

200936166 A

厚生労働科学研究費補助金

難治性疾患克服研究事業

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

平成21年度 総括研究報告書

研究代表者 松本 直通

(横浜市立大学大学院医学研究科環境分子医科学・教授)

平成22(2010)年 4月

## 目 次

### I. 総括研究報告

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明 -----	1
松本直通	
(資料) 研究全体の流れと進行状況	

### II. 分担研究報告

1. 年齢依存性てんかん性脳症の疫学と原因遺伝子に関する研究 -----	7
加藤光広	
2. STXBP1変異を有する大田原症候群の臨床的特徴 -----	11
小坂 仁	
3. てんかん発症に関わるエピゲノム異常スクリーニングシステムの開発	15
秦健一郎	

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	19
---------------------------	----

IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	21
-----------------------	----

平成21年度厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
総括研究報告書

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

研究代表者 松本直通 横浜市立大学大学院医学研究科教授

年齢依存性てんかん性脳症のうち、早期乳児てんかん性脳症（EIEE、大田原症候群）と West 症候群を本研究対象とし、責任遺伝子として、我々が世界に先駆けて単離した *ARX*、*STXBPI* と *CDKL5* 等の既知遺伝子を網羅的に解析し分子疫学的調査を行い責任遺伝子毎の臨床病型を確立すること、及びさらなる新規責任遺伝子の単離を目指す事を目的に研究を行った。2010年1月現在で191例の年齢依存性てんかん性脳症の日本人症例が集積した。内訳はEIEE50例、West症候群141例である。*STXBPI* 遺伝子をEIEE44例で解析し、15例（34%）で変異を同定した。さらに*ARX* 遺伝子異常をEIEE4例、West症候群2例で認めた。*SLC25A22* と *CDKL5* には変異を認めていない。アレー解析によって常染色体の微細欠失内に存在していた *EIEE2*（仮称）の変異を、髄鞘形成遅延を伴う West 症候群で世界に先駆けて同定した。特に *STXBPI* 変異で脳奇形を伴わない EIEE のおよそ 1/3 を説明できることで *STXBPI* 変異の中核的な臨床スペクトラムは脳奇形のない EIEE であることが明らかとなった。

分担研究者

加藤光広・山形大学発達生体防御講座・講師

小坂仁・神奈川県立こども医療センター神経内科・科長

秦健一郎・国立成育医療センター研究所・部長

A. 研究目的

新生児期から小児期の**年齢依存性てんかん性脳症**として早期乳児てんかん性脳症[**大田原症候群**、**Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE)**]と**West症候群**が知られている。EIEEは、生後3ヶ月以前に発症するサプレッション・バーストを伴う脳波所見が特徴的で難治性発作（抗てんかん薬抵抗性）と重度の精神運動発達遅滞を伴う。West症候群は、infantile spasms、精神運動発達遅滞、脳波上のヒプスアリスミアを3主徴とし、生後4-7ヶ月に出現する。

EIEEは生後4-6ヶ月頃にWest症候群に移行する事があり、EIEEとWest症候群の共通する原因（責任遺伝子）が存在する。EIEE・West症候群は、共に脳器質障害（脳奇形など）が明らかな症候性と、器質障害を認めない特発性に大別される。EIEE~West症候群を呈する症例の一部で*ARX*と*CDKL5*遺伝子の変異が報告されている。両遺伝子はX染色体上に位置し、*ARX*異常は研究分担者の加藤らが男児症例で報告し(Am J Hum Genet, 2007)、*CDKL5*異常は女児で報告された。研究代表者・松本は、EIEEを呈した1例に於いて常染色体上の微細欠失をマイクロアレーを用いて同定し、この欠失内に存在する *STXBPI* においてEIEEの13例中4例に新規突然変異を同定し *STXBPI* のハプロ不全がEIEEの原因であると報告した (Nat Genet, 2008)。これまでほとんど原因が不明であった年齢依存性てんかん性脳症において、我々が**世界に先駆けて明らかにした *ARX*, *STXBPI* と、*CDKL5* などの責任遺伝子群の関連が明確になったが、これらの年齢依存性てんかん性脳症における分子疫学的調査は未だ途上である。**



本研究は、年齢依存性てんかん性脳症におけるこれらの責任遺伝子変異の寄与度とその責任遺伝子毎の臨床病型を確立すると共に、さらに新規の責任遺伝子単離を行うことを目的とする。

## B. 研究方法

### I. 症例集積

研究分担者加藤・小坂を中心に、小児神経症例検討会（蔵王セミナー）を母体とした小児神経臨床研究ネットワーク（メーリングリスト会員 400 名超）等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかん性脳症の症例の集積を行っている。既に EIEE～West 症候群およびその類縁のてんかん性脳症の症例が 130 例程度集積している。詳細な臨床情報を得られる症例群で、世界的にも質の高い貴重な研究リソースである。さらに研究期間を通じて計 200 例を目指す。

### II. 既知責任遺伝子の解析

年齢依存性てんかん性脳症の既知責任遺伝子 *ARX*, *CDKL5*, *SLC25A22*, *STXBP1* の症例における変異解析を行う。変異スクリーニングは、DHPLC あるいは High Resolution Melt 法を用いて効率化・迅速化を図る。またエクソン全体の欠失・重複は PCR ベースの解析では検出できないため、エクソン領域を高密度にカバーするオリゴ DNA アレーを新たに開発し遺伝子内部分欠失・重複を網羅的に解析する。

### III. 候補遺伝子アプローチ

申請者らが単離した *STXBP1* は、シナプス小胞の開口放出に関連しこれまでてんかんと関連が全く想定されていなかった分子である。この分子に機能的に関連する分子群もヒトてんかんの有力な責任候補遺伝子であり既に 10 種の有力な候補遺伝子を選択した。これらの候補遺伝子を既知遺伝子に異常を認めない症例群で解析する。

## IV. アレーによる全ゲノム微細構造異常解析

Affymetrix SNP 6.0 (全ゲノムに 185 万のオリゴ DNA 搭載)とニンブルジェン社ヒト全ゲノムアレー 385K あるいは 700K (38.5 万～70 万のオリゴ DNA 搭載)を用いて、候補遺伝子群の異常のない症例群に対して全ゲノム微細構造異常解析を行う。同定された微細欠失・重複領域は定量 PCR や FISH 解析等で詳細に範囲を決定し、責任候補遺伝子リストを作製し、遺伝子変異探索を行う。年齢依存性てんかん性脳症の責任遺伝子は複数存在する可能性が高いと想定されるため、本手法でさらなる候補遺伝子を網羅的に集積し探索を行うことで、責任遺伝子単離の可能性が飛躍的に高まる。*STXBP1* の遺伝子単離はこの手法で成功している。

