福岡大学・医学部・助手

研究者番号：90568825

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：小児交互性片麻痺(AHC)は生後早期の異常な眼球運動で発症することが多く、1歳半までに発作性の片麻痺を呈す。また、てんかんや多彩な不随意運動を随伴症状とする。特異的検査所見はなく、治療法も確立されたものはない。

我々はAHC責任遺伝子を同定することを目的に、次世代シーケンサーでの全エクソーム解析をAHC患者8名に対して施行した。その結果、8名全員でATP1A3遺伝子にミスセンス変異をヘテロ接合で認めた。両親に変異は存在せず、ATP1A3遺伝子のヘテロ接合での新生ミスセンス変異がAHCを引き起こすことが解明できた。また、遺伝子型と表現型解析によりE815K変異患者では有意な相関を認めた。

研究成果の概要(英文)：Alternating hemiplegia of childhood (AHC) has an onset of an abnormal eye movement during the early years of life and paroxysmal hemiplegia in the first year and a half. In addition, AHC has associated symptoms that are epilepsy and a variety of involuntary movements. There are not specific examination findings and established treatments.

Exome sequencing was performed for the 8 patients with typical AHC to identify a responsible gene. As a result, each patient harbored a heterozygous missense ATP1A3 mutation. These mutations were not found in the parents. We elucidated that a de novo heterozygous missense mutation in the ATP1A3 gene is a cause of AHC. In addition, we found out the significant correlation between phenotype and E815K mutation.

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 遺伝子 ATP1A3 てんかん 不随意運動 エクソーム解析 イオンチャネル 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

小児交互性片麻痺(AHC)は100万人出生に1人の罹患とされる極めて稀な小児神経疾患と報告されていた。本邦で約50人とされている。生後2~3か月ごろに異常な眼球運動で発症することが多く、続いて6~7か月ごろ片麻痺、又は四肢麻痺や、ジストニアが出現する。麻痺は数十分から数日続き、睡眠中は麻痺発作が改善することが特徴である。一般に意識レベルは保たれているが、軽度の障害をきたすこともある。不随意運動としてジストニアや舞踏アテトーゼ運動が発作間欠期に常時現れるようになる症例もある。けいれんは6歳頃出現する症例が多く、強直発作や強直間代性発作を来すことが多い。これらの発作性のエピソードに伴って認知機能は低下する。最終的には重度の知的障害や麻痺の固定化による寝たきり状態に至る疾患である。血液・尿中のアミノ酸、血液・髄液に異常は見られない。また、多彩な症状や進行性の経過にも関わらず、画像上は脳病変を欠く奇異な特徴を有する。脳波でも発作間欠期には脳波異常を認めないことが多く、突発波はまれである。その臨床像は神経解剖学的に説明できず、病態は全く不明であった。治療においては、抗てんかん薬や鎮静薬が試みられるがほとんど有効性は見られない。しかし、経験的にflunarizineが片麻痺発作の持続時間と程度を改善すると報告されている。flunarizineは電位依存性カルシウムチャンネルブロッカーであるが、電位依存性ナトリウムチャンネルにも作用する。

また、臨床的にAHCと症状が重なる片麻痺性片頭痛で電位依存性P/Q型カルシウムチャンネルの1Aサブユニットを構成するCACNA1A遺伝子とATP依存性Na⁺/K⁺ポンプの2サブユニットを構成するATP1A2遺伝子での遺伝子変異が報告され、AHCでも検索されたが変異は見いだされなかった1,2)。常染色体優性遺伝形式をとる家族性小児交互性片麻痺の1家系で全罹患者にt(3;9)(p26;q34)の転座が報告された3)。9q34には電位依存性P/Q型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットを構成するCACNA1B遺伝子が座しているが検索の報告はない。

乳児期より発症し、神経解剖学的に特徴的な臨床像を呈するが、各種臨床検査に特異的異常がなく、チャンネル作用薬に反応する、チャンネル異常による類縁疾患の存在より何らかの遺伝子の異常が示唆されていた。

