

HLA-DRB1*09:01および-DQB1*03:03と、糖尿病I型、関節リウマチおよび若年性重症筋無力症に疾患関連性が報告されている。サイトカインは血管内皮障害を起こすが、まれな壊死性血管炎で、日本人に多いとされるmicroscopic polyangitisにおいても、HLA-DRB1*09:01 および -DQB1*03:03の疾患関連性が指摘されているため、このハプロタイプとサイトカイン産生に何らかの関連が示唆される。

サイトカイン遺伝子の多型については、これまでに様々な疾患との関連性が報告されている。急性壊死性脳症ではIL6およびIL10のプロモーター領域の多型で正常対照群と比べ、有意にマイナーアレル頻度やホモ接合遺伝子型頻度が高いことが明らかとなった。プロモーター領域に存在するため、遺伝子発現量の変化をもたらす機能的一塩基多型として感染時のサイトカイン産生に影響する可能性が考えられる。

E. 結論

日本人急性壊死性脳症ではHLA Class II DRB1 09:01およびDQB1 03:03が発症のリスクファクターであること、サイトカイン遺伝子IL6およびIL10のプロモーター領域一塩基多型に疾患関連性があること

が明らかとなった。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

学会発表

- 1) 齋藤真木子、星野愛、久保田雅也、菊池健二郎、山中岳、廣瀬伸一、水口雅 けいれん重積型急性脳症と熱性けいれんの遺伝的素因の比較—サイトカイン遺伝子多型解析—、第55回 小児神経学会学術集会 (大分)
- 2) 齋藤真木子、篠原麻由、高梨潤一、菊池健二郎、久保田雅也、山中岳、水口雅 けいれん重積型急性脳症の遺伝的素因、第116回日本小児科学会学術集会 (広島)
- 3) 星野愛、齋藤真木子、久保田雅也、高梨潤一、豊島光雄、宮本晶恵、奥村彰久、水口雅 急性壊死性脳症における遺伝的素因 – HLAタイピング及びサイトカイン遺伝子多型解析、第55回小児神経学会学術集会 (大分)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特になし

2. 実用新案登録

特になし

難治頻回部分発作重積型急性脳炎の免疫学的解析

研究分担者 佐久間 啓（公益財団法人東京都医学総合研究所

脳発達・神経再生研究分野 主席研究員）

研究要旨

難治頻回部分発作重積型急性脳炎（以下AERRPS）の原因は未だ不明である。AERRPSにおける免疫学的異常の関与を明らかにするため、AERRPSの臨床情報ならびに臨床検体を前方視的に集積し、血清・髄液において計10種類のサイトカイン・ケモカインをcytometric bead array法により測定して炎症性及び非炎症性神経疾患との比較を試みた。その結果、AERRPSでは血清・髄液中のIL-6, IL-8, IP-10, MIGが有意に高値を示し、その傾向は髄液でより顕著であった。さらにIP-10とMIGは予後と相関が見られた。これらの結果はAERRPSにおいて中枢神経系に比較的限局した炎症が存在し、インターフェロンを中心とした免疫系の活性化がAERRPSの病態に何らかの役割を果たすことを示唆している。この新たな知見はAERRPSに対する新規治療法の開発に向けた重要な一歩となると期待される。

A. 研究目的

難治頻回部分発作重積型急性脳炎(AERRPS)は、極めて難治かつ頻回の部分けいれんにより特徴づけられる原因不明の疾患である。けいれんは数ヶ月にわたって持続し長期間のバルビタール麻酔を要するうえに、生涯にわたり難治てんかんならびに知的障害を残し予後は不良である。近年類似の疾患概念 febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES) が提唱され、AERRPSとFIRESは全く同一ではないもののほぼ同等と考えてよい。

AERRPSの原因は今なお全く不明である。一部の症例においてDravet症候群の原因遺伝子である *SCN1A* の変異を認めたという報告がある。AERRPSとDravet症候群は共に発熱によりけいれんが誘発されやすいという臨床的な共通点を認めることから、両疾患が同一スペクトラムであるという考え方が提唱された。しかしFIRESの症例では *SCN1A* 変異は一例も見いだされず、少なくとも *SCN1A* 変異はAERRPSの主要な原因ではないと考えられる。さらにFIRESに対して難治てんかんの治