## V. 責任遺伝子毎の年齢依存性てんかん性脳症の臨床病型の確立(加藤・小坂)

本研究で変異が明らかになった各責任遺伝子毎に詳細な臨床情報を分析し臨床病型を確立する。

## C. 研究結果

### I. 症例集積

小児神経臨床研究ネットワーク（メーリングリスト会員 400 名超）等を通じて全国の小児神経科医から年齢依存性てんかん性脳症の症例の集積を依頼した。2010 年 1 月現在で 191 例の年齢依存性てんかん性脳症の日本人症例が集積した。内訳は EIEE50 例、West 症候群 141 例である。

特異的なサプレッション・バーストの脳波所見を呈する年齢依存性てんかん性脳症の背景を明らかにするために、**全国の小児科 979 施設に対して、11 月 20 日付けでアンケート調査**を送付した。208 施設（回収率 21.2%）から返信があり、過去 1 年間の症例数は 39 施設 49 例であった。病名は、EIEE が 30 例、早期ミオクロニー脳症(EME)が 3 例、分類不能が 16 例であった。原因別では脳形成障害 11 例、原因不明 22 例であり、既報告と異なり原因不明例が多く存在することが明らかになった。

### II. 既知責任遺伝子の解析

年齢依存性てんかん性脳症の既知責任遺伝子 *ARX*, *CDKL5*, *SLC25A22*, *STXBP1* の症例における変異解析を行った。

***ARX***: EIEE30 例・West 症候群 109 例を解析し EIEE4 例、West 症候群 2 例で *ARX* 遺伝子の変異を認めた。

***CDKL5***: EIEE13 例・West 症候群 43 例を解析し変異を認めなかった。

***SLC25A22***: EIEE31 例を解析し変異を認めなかった。

***STXBP1***: EIEE44 例・West 症候群 54 例で解析し、West 症候群では変異を同定できなかったが EIEE15 例 (34%) で変異を認めた (論文投稿中)。

これらの遺伝子のタンパク質翻訳に関わるエクソン領域を高密度にカバーするオリゴ DNA アレーを新たに開発し遺伝子内部分欠失・重複のスクリーニングを開始した。

### III. 候補遺伝子アプローチ

申請者らが単離した *STXBP1* に関連するシナプス小胞開口放出に関連する 10 種類の分子を候補遺伝子として変異解析を行っている (詳細は控える)。興味深い塩基変化を複数同定している

### IV. アレーによる全ゲノム微細構造異常解析

高密度オリゴ DNA マイクロアレーを用いて、候補遺伝子群の異常が同定されない症例群に対して全ゲノム微細構造異常解析を開始した。てんかんと関与が明白な既知遺伝子領域の欠失等が明らかになっている。また 1 例の微細欠失から West 症候群の新たな責任遺伝子 *EIEE2* を同定した (投稿中)。

### V. 責任遺伝子毎の年齢依存性てんかん性脳症の臨床病型の確立

*STXBP1* 変異を有する症例の詳細な臨床情報解析を行い、その臨床病型は脳奇形を伴わない EIEE であることが明らかになった。

本研究は横浜市立大学倫理委員会の承認を受け適切な倫理的配慮と手続きを経て行われた。

### D. 考察

2010 年 1 月現在で 191 例の年齢依存性てんかん性脳症の日本人症例が集積した。原因不明例が大多数を占め遺伝子解析対象として最適のリソースである。*STXBP1* 変異で脳

奇形を伴わない EIEE のおよそ 1/3 を説明できること、West 症候群に変異を認めないことで *STXBP1* 変異の中核的な臨床スペクトラムは脳奇形のない EIEE であることは明白となった。新たに発見した *EIEE2* 変異で起こる病態は、髄鞘化遅延と脳幹・小脳低形成を伴う West 症候群であった。遺伝子異常から年齢依存性てんかん性脳症の臨床像が明らかに成りつつある。

### E. 結論

本研究班員の研究により、*ARX*, *STXBP1*, *EIEE2* という年齢依存性てんかん性脳症の 3 つの責任遺伝子を単離した実績は特筆すべきである。脳奇形を伴わない EIEE 症例のおよそ 1/3 を *STXBP1* 変異で説明できること、*STXBP1* 変異症例で TRH の著効例が経験されたことの臨床的意義は大きい。191 例の症例が集積し、新規責任遺伝子の同定を含め今後も数多くの成果が期待される研究状況となっている。

### F. 健康危険情報

本研究遂行上、健康危機に関わる問題は生じていないが、その可能性・危険性等について把握した際には、迅速に対応していきたい。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

才津 浩智、松本 直通 *STXBP1* 遺伝子 (*MUNC18-1*) のハプロ不全が難治性のてんかんを引き起こす。生体の科学「特集 SNARE 複合体—膜融合の機構」(印刷中)

Yoshida K, Shimizu Y, Morita H, Okano T, Sakai H, Ohata T, Matsumoto N, Katsuya Nakamura K, Tazawa K-i, Ohara S, Tabata K, Inoue A, Sato S, Shimojima Y, Hattori T, Ushiyama M, Ikeda S-i. Severity and progression rate of cerebellar ataxia in 16q-linked autosomal dominant cerebellar ataxia (16q-ADCA) in the endemic Nagano area of Japan. *Cerebellum* 8:46-51, 2009

Hamanoue H, Megarbane A, Tohma T, Nishimura A, Mizuguchi T, Saitsu H, Sakai H, Miura S, Toda T, Miyake N, Niikawa N, Yoshiura K, Fumiki H, Matsumoto N. A locus for Ophthalmo-acromelic syndrome

mapped to 10p11.23. Am J Med Genet 149A(3): 336-342, 2009.

Kuniba H, Yoshiura KI, Kondoh T, Ohashi H, Kurosawa K, Tonoki H, Nagai T, Okamoto N, Kato M, Fukushima Y, Kaname T, Naritomi K, Matsumoto T, Moriuchi H, Kishino T, Kinoshita A, Miyake N, Matsumoto N, Niikawa N. Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome. J Hum Genet 54(5): 304-309, 2009.

Saitsu H, Kurosawa K, Kawara H, Eguchi M, Mizuguchi T, Harada N, Kaname T, Kano H, Miyake N, Toda T, Matsumoto N. Characterization of the complex 7q21.3 rearrangement in a patient with bilateral split foot malformation and hearing loss. Am J Med Genet 149A(6):1224-1230, 2009.