2. 研究の目的

AHCは上記のように発作性疾患であり、ジストニアやアテトーゼといった不随運動を呈し、全身性けいれんを表出する。すなわち病態基盤には神経の興奮と抑制のバランスの破綻を来すチャンネルの異常によるものと考えられる。これまで欧米を中心にチャンネル遺伝子検索が行われており、またflunarizineの薬理作用からもナトリウムチ

ヤネルとカルシウムチャンネルの異常によることが示唆された。

そこで、AHCを“チャンネル異常”との作業仮説を立て、チャンネル遺伝子変異を同定することによりAHCの確定診断が可能となると考えた。また同定した遺伝子異常を電気生理学的、細胞生物学的に検証し、分子レベルでの病態解明を行うことで未解明な病因を解明できると考えた。

本研究ではAHCの分子病態を明らかにするため、責任遺伝子の同定と、その遺伝子異常による病態の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 責任遺伝子の探索

採取済み患者DNAに加え、患者主治医と小児交互性片麻痺親の会(AHCの会)

(<http://www0088.upp.so-net.ne.jp/ahc/>)の協力のもと患者DNAを採取した。

候補チャンネル、受容体として、電位依存性ナトリウムチャンネルのサブユニットを構成するSCN1A遺伝子と電位依存性P/Q型カルシウムチャンネルの1Bサブユニットを構成するCACNA1B遺伝子を優先に行った。また類縁疾患である片麻痺性片頭痛の責任遺伝子であるATP1A2、CACNA1A遺伝子、てんかん関連遺伝子のSCN1A遺伝子も対象とし、直接塩基決定法で変異探索した。

候補遺伝子に対する直接塩基決定法で有意な変異同定ができなかったため、新学術領域「ゲノム支援」の支援を受け、発端者8名に対して次世代シーケンサーにて全エクソーム解析をおこなった。

8名のエクソーム解析で排出された全バリエーションに対して、新規変異、非同義置換変異、脳神経発現遺伝子、PolyPhen-2とGrantham scoreで影響力の強い遺伝子のフィルターにて選別した。この遺伝子の中で多数で共有されるものに対して、新生変異の仮説のもと両親に対してサンガーシーケンスを実施し、新生変異を同定した。

また、8名以外の収集した検体に対して、サンガーシーケンスで同定した遺伝子の変異を探索した。

(2) ATP1A3変異解析

全エクソーム解析で同定したATP1A3遺伝子の変異を継続して探索した。

(3) 遺伝子型・表現型の解析

遺伝子変異型と表現型の相関を求めるため、遺伝子解析対象者の臨床情報を収集し、発症年齢、発達、麻痺発作、てんかん発作、治療薬について解析した。

(4) 変異遺伝子の機能解析

培養細胞に *ATP1A3* 遺伝子の cDNA を導入し強制発現させた。その後、ウエスタンブロットにて蛋白発現、RT-PCR にて mRNA の発現を検証した。また、*ATP1A3* 遺伝子産物である ATP ポンプの機能である ATPase 活性を測定した。

パッチクランプ法を用いて ATP ポンプ能力を検証した。

- (5) *ATP1A3* 遺伝子変異導入マウスの作成
Cre-LoxP と TALEN s 技術を用いて、患者にて同定した変異を導入したモデルマウスの作成を実施。

4. 研究成果

AHC 症例 8 名に対して、*CACNA1A*, *CACNA1B*, *SCN1A*, *ATP1A2* 遺伝子の全エクソンでの変異をサンガー法で探索したが有意な変異は同定できなかった。

そこで、ゲノム支援の支援を受け、次世代シーケンサーで全エクソーム解析を AHC 典型症例 8 名に対して行った。*De novo* 仮説を建て、マイナー・アレル頻度 0.005 未満の rare variant と中枢神経発現遺伝子で責任遺伝子の選別を行った。一塩基置換での合計 712,558 個の全バリエント、13,517 個の遺伝子より発端者 4 人以上に共通した *CNTN4*, *SYEN1*, *ATP1A3* 遺伝子の 3 個まで絞り込みを行った。これら変異に対して *in silico* 解析を行い、何れの変異もタンパク構造に大きく変化を与える変異であった。サンガー法での発端者に対する変異確認と両親と健常者 96 名に対して同変異を探索した。*CNTN4* は次世代シーケンサーのエラー、*SYEN1* の変異は健常者にみられるものがあり polymorphism と判断した。一方、*ATP1A3* は発端者 8 人全員にヘテロ接合でのミスセンス変異を認め、同変異は両親に存在しなかった。また、追加症例として孤発患者 2 名をサンガーシーケンスで解析し *de novo* でのミスセンス変異をヘテロ接合で同定した。以上より、AHC の責任遺伝子として *ATP1A3* 遺伝子を見出し報告した。