療法であるケトン食療法が奏効することも、本疾患がてんかんの一種であるという考え方を支持する根拠となっている。一方で抗電位依存性カリウムチャネル複合体抗体をはじめとする抗神経抗体の関与を示唆する報告があり、本疾患の背景に免疫学的異常が存在するという考え方がある。実際に白血病や血球貪食症候群に合併したAERRPSの症例が知られている。しかし免疫調整療法が多くの場合無効であり、FIRESの脳生検病理においてリンパ球浸潤が全く認められないことから、免疫系の関与を疑問視する向きもある。

AERRPSにおける詳細な免疫学的検討はこれまで行われていないことから、我々はAERRPSが脳炎の一種であるという仮説を立てて検証を行った。AERRPSの症例を前方視的に集積し、血清・髄液等のサンプルを用いて免疫学的バイオマーカーの検索を行い、本疾患の病態を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

以下の疾患に罹患し本研究への参加に同意が得られた患者を対象とした。

A) AERRPS：診断基準を満たす症例

B) 炎症性神経疾患：抗NMDAレセプター脳炎・辺縁系脳炎等の自己免疫性脳炎，急性散在性脳脊髄炎等

C) 非炎症性神経疾患：てんかん，発達障害等

2010年4月から2013年7月までに集積されたAERRPS27例，炎症性神経疾患16例，非炎症性神経疾患27例を対象とした。炎症性神経疾患の内訳は急性散在性脳脊髄炎 ($n = 3$)，辺縁系脳炎 ($n = 3$)，NMDAR脳炎 ($n = 3$)，オプソクローヌス-ミオクローヌス症候群 ($n = 2$)，PANDAS ($n = 2$)，亜急性硬化性全脳炎 ($n = 2$)，Rasmussen脳炎 ($n = 1$)，非炎症性神経疾患の内訳はてんかん ($n = 22$)，末梢神経障害 ($n = 2$)，脳性麻痺 ($n = 2$)，発達障害 ($n = 1$)であった。三群間で患者年齢・性別に有意差を認めなかった。

血清および髄液中のサイトカインの測定はcytometric bead array法 (BD Biosciences) により行った。炎症性サイトカインとしてinterferon (IFN) γ ，interleukin (IL) -1 β ，IL-6，IL-10，IL-12p70，tumor necrosis factor (TNF) α ，IL-8，interferon gamma-induced protein (IP)-10 (CXCL10)，monocyte chemotactic protein (MCP)-1 (CCL2)，and monokine induced by interferon gamma (MIG，CXCL9)の10種類を測定した。血清及び髄液50 μ Lを各サイトカイン特異的抗体結合ビーズと反応させた後，PE標識二次抗体と反応させ，フローサイトメーターで蛍光強度を解析した。

統計学的解析はMann-Whitney検定，Kruskal-Wallis検定，Spearman順位相関係数検定を用い， $P < 0.05$ をもって有意とした。解析はStatCel 4ソフトウェアにより行った。

(倫理面への配慮)

本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会に疫学研究として審査を申請し承認を得た(「難治頻回部分発作重積型急性脳炎の診断基準作成のための疫学研究」，承認番号：21-9-事2，平成22年1月

22日承認)。さらに東京都医学総合研究所倫理審査を受審し承認を得た(「小児神経疾患における免疫系の異常に関する研究」，承認番号12-34，平成24年8月6日承認)。被験者からは文書による同意を取得した。血清・髄液は診療機関で検体を採取した後に匿名化して研究所に送付された。また本研究は多施設共同臨床研究として日本小児神経学会共同研究支援委員会による支援を受けた (No.10-01)。

C. 研究結果

AERRPSの27症例中14例で臨床的特徴を詳細に解析した。全例発熱に伴うけいれんで発症し，けいれんの発作型は眼球偏位 ($n = 9$)，顔面間代 ($n = 8$)，片側四肢間代 ($n = 7$)，無呼吸 ($n = 7$)が多かった。脳波所見は高振幅徐波 ($n = 4$)，てんかん性異常波 ($n = 10$)が認められた。MRIは9例で異常を認め，大脳基底核 ($n = 4$)，大脳皮質 ($n = 4$)，視床 ($n = 3$)，and 海馬 ($n = 3$)などに信号異常が見られた。治療としてはメチルプレドニゾロンパルス療法 ($n = 13$)，IVIg療法 ($n = 10$)等が行われた。予後は様々で，完全回復 ($n = 2$) 軽度～中等度後遺症 ($n = 5$)，重度後遺症 ($n = 6$)であった。