Kasuga K, Shimohata T, Nishimura A, Shiga A, Mizuguchi T, Tokunaga J, Ohno T, Miyashita A, Kuwano R, Matsumoto N, Onodera O, Nishizawa M, Ikeuchi T. Identification of Independent APP Locus Duplication in Japanese Patients with Early-Onset Alzheimer's Disease. J Neurol Neurosurg Psychiatry 80(9): 1050-1052, 2009.

Shiihara T, Maruyama K-i, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias. Brain Dev (in press).

Nishimura A, Hiraki Y, Shimoda H, Tadaki H, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Matsumoto N. De novo deletion of 1q24.3-q31.2 in a patient with severe growth retardation. Am J Med Genet (in press)

Komoike Y, Fujii K, Nishimura A, Hiraki Y, Michiko, Hayashidani M, Shimojima K, Nishizawa T, Higashi K, Yasukawa K, Saitsu H, Miyake N, Mizuguchi M, Matsumoto N, Osawa M, Kohno Y, Higashinakagawa T, Yamamoto T. Zebrafish gene knockdowns imply roles for human YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly. Genesis (in press).

Doi H, Koyano S, Miyatake S, Matsumoto N, Kameda T, Tomita A, Miyaji Y, Suzuki Y,

Sawaishi Y, Kuroiwa Y. Siblings with the adult-onset slowly progressive type of pantothenate kinase-associated neurodegeneration and a novel mutation, Ile346Ser, in PANK2: Clinical features and (99m)Tc-ECD brain perfusion SPECT findings. J Neurol Sci (in press)

Kimura S, Saitsu H, Blanka A, Schaumann BA, Shiota K, Matsumoto N, and Ishibashi M. Rudimentary Claws and Pigmented Nail-like Structures on the Distal Tips of the Digits of Wnt7a Mutant Mice: Wnt7a Suppresses Nail-like Structure Development in Mice. Birth Defects Research (in press)

Kanazawa K, Kumada S, Mitsuhiro K, Saitsu H, Kurihara E, Matsumoto N. Choreo-ballistic movements in a case carrying a missense mutation in syntaxin binding protein 1 gene. Mov Disord (in press)

## 2. 学会発表

松本直通「疾患ゲノム解析の新戦略」(特別講演) 第44回日本小児腎臓病学会学術集会 (6月26日・一橋記念講堂・東京)

松本直通「疾患ゲノム解析の新戦略」(招聘講演) 第26回グライコノミクス研究会 (7月30日・北海道大学先端生命科学研究院)

松本直通「メンデル遺伝病のアプローチ」(講師) 理研・医科研・先端研合同開催 2009 遺伝医学夏期集中セミナー (8月28日・東京大学医科学研究所)

松本直通「年齢依存性てんかん性脳症の最近の話題」(特別講演) 第51回日本小児神経学会関東地方会 (9月19日横浜市開港記念会館)

松本直通「疾病の遺伝学研究」(講師) 先端医科学研究に関する倫理的・法的・社会的課題についての調査研究 (ゲノム・遺伝子

研究の実施に関わる諸問題についての調査  
研究) の研究会 (10月4日上智大学)

2. 実用新案登録

無し

Naomichi Matsumoto. Evaluation of  
Affymetrix® Cytogenetics Whole-Genome  
Array Using Clinical Sample. (Oct 24, 2009 at  
Honolulu, Hawaii, HI) (invited lecture)Asin  
Cytogenetics Community Workshop (by  
Affymetrix Inc.)

3. その他

無し

Naomichi Matsumoto: *STXBPI* mutations in  
severe infantile epilepsies with  
suppression-burst pattern (oral presentation).  
The international symposium in the 9<sup>th</sup> Annual  
Meeting of the East Asian Union of Human  
Genetic Society (Nov 19, 2009, Soel, Korea)  
2010

松本直通「疾患遺伝子研究の新潮流」(特別  
講演) 第9回東北出生前医学研究会 (1月  
30日於仙台)

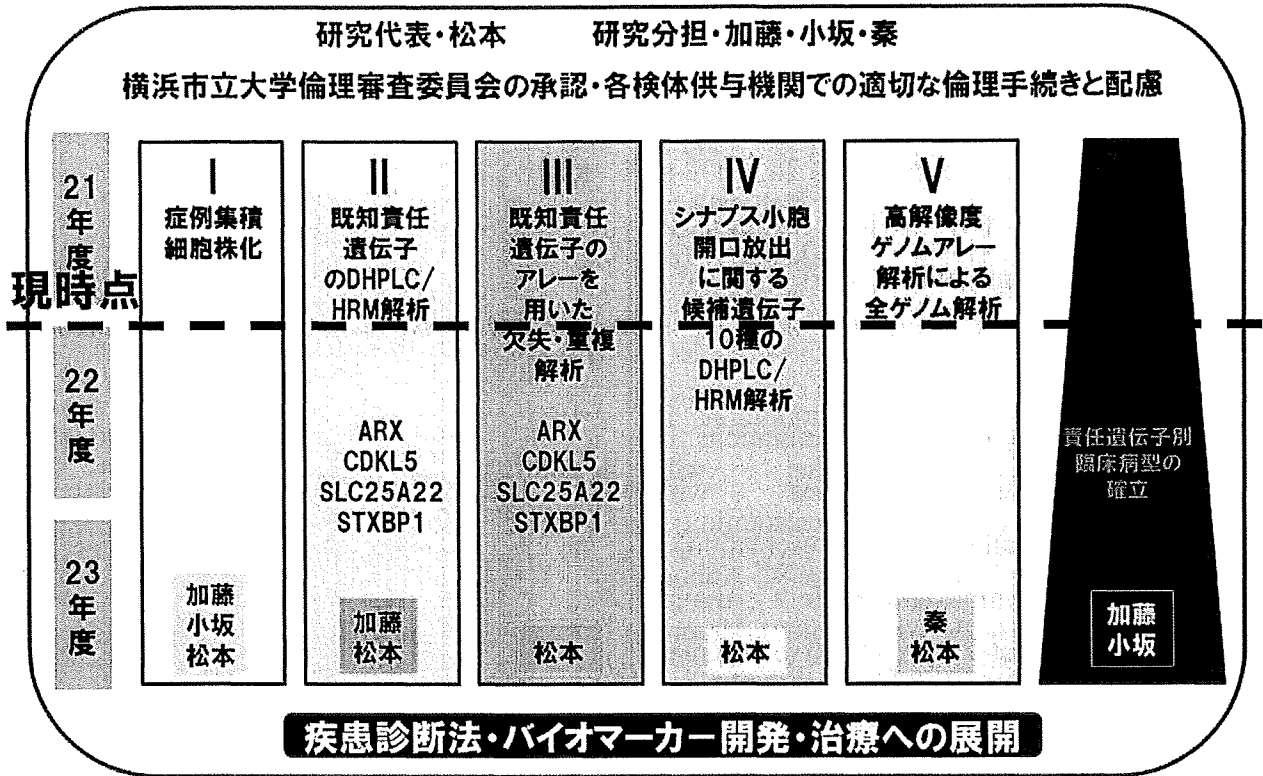
Naomichi Matsumoto. “Whole Genome  
Approach to the Epilepsy-Related Gene”  
(Symposist) An International Workshop on  
Translational Science: Clinical Use, Efficacy  
and Translation of Basic Discoveries (Feb 1 at  
Yokohama)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願・取得