ATP1A3 遺伝子は Na⁺-K⁺ ATPase ポンプの 3 サブユニットをコードし、植物から霊長類まで高い相同性をもつ。この Na⁺-K⁺ ATPase ポンプは ATP 依存性に Na イオンを細胞外に K イオンを細胞内に取り込むことによりイオンバランスと電荷の恒常性を保つことが知られている。また、中枢神経内では サブユニットと結合し細胞膜に存在している。

ATP1A3 遺伝子は 2004 年に青年期から成人で発症する Rapid onset dystonia parkinsonism (RDP) の責任遺伝子として同定されていた。RDP で同定された変異は蛋白発現量の低下によるハプロ不全をもたらすことが知られていた。

これまでに合計 52 名の AHC 患者に対して *ATP1A3* 遺伝子変異を探索し約 88% の検出となった。また、E815K 変異と D801N 変異が 70% 程度占めていた。その結果、感度の高い遺伝

子検査として臨床現場に提供することにより、正確な確定診断が可能となった。

同定した変異の中で RDP に同定されたものと同じ変異を同定した。このことから、AHC と RDP の表現型の違いには他の修飾因子が存在することが示唆された。

また、解析患者・主治医に対して臨床症状調査を実施し *ATP1A3* 遺伝子の変異型と症状の相関を解析した。その結果、E815K 変異症例において麻痺発作、発達予後で重症であることが判明した。E815K 変異症例では 6 歳頃までの発達は他の変異と同じだが、6 歳時に多くがてんかん重積発作を起こし、この発作を契機に精神運動発達が退行することが判明した。しかし、塩酸フルナリジン投与群では、てんかん重積発作は有意に少なく、それに伴い、精神運動発達遅滞が抑制されていた。本解析結果を世界にいち早く報告した。

同定した変異に対して、培養細胞を用いて機能解析を実施した。*ATP1A3* 遺伝子に ATP ポンプ阻害剤であるウワバインに耐性を示す 2 つの変異を導入した cDNA に、同定した変異を導入し、培養細胞に強制発現後、培養細胞内性 ATP ポンプをウワバインにて阻害した。この培養細胞より蛋白質と mRNA を抽出し定性した。何れの変異体も *ATP1A3* 蛋白、mRNA 共に発現していた。その結果、ATPase 酵素活性の低下が示唆された。同様に変異を導入した細胞を用いて ATPase 活性を測定し、活性低下を確認した。しかし、RDP においてもハプロ不全にて ATPase 活性は低下しており、AHC ではポンプ機能の影響が考えられた。

そこで、現在、HEK 細胞に発現した変異型 ATP ポンプに対してパッチクランプ法にて電気生理学的検証を実施している。

また、重症型である E815K と頻出変異である D801N と同じ変異をもつ遺伝子改変マウスを Cre-LoxP 法で作成中であり、組み替えコンストラクトは完成した。

また、12% において変異を同定できていない為、第 2 の責任遺伝子同定を目的に、本症例に対してトリオでのエクソーム解析を実施している。

今後は、更なる修飾因子や、患者神経細胞にて機能解析を行うため、AHC 患者由来 iPS 細胞の樹立を目指している。

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. Sasaki M., Ishii A., Saito Y., Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2014;29(1):153-154. Epub 2013/10/15.
2. Heinzen E. L., Arzimanoglou A., Brashear A., Clapcote S. J., Gurrieri