血清・髄液中サイトカイン解析に関しては，血清ではAERRPSにおいてIL-6 ($P < 0.01$)，IL-8 ($P < 0.05$)，IP-10 ($P < 0.01$)，MIG ($P < 0.05$)が非炎症性神経疾患と比較して有意に高値を示した。IP-10 ($P < 0.01$)とMIG ($P < 0.01$)は炎症性神経疾患と比較しても高値であった。髄液ではAERRPSにおいてIL-6 ($P < 0.01$)，IL-8 ($P < 0.01$)，IP-10 ($P < 0.01$)，MIG ($P < 0.01$) IL-6が炎症性・非炎症性神経疾患のいずれに対しても有意に高値であった。髄液IL-6とIL-8 ($R = 0.82$ ， $P = 0.0005$) および髄液IP-10とMIG ($R = 0.71$ ， $P = 0.00$)の間には有意の相関が認められた。さらに髄液細胞数は髄液 IL-6 ($R = 0.46$ ， $P = 0.03$) ならびに髄液 IL-8 ($R = 0.52$ ， $P = 0.01$)と有意に相関し，小児の神経学的予後評価スケールであるPCPCスコアは髄液IP-10 ($R = 0.55$ ， $P = 0.01$) ならびに髄液 MIG ($R = 0.49$ ， $P = 0.03$)と有意に相関した。

D. 考察

本研究はAERRPS患者の血清および髄液において一部のサイトカイン・ケモカインが増加していることを初めて明らかにした。これはAERRPSの病態に炎症が関与することを強く示唆している。てんかんや虚血性脳障害など従来は非炎症性疾患とされてきた疾患の病態にも免疫反応が関与することは既に知られている。しかしAERRPSで認められるサイトカイン・ケモカインの異常は炎症性神経疾患と比較してもより顕著であり、上記の非炎症性疾患で認められる変化とは程度が全く異なる。またけいれん重積の結果としてIL-1 β やIL-6等のサイトカインが上昇するが、IL-8, IP-10, MIG等のケモカインの異常はこれまで全く指摘されていなかった。

IP-10とMIGは共にインターフェロン誘導性ケモカインとして知られており、またI型インターフェロンの活性上昇が関与するとされる中枢神経系ループスの髄液においても同じIL-6, IL-8, IP-10, MIGの上昇が認められることから、これらの炎症関連分子の上昇にインターフェロンの活性化が関連することが推定される。しかしAERRPSにおいて血清・髄液中IFN γ の上昇は認められなかった。この原因としてIFN γ 測定感度の問題や他のインターフェロンの関与などの可能性が考えられる。

AERRPSで認められたこれらの免疫学的異常は、いずれも血清よりも髄液で顕著であった。これはいわゆるサイトカイン・ストーム型急性脳症とは全く逆のパターンであり、両者の病態が大きく異なることを反映していると考えられる。サイトカイン・ストーム型急性脳症は全身の強い炎症が脳の血管内皮細胞を活性化すると考えられているが、AERRPSでは中枢神経系に限局した強い炎症が生じていると推定される。脳内のどのような細胞が関与しているかは不明であるが、IL-6とIL-8は髄液細胞数と関連することから、中枢神経系に浸潤した白血球によって産生されている可能性がある。IP-10, MIGの産生源は不明であるが、中枢神経系の免疫担当細胞であるミクログリアはこれらのケモカインを産生すること

が知られている。

またAERRPSで見られた髄液中のサイトカイン・ケモカインの増加が疾患の原因なのか結果なのか問題となる。髄液中IP-10とMIGは予後と相関することから、これらがAERRPSにおける神経障害に何らかの形で関与することが示唆される。IP-10, MIGの中枢神経系に対する直接的な作用は知られていないが、神経細胞はその受容体であるCXCR3を発現している。