特願 2009-146055・松本直通／才津浩智・  
大脳白質異常を伴う点頭てんかんの検  
出方法・横浜市立大学・平成21年6月  
19日

研究全体の流れと進行状況





平成21年度厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

分担研究課題：年齢依存性てんかん性脳症の疫学と原因遺伝子に関する研究

分担研究者 加藤光広 山形大学医学部小児科学講座

研究要旨：

大田原症候群、早期ミオクロニー脳症など新生児期に脳波でサプレッション・バーストをきたす年齢依存性てんかん性脳症の実態を把握するために、国内で小児科を標榜する979病院に対してアンケート調査を行った。生後1歳未満にサプレッション・バーストを呈した年齢依存性てんかん性脳症の1年間の受診患者は49例確認された。診断名では大田原症候群が最も多く、早期ミオクロニー脳症はまれであったが、診断未確定例が16例と多く境界例の存在が考えられた。既報告と異なり、脳形成障害は約2割のみであった。約半数は原因不明の特発性もしくは潜因性と分類されるべき症例であり、一部では原因遺伝子が判明し、年齢依存性てんかん性脳症においても原因遺伝子解析をさらに推し進める必要がある。

A. 研究目的

年齢依存性てんかん性脳症は、年齢により特徴的な脳波とてんかん発作を示し、発達障害を伴う疾患群である。なかでも新生児期にサプレッション・バーストとよばれる特徴的な脳波所見を示す大田原症候群は、乳児期にウェスト症候群に移行し、さらに幼児期にはレンノックス・ガストー症候群に移行する典型的な年齢依存性を示す。また、早期ミオクロニー脳症も新生児期に発症し、脳波ではサプレッション・バーストを認めるなど、大田原症候群と共通の特徴を示す。大田原症候群の多くは脳形成異常が原因と考えられてきましたが、これまでに脳形成異常を伴わない大田原症候群が30例以上集まっている。症例によっては経過中にミオクロニー発作主体となり、早期ミオクロニー脳症と区別がつかないか移行したと考えられる例も存在する。また、サプレッション・バーストの出現時期や併発症、有効薬剤、予後も様々であることがわかりつつある。しかしながら全国規模の疫学調査の報告はなく、実態は一部しか明らかになっていない。そこで今回、サプレッション・バーストをきたす年齢依存性てんかん性脳症の実態について全国調査を行なう事を目的とした。

B. 研究方法

対象：日本国内の病院の小児科を過去1年間（2008(H20)年11月1日～2009(H21)年10月31

日）に受診した、生後1歳未満にサプレッション・バーストを呈した年齢依存性てんかん性脳症

方法：日本国内の病院で小児科を標榜する979施設に疫学調査依頼と返信用はがきを送付し、結果を回収した。

調査項目：①患者数（症例有無）、②診断名（大田原症候群、早期ミオクロニー脳症、その他）、③基礎疾患

C. 研究結果

208施設から返答があり、回収率は21.2%であった。

①患者数

症例あり	39施設	49例
(1例34施設, 2例3施設, 4例1施設, 5例1施設)		
症例なし	169施設	

②診断名

大田原症候群	30例
早期ミオクロニー脳症	3例
その他(不明・未確定)	16例

③基礎疾患

脳形成障害	11例
代謝異常	1例
周産期障害	4例
その他	11例
(うち遺伝子・染色体異常)	6例
原因不明	22例

## D. 考察

回収率は低かったが、208施設中39施設(19%)に対象患者49例の存在が確認され、これまで国内外で最多数の情報が収集された。一施設で最多5例の報告があったが、34施設では1例のみの報告であり、正確な実数は不明だが、比較的稀な疾患と考えられる。施設による症例数の偏りは、てんかんや小児神経、リハビリなどの専門医の地域ごとの偏在に起因すると考えられる。

診断名では大田原症候群が最も多く61%を占め、早期ミオクロニー脳症は3例のみであった。岡山県における小児てんかんの有病率調査では、小児1000人に対し5.3から8.8人であり、そのうち大田原症候群は0例で、早期ミオクロニー脳症が2例(てんかん全体の0.1~0.17%)と、今回の結果とは逆転していた(岡ら *Epilepsia*, 2006)。原因としては、大田原症候群も早期ミオクロニー脳症も頻度は少なく、岡らの調査では母数が少ないための誤差の影響が大きいためと考えられる。また、大田原症候群と早期ミオクロニー脳症は臨床的に重複する所が大きく、厳密に区別するのは困難な場合がある。今回の調査でも、サプレッション・バーストを呈していながら、16例は両者に分類されず、境界例の存在が浮かび上がった。

基礎疾患では脳形成障害は22%であり、大田原症候群に限っても7例23%のみであった。22例は基礎疾患不明例で、その他11例中4例も *ARX*(3例)、*STXBPI*(1例)の遺伝子変異が判明した症例であった。合計26例(53%)は特発性もしくは潜因性と分類されるべき症例であり、必ずしも現在の症候性てんかんとしての分類には適合しないことが判明した。

## E. 結論

サプレッション・バーストを示すてんかん性脳症は国内では大田原症候群が最も多く、分類不能・未確定例も多かった。既報告と異なり、脳形成障害を基礎疾患に有する例は少なく、原因不明例が最も多かった。原因不明例には遺伝子異常が含まれ、年齢依存性てんかん性脳症に対する原因遺伝子解析をさらに進める必要がある。

## F. 健康危険情報

特になし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Kato M, Koyama N, Ohta M, Miura K, Hayasaka K. Frameshift mutations of the *ARX* gene in familial Ohtahara syndrome. *Epilepsia* in press

