

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860781

研究課題名(和文)全エクソン解析によるてんかん性脳症の表現型に關与する遺伝学的修飾因子の検討

研究課題名(英文) Whole Exome sequencing for genetic modifiers associated with phenotype of epileptic encephalopathy

研究代表者

中村 和幸 (Nakamura, Kazuyuki)

山形大学・医学部・助教

研究者番号：20436215

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：てんかん性脳症の遺伝的背景を明らかにするため、全エクソン解析を行った。まず、非典型的レット症候群と分類不能てんかん性脳症の2家系にGRIN2A遺伝子変異を同定した。これまでに非定型的レット症候群ではGRIN2A変異は報告されていない。この成果により、GRIN2A変異による疾患スペクトラムがより広いものであることが明らかとなった。

次に、てんかんを伴う原発性小頭症・脳形成異常において、1例にASPM遺伝子の複合ヘテロ変異を同定した。本例は、より重度な精神運動発達遅滞を呈し、またASPM変異を伴う原発性小頭症では前頭葉優位に脳形成異常を伴うことが特徴の一つである可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed with genetic basis of epileptic encephalopathy using whole exome sequencing. First, we identified GRIN2A mutations in two families: atypical Rett syndrome and unclassified epileptic encephalopathy. Our study suggests that GRIN2A mutations can be associated with atypical Rett syndrome. A variety of severity is to be noted in patients with GRIN2A mutations. Secondly, we found compound heterozygous ASPM mutations in a case of primary microcephaly and epilepsy. This patient showed more severe intellectual disability and motor delay than individuals with ASPM mutations previously reported, and pachygyria with frontal lobe predominance. Our findings expand the variable severity of cortical malformations in patients with ASPM mutations, and suggest that frontal lesion predominance may be characteristic for ASPM mutations.

研究分野：小児神経学

キーワード：てんかん 遺伝子 小児神経学 脳形成異常

## 1. 研究開始当初の背景

てんかんの有病率は1,000人あたり5.3~8.8人と頻度が高く、特に小児期に多い<sup>1)</sup>。なかでも、てんかん性脳症は難治のてんかん発作に伴い、知能や運動機能が低下し発達に影響をきたす予後不良の疾患であり、新生児期発症の大田原症候群や乳児期に発症するWest症候群などが含まれる<sup>2)</sup>。近年、てんかん性脳症の原因として様々な原因遺伝子が明らかにされてきている。加藤らは、2003年にWest症候群<sup>3)</sup>と2007年に大田原症候群の原因としてARXを同定した<sup>4)</sup>。その後、才津、加藤、松本らによって2008年STXBP1<sup>5)</sup>、2012年KCNQ2が大田原症候群の原因遺伝子として同定された<sup>6)</sup>。

我々は、これらの遺伝子変異が除外された原因不明のてんかん性脳症の症例に対し、最先端の遺伝子解析技術である次世代シーケンサーによる網羅的な解析を行い、大田原症候群の1例にSCN2A変異を見出した。てんかん性脳症におけるSCN2A変異の普遍性と病状との関連性を確認するために、大田原症候群を含むてんかん性脳症328例に対してSCN2A変異をスクリーニングした結果、計15例(大田原症候群9例、West症候群1例、てんかん性脳症5例)に新生突然変異を発見し、両者の関連性を初めて確定した<sup>7)</sup>。

また、同様の手法で大田原症候群3例、てんかん性脳症1例においてGNAO1変異を同定した。GNAO1遺伝子は神経細胞における細胞内シグナル伝達に重要な役割を担う3量体Gタンパク質のサブユニット(Gα)をコードしている。この異常がGαの局在変化やカルシウム電流の抑制障害をきたすことが示唆され、細胞内シグナル伝達異常という新たなてんかん症候群の病態背景を明らかにした<sup>8)</sup>。

## 2. 研究の目的

てんかん性脳症の原因として、単一遺伝子のみではなく、他の修飾因子が存在するかどうかを明らかにすることを目的とした。

てんかん性脳症は難治性てんかんの他、重度の知的・運動機能低下を伴うため、患者自身だけでなく介護者の身体・精神的、また経済的負担が非常に大きい。現在のてんかんに対する薬物治療は、発作型(全般発作や部分発作)もしくはてんかん症候群毎に有効性が高いとされる抗てんかん薬を選択することを中心に行われている。結節性硬化症に併発するWest症候群へのvigabatrinなど疾患特異的な薬剤も存在するが、多くのてんかん性脳症においては有効な治療薬はなく、難治に経過する。