本疾患で認められた免疫学的異常は、AERRPSの新たな治療戦略を考える上で重要である。すなわちIL-6, IL-8, IP-10, MIGはAERRPSにおける治療標的となる可能性がある。既にこれらの炎症メディエーターの機能を修飾する分指標的薬が開発されており、これらはAERRPSの治療にも応用できる可能性がある。今後はAERRPSにおける炎症の主役となっている分子を同定し、それらが難治てんかんや神経障害とどのように結びついているかを解析する必要がある。

E. 結論

AERRPSでは主に髄液中でIL-6, IL-8, IP-10, MIGが高値を示す。これは中枢神経系の炎症が存在することを示しており、インターフェロン系の活性化が病態に関与することを示唆する。これらの異常はてんかんにおいては過去に報告されていなかった新規のものであり、AERRPSの新たな治療戦略を考える上で重要な知見である。

F. 健康危険情報

特記すべき事項なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Hachiya Y, Uruha A, Kasai-Yoshida E, Shimoda K, Satoh-Shirai I, Kumada S, Kurihara E, Suzuki K, Ohba A, Hamano S, Sakuma H. Rituximab ameliorates anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis

by removal of short-lived plasmablasts. J Neuroimmunol. 2013 (in press)

2) Sakuma H and Noto D, Takahashi K, Saika R, Saga R, Yamada M, Yamamura T, Miyake S. Development of a Culture System to Induce Microglia-like Cells from Haematopoietic Cells. Neuropathol Appl Neurobiol. 2013 (in press)

3) 佐久間啓. 難治頻回部分発作重積型急性脳炎をめぐる最近の話題. 脳と発達. 2013;45:110-4.

2. 学会発表

1) 佐久間啓. ラット脳切片を用いた免疫組織化学法による自己免疫性脳炎関連抗神経抗体の同定. 第55回日本小児神経学会総会. 2013.5.31. 大分

2) Sakuma H. Acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures (AERRPS) / febrile infection-related epilepsy syndrome (FIRES): a multicenter study on 13 children. 30th International Epilepsy Congress. 2013.6.24. Montreal, Canada.

3) 佐久間啓. 亜急性硬化性全脳炎 (SSPE) ウイルスはI型インターフェロンによる抗ウイルス作用を回避する. 第18回日本神経感染症学会学術集会. 2013.10.11. 宮崎.

3. その他の発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録情報

1. 特許取得：なし
2. 実用新案登録：なし
3. その他：なし

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）
分担研究報告書

神経画像による急性脳症の診断・病態解析に関する研究

研究分担者 高梨 潤一 亀田メディカルセンター小児科
研究協力者 多田弘子 千葉県済生会習志野病院小児科

研究要旨

日本の小児に好発するacute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion [AESD] では、急性期 MR spectroscopy (MRS) で Glutamine (Gln)+Glutamate (Glu) [Glx] が高値を呈し、興奮毒性仮説の一つの根拠となっている。脳内Glxの上昇をMRSで検出することが可能かを検討するため、Glu transporter 1 (GLT1) CKOマウスの脳代謝をMRSで測定した。Gln の高値を認めたが、Gluは正常であった。MRS はGlxの脳内変動を検出可能である。

A. 研究目的

日本の小児に好発するacute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion [AESD] では急性期に Glutamine (Gln)+Glutamate (Glu) [Glx]高値が報告され、興奮毒性仮説の一つの根拠となっている。一方で脳内（髄液ないしシナプス間隙）Glu 濃度は $\mu\text{M/l}$ のスケールでありMRSで観察される mM/l 単位とは大きな隔たりがある。今回アストロサイトシナプス後膜でのGlu取り込みに重要なGLT1-CKOマウスを用いGlx上昇がMRSで検出可能かを検討する。

B. 研究方法

対象は20週齢の正常マウス1匹とGLT-CKOマウス1匹である。放射線医学総合研究所にて動物実験研究承諾を得たのち、Bruker社製 7テスラMR装置を用いてT1, T2強調画像、拡散強調画像、proton MRS (PRESS法, TR=4000msec, TE=20msec, NEX 256, VOI=2x2x2mm or 3x3x3mm) を撮像した。MRSはLCModel を用い定量解析した。