Shiihara T, Maruyama KI, Yamada Y, Nishimura A, Matsumoto N, Kato M, Sakazume S. A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings: Pachygyria, subcortical-band heterotopia, and periventricular heterotopia. *Brain Dev* in press

Ide S, Sasaki M, Kato M, Shiihara T, Kinoshita S, Takahashi JY, Goto YI. Abnormal glucose metabolism in aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency. *Brain Dev* in press

Hosoki K, Kagami M, Tanaka T, Kubota M, Kurosawa K, Kato M, Uetake K, Tohyama J, Ogata T, Saitoh S. Maternal uniparental disomy 14 spectrum is important differential diagnosis of Prader-Willi syndrome. *J Pediatr* 155:900-903, 2009

加藤光広：大田原症候群. 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論 I.日本人が発見に関わった疾患遺伝子 小児科 50 :894-898, 2009

加藤光広：周期性四肢麻痺. 小児疾患診療のための病態生理 小児内科 41:969-972, 2009

### 2. 学会発表

Mitsuhiro Kato: *ARX* gene as a genetic marker for catastrophic neurological disorders and related conditions. 10th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology

Mitsuhiro Kato, Hiroto Saito, Takeshi Mizuguchi, Hitoshi Osaka, Jun Tohyama, Katsuhisa Urano, Satoko Kumada, Keisuke Hamada, Akira Nishimura, Syu-ichi Hirai, Tatsuro Kumada, Atsuo Fukuda, Kazuhiro Ogata, Kiyoshi Hayasaka, Naomichi Matsumoto: Clinical spectrum of Ohtahara syndrome caused by *STXBPI* mutation. 28th International Epilepsy Congress

Noriko Miyake, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto: Analysis of copy number changes in Aicardi syndrome. 59th Annual Meeting of The American Society of Human Genetics

Mitsuhiro Kato, Norihisa Koyama, Masayasu Ohta, Kiyokuni Miura, Kiyoshi Hayasaka: Frameshift mutations in the terminal exon of *ARX* cause Ohtahara syndrome. American Epilepsy Society 63rd Annual Meeting

中村和幸, 加藤光広, 松永明, 沼倉周彦, 古山政幸, 早坂清, 清水行敏, 秋葉香, 荻野大助, 橋本多恵子: フェノバルビタール大量療法が奏効した原因不明の脳症後部分てんかんの1例. 第112回日本小児科学会総会

加藤光広: 脳形成障害・てんかんのトピックス—年齢依存性てんかん性脳症と介在ニューロン病—. 第51回日本小児神経学会総会

赤坂紀幸, 遠山潤, 大橋伯, 小林悠, 加藤光広: 同一の ARX 遺伝子異常を呈した West 症候群と精神遅滞の兄弟例. 第43回日本てんかん学会総会

中川栄二, 加藤光広, 黒澤健司, 難波栄二, 稲澤譲治, 後藤雄一: Genetic and clinical analysis in patients with mental retardation with epilepsy. 第43回日本てんかん学会総会

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

平成21年度厚生科学研究費補助金(難治性疾患克服研究事業)  
分担研究報告書

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

分担研究課題：STXBPI 変異を有する大田原症候群の臨床的特徴

分担研究者 小坂仁 神奈川県立こども医療センター神経内科

年齢依存性てんかんの大田原症候群, Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE) はきわめて予後不良のてんかん症候群であり、各種抗けいれん剤にもかかわらず発作のコントロールは困難である。STXBPI 変異を有する EIEE 2 例で、Thyrotropin-releasing hormone ; TRH およびその誘導体を試みたところ、1 例で発作消失を認め (STXBPI ; 完全欠失)、1 例で短期的ではあるが著効した (STXBPI ; 1328T>G(443R))。今回の 2 症例は、STXBPI 変異を有する EIEE 例では TRH およびその誘導体が治療薬の選択肢となる可能性を示した。痙攣が消失しても、重度の知的発達遅滞は残存するが、痙攣の有無により、二次的な四肢変形の有無、家族の介護度の軽重、本人の生活の質などには大きな差異が認められる。有効な治療が、無いと考えられている EIEE に対して、今回 STXBPI 変異を有する例で治療の可能性を示せたことは、患者・家族にとって、大きな意味を持つと考える。また TRH が作用すると考えられる TRH 受容体は、間脳・下垂体に分布し、Thyroid ホルモンの分泌に関わるのみならず、中枢神経に広く分布し様々な生理学的作用への関与が知られる。STXBPI との関連をさらに検討することにより、EIEE に対する新しい治療薬への展望が開ける可能性がある。

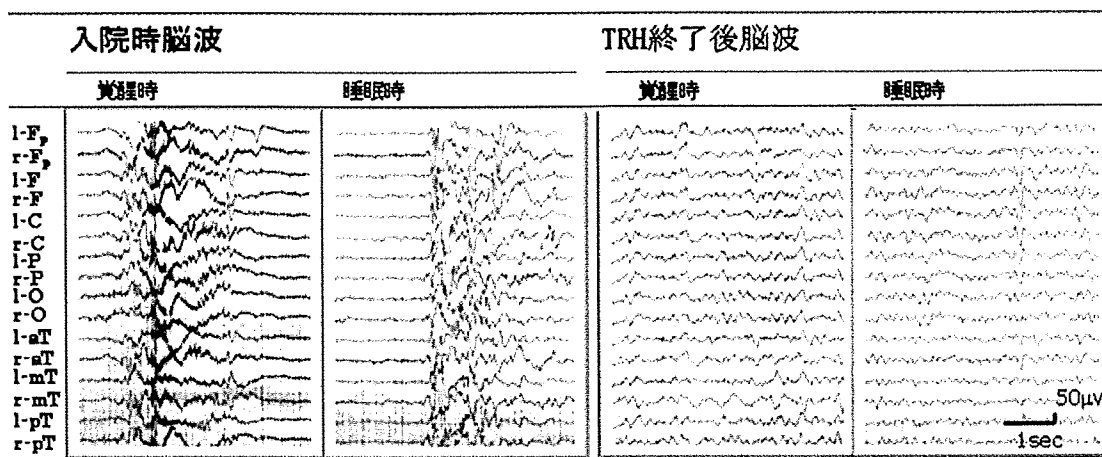
#### A. 研究目的

年齢依存性てんかんの大田原症候群 [Early Infantile Epileptic Encephalopathy (EIEE)] は、1976 年に大田原により新しいてんかん症候群として提唱されたきわめて予後不良のてんかん症候群である。頻発する強直発作が特徴的で、サプレッションバーストと呼ばれ、高振幅不規則徐波と棘波が混在した、群