本研究により原因遺伝子と他の修飾因子を明らかにすることで、てんかんの分子病態が明らかになり、病態に基づいた適切な治療を早期に導入し、てんかん発作のみならず、

発達を改善できる可能性がある。具体例として、ARXによる介在ニューロンの異常に対してはGABA増加薬が、STXBP1によるシナプス小胞開口の異常に対してはシナプス膜作用薬が予後を改善させる可能性がある。

さらに、小児期発症のてんかんについては遺伝性が問題にされやすい。この点においても原因遺伝子が判明することで、患者家族に対して次子の発症リスクなどの遺伝カウンセリングを適切に行うことができるようになる。

## 3. 研究の方法

てんかん性脳症を始めとするてんかん症候群、または脳形成異常を認める家系(症例自身とその両親など)から血液や唾液検体を採取し、DNAを抽出した。また、症状や画像・脳波所見などの臨床情報を合わせて収集した。次世代シーケンサーを用いて全エクソン解析を行い、既知遺伝子異常の検索、また両親を含めたトリオ解析を行い、新規遺伝子変異の抽出を試みた。抽出した変異はSanger法を用いて確認を行った。

### (倫理面への配慮)

ヒト遺伝子解析が研究の主体であるため、国の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に則り、対象者本人(未成年の場合は保護者)に対して文書による同意を得ている。遺伝子に対する基本事項や研究目的(疾患の遺伝的原因)、検査結果により専門医師による遺伝カウンセリングが可能であること、研究参加は自由であり辞退も可能であること、氏名など個人を特定する情報は匿名化され保護されることを説明した。研究内容については、山形大学医学部倫理委員会の承認を得ている。

## 4. 研究成果

### (1) てんかん症候群におけるGRIN2A変異

てんかん症候群に対する解析で、2家系にGRIN2A変異を認めた。症例1は手の常同運動、呼吸異常、重度精神遅滞やてんかんを有する非典型的レット症候群の女児で、新生突然変異(c.1643C>G)を認めた。症例2は自閉症スペクトラムを伴う分類不能てんかん性脳症の症例で、スプライス変異(c.1007 + 1 G>A)を認め、てんかんの既往がある母と母方祖母も同様の変異を有していた。(図1)

GRIN2A遺伝子はN-methyl-D-aspartate (NMDA) receptorのサブユニットをコードしており、2013年に後天性てんかん性失語症や部分てんかんの原因遺伝子として報告された。今回の研究により、GRIN2A変異が非典型的レット症候群と関与していることが初めて示された。てんかん性脳症とも関連している可能性があり、GRIN2A変異はこれまで報告されていた後天性てんかん性失語症や部分てんかんのみならず、より広い疾患スペクトラムを有することが示唆された。

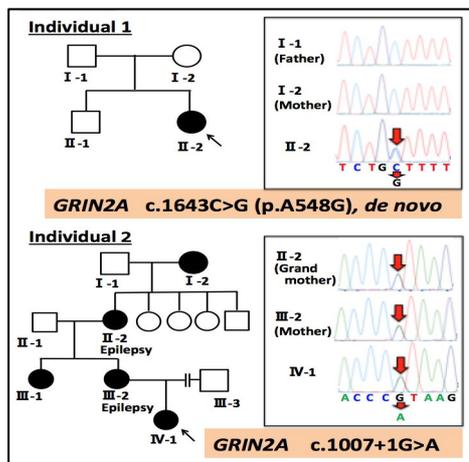


図 1

(2) てんかんを伴う脳形成異常症

てんかんを伴う脳形成異常に対する全エクソン解析により、1例に *ASPM* 遺伝子の複合ヘテロ変異 (c.3055C>T; c.6750delT) を同定した (図 2)。この内、c.6750delT はこれまで報告のない新規変異であった。本症例は小頭症 (-7.6 SD)、難治性てんかんを認め、*ASPM* 変異を認める他の症例と比較して、より重度な精神運動発達遅滞を呈していた。また、頭部 MRI では前頭葉優位な pachygyria が認められ (図 2)、*ASPM* 変異を伴う原発性小頭症では前頭葉優位に脳形成異常を伴うことが特徴の一つである可能性を示した。