C. 結果

GLT1 CKOマウスでwildマウスに比してGln の高値を認めたが、Gluは正常であった。

D. 考察

AESDではGlxが急性期に高値を呈し、経時的に正常化することが報告されている。今回のGLT CKOマウスの検討から脳内Glx高値はMRSで検出可能であること、Glnの上昇がGlx高値の本態と推定された。Gluは生体に有害であり、Gluを無害なGlnに変換する機構が働いていると考えられる。

E. 結論

Gluが関与すると想定される病態の検討にMRSは有用である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1) Takanashi J, Taneichi H, Misaki T, Yahata Y, Okumura A, Ishida Y, Miyawaki T, Okabe N, Sata T, Mizuguchi M. Clinical and radiological features of encephalopathy during 2011 E. coli O111 outbreak in Japan. *Neurology* in press.

- 2) Takanashi J, Osaka H, Saitsu H, Sasaki M, Mori H, Shibayama H, Tanaka M, Nomura Y, Terao Y, Matsumoto N, Barkovich AJ. Different patterns of hypomyelination and cerebellar abnormality between *POLR3A* and *POLR3B* mutations. *Brain Dev* in press.
- 3) Takanashi J, Nitta N, Iwasaki N, Saito S, Tanaka R, Barkovich AJ, Aoki I. Neurochemistry in Shiverer mouse depicted on MR spectroscopy. *J Magn Reson Imaging* in press.
- 4) Shiihara T, Miyake T, Izumi S, Sugihara S, Watanabe M, Takanashi J, Kubota M, Kato M. Serum and CSF biomarkers in acute pediatric neurological disorders. *Brain Dev* in press.
- 5) Kouga T, Iai M, Yamashita S, Aida N, Takanashi J, Osaka H. A child with three episodes of reversible splenial lesions. *Neuropediatrics* 2013; 44: 199-202.
- 6) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. *ADORA2A* polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology* 2013; 80: 1571-1576.
- 7) Yamamoto T, Sato H, Lai PS, Nurputra DK, Harahap NIF, Morikawa S, Nishimura N, Kurashige T, Tomohiko O, Nakajima H, Yamada H, Nishida Y, Toda S, Takanashi J, Takeuchi A, Tohyama Y, Kubo Y, Saito K, Takeshima Y, Matsuo M, Nishio H. Intragenic mutations in *SMN1* may contribute more significantly to clinical severity than *SMN2* copy numbers in some spinal muscular atrophy (SMA) patients. *Brain Dev* in press.
- 8) Lopez E, Thauvin-Robinet C, Reversade B, Khartoufi NE, Devisme L, Holder M, Ansart-Franquet H, Avila M, Lacombe D, Kleinfinger P, Kaori I, Takanashi JI, Le Merrer M, Martinovic J, Noël C, Shboul M, Ho L, Güven Y, Razavi F, Burglen L, Gigot N, Darmency-Stamboul V, Thevenon J, Aral B, Kayserili H, Huet F, Lyonnet S, Le Caignec C, Franco B, Rivière JB, Faivre L, Attié-Bitach T. *C5orf42* is the major gene responsible for OFD syndrome type VI. *Hum Genet* in press.
- 9) Tada H, Takanashi J. MR spectroscopy in 18q- syndrome suggesting other than hypomyelination. *Brain Dev* in press.
- 10) Miyake N, Koshimizu E, Okamoto N, Mizuno S, Ogata T, Nagai T, Kosho T, Ohashi H, Kato M, Sasaki G, Mabe H, Watanabe Y, Yoshino M, Matsuishi T, Takanashi J, Saitsu H, Yoshiura K, Matsumoto N, Niikawa N, et al. *MLL2* and *KDM6A* mutations in patients with Kabuki syndrome. *Am J Med Genet* 2013; 161: 2234-2243.
- 11) Yoneda Y, Haginoya K, Kato M, Osaka H, Yokochi K, Arai H, Kakita A, Yamamoto T, Otsuki Y, Shimizu SI, Wada T, Koyama N, Mino Y, Kondo N, Takahashi S, Hirabayashi S, Takanashi J, Okumura A, Miyatake S, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H, et al. Phenotypic Spectrum of *COL4A1* Mutations: Porencephaly to Schizencephaly. *Ann Neurol* 2013; 73: 48-57.
- 12) Okumura A, Hayashi M, Shimojima K, Ikeno M, Uchida T, Takanashi J, Okamoto N, Hisata K, Shoji H, Saito A, Furukawa T, Kishida T, Shimizu T, Yamamoto T. Whole-exome sequencing of a unique brain malformation with periventricular heterotopia, cingulate polymicrogyria, and midbrain tectal

hyperplasia. *Neuropathology* 2013; 33: 553-560.