- F., Goldstein D. B., Johannesson S. H., Mikati M. A., Neville B., Nicole S., Ozelius L. J., Poulsen H., Schyns T., Sweadner K. J., van den Maagdenberg A., Vilsen B., for the A. T. P. A. Working Group. Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol.* 2014;13(5):503-514. Epub 2014/04/18.
3. Ishii A., Kanaumi T., Sohda M., Misumi Y., Zhang B., Kakinuma N., Haga Y., Watanabe K., Takeda S., Okada M., Ueno S., Kaneko S., Takashima S., Hirose S. Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy. *Epilepsy Res.* 2014;108(3):420-432. Epub 2014/02/01.
 4. Sasaki M., Ishii A., Saito Y., Morisada N., Iijima K., Takada S., Araki A., Tanabe Y., Arai H., Yamashita S., Ohashi T., Oda Y., Ichiseki H., Hirabayashi S., Yasuhara A., Kawawaki H., Kimura S., Shimono M., Narumiya S., Suzuki M., Yoshida T., Oyazato Y., Tsuneishi S., Ozasa S., Yokochi K., Dejima S., Akiyama T., Kishi N., Kira R., Ikeda T., Oguni H., Zhang B., Tsuji S., Hirose S. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology.* 2014;82(6):482-490. Epub 2014/01/17.
 5. Kouga T., Shimbo H., Iai M., Yamashita S., Ishii A., Ihara Y., Hirose S., Yamakawa K., Osaka H. Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome. *Brain Dev.* 2014;10.1016/j.braindev.2014.04.003. Epub 2014/05/14.
 6. Ishii A., Yoshimura K., Ideguchi .h, Hirose S. A Pancreatic Solid Pseudo-Papillary Tumor Detected After Abdominal Injury. *Gastroenterology Research.* 2013;6(2):67-70.
 7. Ishii A., Saito Y., Mitsui J., Ishiura H., Yoshimura J., Arai H., Yamashita S., Kimura S., Oguni H., Morishita S., Tsuji S., Sasaki M., Hirose S. Identification of ATP1A3 mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLOS ONE.* 2013;8(2):e56120. Epub 2013/02/15.
 8. Ishii A., Yasumoto S., Ihara Y., Inoue T., Fujita T., Nakamura N., Ohfu M., Yamashita Y., Takatsuka H., Taga T., Miyata R., Ito M., Tsuchiya H., Matsuoka T., Kitao T., Murakami K., Lee W. T., Kaneko S., Hirose S. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* 2013;35(6):524-530. Epub 2012/10/18.
 9. Ishii A., Shioda M., Okumura A., Kidokoro H., Sakauchi M., Shimada S., Shimizu T., Osawa M., Hirose S., Yamamoto T. A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. *Gene.* 2013;531(2):467-471. Epub 2013/09/14.
 10. Inoue T., Hattori K., Ihara K., Ishii A., Nakamura K., Hirose S. Newborn screening for Fabry disease in Japan: prevalence and genotypes of Fabry disease in a pilot study. *J Hum Genet.* 2013;58(8):548-552. Epub 2013/05/17.
 11. 石井 敦土, 廣瀬 伸一. 小児神経学の新たな展開 ゲノム科学による病因不明・難治性小児神経疾患の病態解明への戦略. *日本小児科学会雑誌.* 2013;117(9):1383-1388.
 12. Shi X., Wang J., Kurahashi H., Ishii A., Higurashi N., Kaneko S., Hirose S. On the likelihood of SCN1A microdeletions or duplications in Dravet syndrome with missense mutation. *Brain Dev.* 2012;34(8):617-619. Epub 2011/12/31.
 13. Ishii A., Yasumoto S., Ihara Y., Inoue T., Fujita T., Nakamura N., Ohfu M., Yamashita Y., Takatsuka H., Taga T., Miyata R., Ito M., Tsuchiya H., Matsuoka T., Kitao T., Murakami K., Lee W. T., Kaneko S., Hirose S. Genetic analysis of PRRT2 for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choreoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev.* 2012;10.1016/j.braindev.2012.09.006. Epub 2012/10/18.
 14. Ishii A., Miyajima T., Kurahashi H., Wang J. W., Yasumoto S., Kaneko S., Hirose S. KCNQ2 abnormality in BECTS: Benign childhood epilepsy with centrotemporal spikes following benign neonatal seizures resulting from a mutation of KCNQ2. *Epilepsy Res.* 2012;102(1-2):122-125. Epub 2012/08/14.
 15. Wang J. W., Shi X. Y., Kurahashi H., Hwang S. K., Ishii A., Higurashi N., Kaneko S., Hirose S., Epilepsy Genetic Study Group Japan. Prevalence of SCN1A mutations in children with suspected

Dravet syndrome and intractable childhood epilepsy. *Epilepsy Res.* 2012;102(3):195-200. Epub 2012/12/01.