発と平坦波が交互に、出現する脳波所見を停し、各種抗けいれん剤にもかかわらず発作のコントロールは困難であり、知的にも重度の発達遅滞を示す。今回 STXBPI 変異をもつ、EIEE 2 症例の治療経過から、STXBPI 変異例の臨床的特徴を抽出することを目的とした。

#### B. 症例および治療経過

Fig. 1



症例1 ; 6才女児。生後1ヶ月半より強直発作、口部自動症、2ヶ月よりシリーズ形成性点頭発作出現。覚醒・睡眠時を通じサプレッションバースト; SBを呈した(Fig. 1左)。ビタミンB6, ゾニサミドに不応ガンマグロブリンでも明らかな発作減少を認めずバロプロ酸に引き続きACTH療法を行ったところ、シリーズ形成性点頭発作は半分程度に減少するも、哺乳不良が続き、後弓半張様の反り返りが著明で、経管栄養となった。プロチレリン酒石酸塩水和物(Protirelin Tartrate Hydrate)(Fig. 2A)10日間連日静注を2回、行い睡眠時のハンプスピンドルは認めないものの、SBパターンは消失し(Fig. 1右)、発作も消失し反り返りも軽減、経口栄養が再開となった。その後数年間発作は認めなかったが数秒ほど眼球偏倚し、意識の減損を伴う複雑部分発作が出現し、脳波上も右頭頂部に焦点性棘波を認め、タルチレリン水和物を開始し

(Fig. 2B)、現在明らかな発作を認めていない。

STXBPI解析; 完全欠失

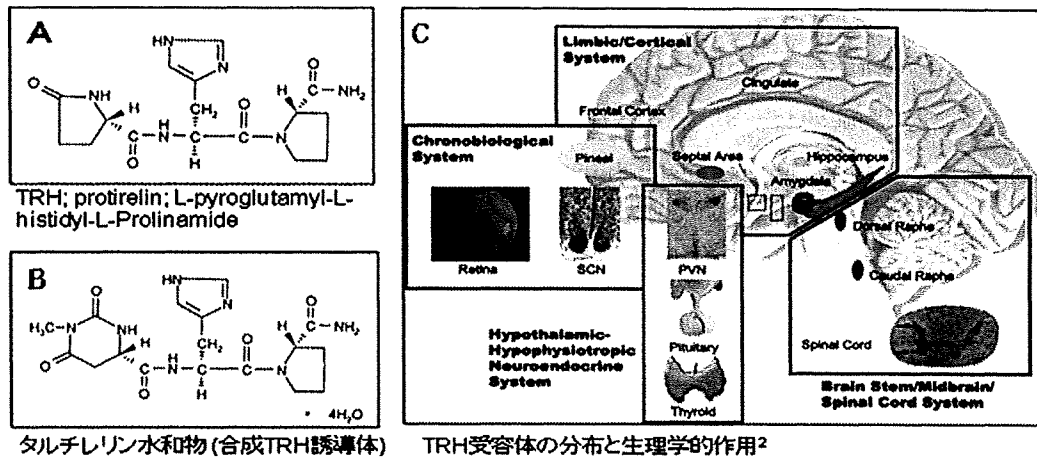
症例2 ; 6才女児。1ヶ月半頃より眼球上転、上肢屈曲位での強直発作出現。生後2ヶ月より頸部の捻転を伴うシリーズ形成性点頭発作あり。脳波はSBが3か月でヒプスアリスミアに変容。ゾニサミド開始、ガンマグロブリン、ビタミンB6にも不応。ACTHおよびバロプロ酸でも発作の回数はわずかに減少したのみで、体幹の反り返りは亢進した。Protirelin治療を行い発作の消失・追視の獲得が認め退院となった。しかしながら退院後、発作は再燃し現在6剤の抗痙攣剤服用中。強直発作(2-5/日)と単発強直スパズム(20-100/日)をみる。STXBPI解析; 1328T>G(443R)

C, D 研究結果および考察



の関連をさらに細胞生物学的に

Fig. 2



今回の *STXBPI* 変異を有する EIEE2 例で、TRH およびその誘導体にて、1 例で発作消失を認め、1 例で短期的ではあるが著効例を認めた。今回の 2 症例は、*STXBPI* 変異を有する EIEE 例では TRH およびその誘導体が治療薬の選択肢となることを示す。痙攣が消失しても、重度の知的発達遅滞は残存するが、痙攣の有無により、家族の介護度や受ける教育、本人の生活の質には大きな差異が認められるため、今回治療の可能性を示せたことは EIEE の患者と家族にとっては、有効薬が無い現在、大きな意味を持つと考える。

TRH 受容体は、間脳下垂体に分布し、Thyroid ホルモン分泌に関わるのみならず、中枢神経に広く分布し様々な生理学的作用への関与が知られる。*STXBPI* と

探索することにより、新しい治療薬への展望が開ける可能性がある。

## G. 研究発表

### 論文発表

- 1) Goto A, Wang YL, Kabuta T, Setsuie R, Osaka H, Sawa A, Ishiura S, and Wada K. Proteomic and histochemical analysis of proteins involved in the dying-back-type of axonal degeneration in the gracile axonal dystrophy (gad) mouse. *Neurochem Int.* 2009; 54: 330-338
- 2) Ogiwara I, Ito K, Sawaishi Y, Osaka H, Mazaki E, Inoue I, Montal M, Hashikawa T, Shike T, Fujiwara T, Inoue Y, Kaneda M, Yamakawa K. De novo mutations of voltage-gated

- sodium channel alphaII gene SCN2A in intractable epilepsies. *Neurology*. (2009), 29; 1046-53.
- 3) Osaka H, Koizume S, Aoyama H, Iwamoto H, Kimura S, Nagai J, Kurosawa K, Yamashita S. Mild phenotype in Pelizaeus-Merzbacher disease caused by a PLP1-specific mutation. *Brain Dev* (2009), doi:10.1016
- 4) Tsuji M, Aida N, Obata T, Tomiyasu M, Furuya N, Kurosawa K, Errami A, Gibson M, Salomons G, Jakobs C, Osaka H. A New Case of GABA Transaminase Deficiency Detected with Proton MR Spectroscopy. *J Inherit Metab Dis*, (2010)10.1007/s10545-009-9022-9
- 第 51 回日本小児神経学会、English Session 2009. 5.28-30, 米子
3. 露崎悠、高木篤史、渡辺好宏、辻恵、鮫島希代子、和田敬仁、井合瑞江、山下純正、新家敏弘 小坂仁 MRS が診断に有用であった Creatine transporter deficiency の一例. 第 51 回日本先天代謝異常学会総会・第 8 回アジア先天代謝異常症シンポジウム 2009. 11.5-7 東京
4. 小坂 仁. 先天性大脳白質形成不全症はどんな病気? (教育講演) 先天性大脳白質形成不全症の克服へ向けて～症状と診断、治療をめざした研究の現状と展望～ 第 1 回市民公開セミナー主催: 厚生労働科学研究補助金難治性疾患克服研究事業「先天性大脳白質形成不全症の診断と治療に向けた研究」班 平成 21 年 7 月 18 日, 横浜