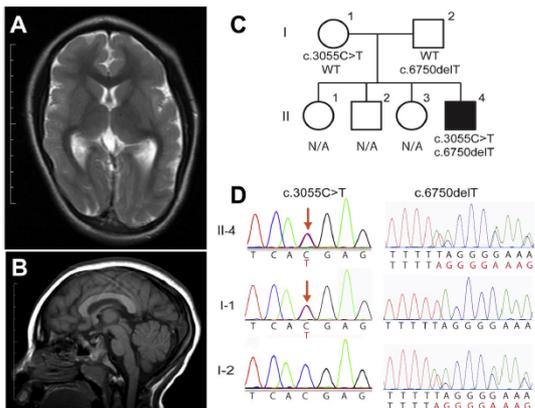


図 2

参考文献

- 1) 中川栄二: けいれんの鑑別診断. 有馬正高, 加我牧子, 稲垣真澄 (編), 小児神経学診断と治療社, 306-313, 2008
- 2) Berg AT et al.: Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. *Epilepsia* 2010;51:676-85
- 3) Kato M et al.: Polyalanine expansion of ARX associated with cryptogenic West syndrome. *Neurology* 2003;61:267-76
- 4) Kato M et al.: A longer polyalanine expansion mutation in the ARX gene causes

early infantile epileptic encephalopathy with suppression-burst pattern (Ohtahara syndrome). *Am J Hum Genet* 2007;81:361-6

5) Saito H et al.: De novo mutations in the gene encoding STXBP1 (MUNC18-1) cause early infantile epileptic encephalopathy. *Nat Genet* 2008;40:782-8

6) Saito H et al.: Whole exome sequencing identifies *KCNQ2* mutations in Ohtahara syndrome. *Ann Neurol* 2012;72:298-300

7) Nakamura K et al: Clinical spectrum of *SCN2A* mutations expanding to Ohtahara syndrome. *Neurology* 2013;81:992-998.

8) Nakamura K et al: De Novo mutations in *GNAO1*, encoding a G o subunit of heterotrimeric G proteins, cause epileptic encephalopathy. *Am J Hum Genet* 2013;93(3):496-505.

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4件)

1) Saito H, Fukai R, Ben-Zeev B, Sakai Y, Mimaki M, Okamoto N, Suzuki Y, Monden Y, Saito H, Tziperman B, Torio M, Akamine S, Takahashi N, Osaka H, Yamagata T, Nakamura K, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Shiina M, Ogata K, Matsumoto N. Phenotypic spectrum of *GNAO1* variants: epileptic encephalopathy to involuntary movements with severe developmental delay. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(1):129-34 **査読有**

2) Makrythanasis P, Kato M, Zaki MS, Saito H, Nakamura K, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima M, Issa MY, Guipponi M, Letourneau A, Logan CV, Roberts N, Parry DA, Johnson CA, Matsumoto N, Hamamy H, Sheridan E, Kinoshita T, Antonarakis SE, Murakami Y. Pathogenic Variants in *PIGG* Cause Intellectual Disability with Seizures and Hypotonia. *Am J Hum Genet*. 2016;98(4):615-26 **査読有**

3) Nakamura K, Inui T, Miya F, Kanemura Y, Okamoto N, Saitoh S, Yamasaki M, Tsunoda T, Kosaki K, Tanaka S, Kato M. Primary microcephaly with anterior predominant pachygyria caused by novel compound heterozygous mutations in *ASPM*. *Pediatr Neurol* 2015;52(5):e7-e8 **査読有**

4) 中村和幸, 加藤光広: 特集 けいれん性疾患の最新の治療. 最近の進歩 原因遺伝子の解明から新しい治療薬の開発へ. 小児科診療. 2015;78:2:253-258. **査読なし**

[学会発表](計4件)

1) Nakamura K, Kato M, Togawa M, Maegaki Y, Ito M, Kawasaki M, Shinozaki T, Nakashima M, Matsumoto M, Saitu H: Expanding clinical spectrum of *GRIN2A* mutations to atypical Rett syndrome 31<sup>st</sup> International Epilepsy Congress, Istanbul, Turkey; September 2015

2) Makrythanasis P, Kinoshita T, Zaki MS, Saitu H, Santoni FA, Miyatake S, Nakashima N, Matsumoto N, Mahmoud I, Guipponi M, Kato M, Nakamura K, Hamamy H, Antonarakis SE, Murakami M: Evidence that variants in *PIGG* cause intellectual disability with early onset seizures and hypotonia: American Society of Human Genetics Annual Meeting, Baltimore, USA, October 2015

3) 伊藤昌弘, 加藤光広, 中村和幸, 中島光子, 松本直通, 才津浩智: *GRIN2A* 遺伝子変異を認めたレット症候群類似症例の1例. 第49回日本てんかん学会学術集会, 長崎ブリックホール(長崎県長崎市); 2015年9月

4) 白井謙太郎, 中山純子, 今井克美, 榎本啓典, 渡辺章充, 中村和幸, 加藤光広: *TUBA1A* 変異を認めた両側傍シルビウス裂多小脳回の1例. 第63回日本小児神経学会関東地方会, 千葉市総合保健医療センター(千葉県千葉市); 2015年9月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕なし

〔その他〕なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中村 和幸 (NAKAMURA, Kazuyuki)

山形大学医学部小児科・助教

研究者番号: 20436215