16. 井原 由紀子, 石井 敦土, 日暮 憲道, 内田 琢, 中村 友紀, 友納 優子, 廣瀬 伸一. 【てんかん治療の最前線】 てんかんの分子病態. *Medical Science Digest.* 2012;38(7):292-295.
17. 廣瀬 伸一, 日暮 憲道, 中村 友紀, 黄 壽卿, 石井 敦土. 【知っておきたい てんかん診療】 てんかんと社会 てんかんと遺伝子. *Modern Physician.* 2012;32(3):282-288.
18. 石井 敦土, 内田 琢, 中村 友紀, 廣瀬 伸一. 【抑制性シナプスの基礎と臨床】 疾患とその治療における抑制性シナプスの意義 てんかんにおける GABA 受容体と K+チャネルの異常. *Clinical Neuroscience.* 2012;30(12):1397-1400.
19. 廣瀬 伸一, 日暮 憲道, 中村 友紀, 黄 壽卿, 石井 敦土. 【臨床に役立つ てんかんの最新情報】 てんかん遺伝子診断は臨床に役立つか? *神経内科.* 2011;74(5):460-466.

〔学会発表〕(計9件)

(国際学会・シンポジウム)

1. Ishii A., Saito Y., Mitsui J., Ishiura H., Yoshimura J., Arai H., Yamashita S., Kimura S., Oguni H., Morishita S., Tsuji S., Sasaki M., Hirose S. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japan, 30th International Epilepsy Congress. P937, 26 June 2013.
2. Ishii A. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of AHC in Japanese patients, Symposium *ATP1A3* in Disease. Brussels, Belgium, 10 - 11 December 2012
3. Ishii A., Yasumoto S., Ihara Y., Inoue T., Fujita T., Nakamura N., Ohfu M., Lee WT., Kaneko S., Hirose S. Genetic analysis of *PRRT2* for benign infantile epilepsy, infantile convulsions with choleoathetosis syndrome, and benign convulsions with mild gastroenteritis. 2012 Korea Epilepsy Congress, Incheon, Jun 8, 2012.
4. Ishii A., Saito Y., Sasaki M., Hirose S. Genetic analysis of Alternating Hemiplegia of Childhood, 10th European Congress of Epileptology, London, Sep 30, 2012

(国内学会・シンポジウム)

1. 石井敦土、佐々木征行、斎藤義朗、廣瀬伸一、小児交互性片麻痺の病因遺伝子である *ATP1A3* の同定と現状について、

10490、第55回小児神経学会総会、大分、2013年5月31日

2. 石井敦土、佐々木征行、廣瀬伸一、小児交互性片麻痺の責任遺伝子である *ATP1A3* の同定、第474回日本小児科学会福岡地方会、2013年4月13日
3. 石井敦土、小児交互性片麻痺の原因遺伝子を見つける意義とは、新学術「ゲノム支援」公開シンポジウム「次世代ゲノム科学の最前線」2013年2月19日 京都大学
4. 石井敦土、小児交互性片麻痺の分子病態の解明、24-7「脳形成異常を主とする発達期障害の病因・態と治療に関する研究」22-6「発達障害の診断および治療法に関する臨床研究」班合同シンポジウム、2012年11月24日、国立精神・神経医療研究センター
5. 石井敦土、遺伝子研究からのてんかんの分子病態の解明を目指して、第22回遺伝医学セミナー、2012年9月8日、ホテル阪急エキスポパーク

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

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:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 敦土 (ISHII, Atsushi)

福岡大学・医学部・助手

研究者番号: 90568825

(2)研究分担者
該当なし

()

研究者番号：

(3)連携研究者
該当なし

()

研究者番号：