#### 学会発表

1. M Tsuji, A Noriko, T Obata, M Tomiyasu, A Takagi, K Sameshima, M Iai, S Yamashita, N Furuya, KKurosawa, KM Gibson, GS Salomons, C Jakobs, H Osaka. Proton MR Spectroscopy Identifies GABA Transaminase Deficiency. *Neuroscience meeting*, Oct 17-21, 2009 Chicago
2. Hitoshi Osaka, Hiroko Shinbo, Shiro Koizume, Kenji Kurosawa, Sumimasa Yamashita. Drug screening for Pelizaeus-Merzbacher Disease.

#### 特許出願

特願 2010-25346

陰イオン交換カラムを用いた生体アミンの検出

平成21年度厚生科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）  
分担研究報告書

年齢依存性てんかん性脳症の分子疫学と臨床像の解明

分担研究課題： てんかん発症に関わるエピゲノム異常スクリーニングシステムの開発

分担研究者 秦健一郎 国立成育医療センター研究所 周産期病態研究部

研究要旨：

DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御は、生命活動に必須の機構であると共に、エピジェネティックな異常が様々な疾患の原因となることが近年明らかになりつつある。その代表例であるインプリンティング異常症は、DNA メチル化の異常によりゲノムインプリンティングが破綻し、てんかんを含む様々な中枢神経発生発達異常を呈する。しかしこれまでDNA メチル化異常と疾患との関連を解析した報告では、ごく限られたゲノム領域のDNA メチル化状態しか調べられておらず、また、ほとんどが定性的DNA メチル化測定を行っており、個人差等を勘案した正常値も確立していない為、仮に未知のDNA メチル化異常が存在したとしても、その発症時期や機序、転帰との因果関係を評価することが困難であった。そこで我々は、ヒト疾患のDNA メチル化異常を確定的に解析し、臨床的分子診断に資する解析系の確立を目的とした。具体的には、異なる染色体上に散在し、様々な生理的機構によってDNA メチル化されることが示されている領域（既知のインプリンティング遺伝子関連メチル化領域全て、反復配列、X染色体、胎盤特異的非メチル化遺伝子領域を含む合計27箇所）を網羅した解析対象領域を設定し、解析条件を詳細に検討した。

A. 研究目的

ヒトゲノムプロジェクトの完了により、ゲノム配列が全て明らかとなり、遺伝学的な異常を同定する技術（ジェネティックな異常の解析技術）が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子配列の異常（ジェネティックな異常）だけでは説明できない疾患の存在も明らかになった。DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックなゲノム制御機構と疾患や発生異常との関連は、近年特に様々な因果関係が明らかにされてきており、従来の遺伝学的解析手法（ジェネティックな解析手法）を超えたポストゲノムシーケンス時代の重要な医学研究領域として注目が高まっている。

しかし、ヒト疾患におけるエピジェネティックな破綻の有無は、ほとんど系統的網羅的に解析されておらず、そもそもヒト正常組織の実測値に基づく正常値も定義されるに至っていない。

本研究は、疾患発症に関わる一つの病的因子と

してエピジェネティックな異常の有無に着目し、特にDNA メチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する手法を独自に確立し、実際にヒト検体を用いたDNA メチル化解析を行うシステムを開発する事を目的とした。

B. 研究方法

1. 解析標的領域の決定

DNA メチル化によるエピジェネティックな遺伝子発現制御の代表例として、ゲノムインプリンティングが挙げられる。実際に、DNA メチル化の異常はゲノムインプリンティングの破綻を引き起こし、インプリンティング異常疾患は、様々な発生異常、内分泌異常、てんかんを含む中枢神経異常を呈する。そこで、現在までにヒトで報告されている全てのインプリンティング領域のDNA メチル化を、文献的に検索した。また、ヒトでは報告

されていないが、マウスとの配列相同性からヒトでもインプリンティング領域であると予想される領域を推定した。これらの領域が実際に DNA メチル化を受けている領域である事を、正常血液（リンパ球）および正常胎盤由来のゲノム DNA を用いて検証した。これらの DMR に加え、胎盤特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域も選定し、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした。

## 2. COBRA 法の条件検討

上記選定された領域を、COBRA 法 (Combined Bisulfite Restriction Analysis) により解析するための、詳細な条件検討を行った。ゲノム DNA をバイサルファイト法で処理し、非メチル化シトシンをウラシルに変換した。このバイサルファイト処理後のゲノム DNA を鋳型とし、DNA メチル化を受ける（であろう）領域の PCR 反応を行った。解析対象ゲノム領域内に、複数の PCR 領域を設定し、PCR 法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こり、かつ増幅産物長が約 500 bp 以下になるプライマーと増幅反応を設定した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断する必要があるため、領域内に適切な制限酵素認識配列を有する配列が存在する事も必須である。解析するゲノム DNA は、バイサルファイト変換により非メチル化シトシンがウラシルに変換されるため、本来 4 種類の DNA で構成されるゲノム配列が、ほぼ 3 種類で構成される配列に変換される。このため、PCR プライマー設計の自由度が格段に狭められ、非特異的な増幅が起こりやすくなる。しかし、事前の予測が困難であり、領域ごとに実際に数回の試行を行い最適な条件を決定する必要がある。一方で、解析をハイスループット化する為に、PCR の反応条件は可能な限り統一した。

## 3. 電気泳動の条件検討

一般的に COBRA 法では、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、得られる泳動像から半定量的な解析を行う。しかし、

我々の事前検討では、従来の電気泳動法ではダイナミックレンジが低く、定量性が劣る事が判明した。そこで我々は、測定値の定量性を厳密に担保するために、キャピラリー電気泳動法を採用した。

## 4. 正常値の定義

本研究内では、健常成人末梢血由来のゲノム DNA を用いて解析を行った。

## C. 研究結果

### 1. 解析標的領域の決定

文献的検索で既知のヒトインプリンティング領域を・網羅し、また、マウスとのゲノム構造比較により、未同定ではあるがヒトでもインプリンティング領域であると高度に予想される領域を抽出し、全てを解析対象とした。成人正常末梢血由来のゲノム DNA を用いて、検証した。その結果、従来ヒトでもインプリンティング領域である（片親性に DNA メチル化されている）と報告されていた中に、追試できないゲノム領域が含まれており、これらは解析対象から除いた。最終的に、我々の独自の検証で確かに片親性の DNA メチル化が認められた領域、胎盤特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域、反復配列領域（通常高度にメチル化されている領域）、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした。

### 2. COBRA 法の条件検討

COBRA 法 (Combined Bisulfite Restriction Analysis) は、バイサルファイト法で処理により非メチル化シトシンをウラシルに変換するために、シトシンをほぼ失った 3 種類の塩基のみで PCR を行う為、PCR 法による増幅に偏りが起こりやすい。そこで、バイサルファイト変換後の既知濃度のメチル化・非メチル化 DNA をテンプレートに用い、標準曲線を描き、PCR の偏りを厳密に検証した。また、PCR 増幅に続く制限酵素処理も、切断効率に差異が生ずる為、必要な補正を行った。以上の様な検定を詳細に行い、再現性・感受性・定

量性に優れた解析手順を確立した。

### 3. 電気泳動の条件検討

当初定法に従い、COBRA 法によって得られた DNA 断片の定量解析は、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行ったが、事前検討より、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルではダイナミックレンジが低く、定量的解析が困難であった。そこで、定量性と迅速性を兼ね備える並列キャピラリー電気泳動装置を用い、DNA 断片の定量解析を行った。

### 4. 正常値の定義

正常成人末梢血由来のゲノム DNA30 例を用い、 $\pm 1$  SD, 2SD (暫定的な正常値の目安) を設定した。

### D. 考察

DNA メチル化を初めとするエピジェネティックな遺伝子発現制御は、発生と生存に必須の機構である。また、DNA メチル化は可逆的な化学修飾であるため、先天的あるいは後天的に起こった化学的修飾の変化 (エピジェネティックな変異) が、様々な疾患との関連する可能性が明らかになりつつある。代表例として、DNA メチル化の異常で起こるゲノムインプリンティング異常症では、てんかんを含む様々な中枢神経異常を呈する事が知られている。しかし、ヒト疾患で DNA メチル化異常を解析した報告のほとんどは、疾患関連候補因子遺伝子周辺のゲノム領域のみに着目した DNA メチル化解析が行われており、DNA メチル化状態のいわゆる正常値が明らかでないため、仮に未知の DNA メチル化異常が存在したとしても、確定的な結論に至ることが困難であった。

今回我々は、DNA メチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する系を確立した。今後この系を用いれば、様々な臓器や発生時期での詳細な DNA メチル化が可能である。

### E. 結論

ヒト疾患における DNA メチル化異常を同定するために、複数の DNA メチル化領域を解析標的としたスクリーニング系を確立した。本スクリーニング系は、ゲノム全体の DNA メチル化状態を定量的に解析出来るため、新たな病因病態を同定するのに有力な解析手法であると期待される。また、本研究では今後、多数の正常検体を解析し、DNA メチル化の「正常値」を定義する予定である。このような知見は、今後様々な疾患の DNA メチル化異常の有無の解析に、多大な貢献を成すことも併せて期待できる。

### F. 健康危険情報

特記事項無し

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T. (2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics*. 93, 461-472.
- 2) 秦健一郎 (2009) 「DNA メチル化の網羅的解析」医学のあゆみ 230, 553-554.

#### 2. 学会発表

[特別講演・シンポジウム]

- 1) 秦健一郎「ヒト発生異常のエピジェネティクス」胎生期エピジェネティクス研究会、東京、6月17日、2009.
- 2) 秦健一郎「胎児・胎盤分化発育異常のエピジェネティクス —網羅的ゲノム・エピゲノム解析の試み—」日本周産期新生児学会ワークショップ不育症の新たな原因探索と治療、第45回日本周産期・新生児医学会学術集会、横



浜、7月12日、2009.

3)

[一般演題発表]

- 1) 中林一彦、吉田亘、山澤一樹、緒方勤、秦健一郎「DNA メチル化プロファイリングによるゲノムインプリンティング領域の網羅的解析」日本人類遺伝学会第54回大会、東京、5月25日、2009.
- 2) Kazuhiko Nakabayashi, Wataru Yoshida, Kazuki Yamazawa, Maki Kusumi, Tsutomu Ogata, and Kenichiro Hata. "MeDIP-chip detection and quantitative DNA methylation analysis of differentially methylated regions in imprinted loci." The American Society of Human Genetics 59<sup>th</sup> Annual Meeting , Hawaii, October 22, 2009.
- 3) 吉田 亘、中林 一彦、田山 千春、久須美真紀、佐藤 俊、秦 健一郎"Identification of novel maternal differentially methylated regions (DMRs) and imprinting gene using MeDIP-Chip assays"第32回日本分子生物学会年会、横浜、12月11日、2009.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
才津 浩智、松本 直通	<i>STXBPI</i> 遺伝子 (MUNC18-1) のハプロ不全が難治性のてんかんを引き起こす.	生体の科学：特集SNARE複合体—膜融合の機構	印刷中	未確定	2010
Komoike Y, et al., Matsumoto N, et al.	Zebrafish gene knockdowns imply roles for YWHAG in infantile spasms and cardiomegaly.	Genesis	印刷中	未確定	2010
Kuniba H, et al., Matsumoto N, Niikawa N.	Molecular karyotyping in 17 patients and mutation screening in 41 patients with Kabuki syndrome.	J Hum Genet	54	304-309	2009
Shiihara T, et al., Matsumoto N, et al.	A case of Baraitser-Winter syndrome with unusual brain MRI findings of pachygyria, subcortical band heterotopia and periventricular heterotopias.	Brain Dev	印刷中	未確定	2009
加藤光広	大田原症候群. 小児疾患における臨床遺伝学の進歩 各論 I. 日本人が発見に関わった疾患遺伝子	小児科	50 (7)	894-898	2009
Miyata R, et al., Kato M, et al.	Analysis of the hypothalamus in a case of X-linked lissencephaly with abnormal genitalia (XLAG).	Brain Dev	31	456-460	2009
Ide S, et al., Kato M, et al.	Abnormal glucose metabolism in aromatic l-amino acid decarboxylase deficiency.	Brain Dev	印刷中	未確定	2009 (online)