- 13) 高梨潤一. インフルエンザ脳症. 小児内科 2013; 45: 273-278.
- 14) 井上健、岩城明子、黒澤健司、高梨潤一、出口貴美子、山本俊至、小坂仁. 先天性大脳白質形成不全症—ゲノム解析から診断、治療への取り組み. 脳と発達 2013; 45: 122-126.
- 15) 高梨潤一. MRI, MR spectroscopyによる先天性大脳白質形成不全症の診断、病態解明. 脳と発達 2013; 45: 132-136.
- 16) 高梨潤一. 小児急性脳症の臨床と画像. 神経感染症 2013; 18: 68-73.

H. 知的所有権の取得状況

なし。

患者iPS細胞を用いたてんかん性脳症の病態研究

研究分担者 廣瀬 伸一（福岡大学医学部小児科 教授）

研究要旨

重症・難治性急性脳症にNa⁺チャネルの α 1サブユニットの遺伝子、*SCN1A*の変異が関係することが知られている。一方、多くの*SCN1A*の変異はDravet症候群を来す。このため、Dravet症候群の病態を探り、治療法の開発のために、患者より人工多能性幹細胞（iPS）細胞を樹立した。その後、神経細胞、グリア細胞に誘導分化させることに成功した。分化神経細胞の多くはGABAergicであった。分化神経細胞の電気生理学的特性を解析したところ、活動電位の発火がコントロールに比べ減弱していた。すなわち、Dravet症候群の病態が抑制系神経細胞の異常による事が明らかとなった。

A. 研究目的

重症・難治性急性脳症にNa⁺チャネルの α 1サブユニットの遺伝子、*SCN1A*の変異が関係することが知られている。一方、多くの*SCN1A*の変異はDravet症候群を来す。このため、Dravet症候群の病態を探り、その治療法の開発のために、患者より人工多能性幹細胞（iPS）細胞を樹立した。その後、神経細胞に分化誘導させ、その病態を解析した。

B. 研究方法

対象は、29歳の女性で、*SCN1A*にR1645Xのヘテロのナンセンス変異を持つ临床上典型的なDravet症候群を呈する患者である。

この患者から線維芽細胞を樹立後、山中4因子の導入より、iPS細胞二系統を樹立することに成功した。つぎに、分化誘導を行い神経細胞とグリア細胞を得た。*SCN1A*のプロモーターで発光する蛍光を指標に、カレントパッチクランプ法を用いて、神経細胞の電気生理学的特性を、健常者より同様の方法により樹立した神経細胞と比較した。（倫理面への配慮）本研究は福岡大学倫理委員会承認を受け実施した。また、患者両親に対して書面により説明し、書面にて同意を得て実施した。

C. 研究結果

樹立したiPS細胞は未分化状態が維持さ

れており、また奇形腫形成能を有しており、iPS細胞の要件を満たしていた。また、iPS細胞分化した神経細胞のいずれも、患者の*SCN1A*の変異を保持していた。我々の実験条件下では分化した神経のほとんどはGABAergicの抑制ニューロンであった。また、Na⁺チャネルはAxon Initial Segmentに位置しており、生体内の局在に一致していた。電気生理学には、患者由来の神経細胞では、活動電位の発生が減弱していることが分かった。特に刺激として与えた電流を大きくすると、健常者由来の神経細胞との差が顕著となった。

D. 考察

実験の結果、Dravet症候群では、GABAergicの抑制系神経細胞の機能減弱により、相対的な神経興奮が起こり激しいてんかん発作が起こるものと考えられた。この病態は、マウスの相同遺伝子*Scn1a*遺伝子のノックイン動物で得られた所見と一致していた。また、Dravet症候群の患者ではNa⁺チャネルの抑制薬で、てんかん発作が悪化するが、この現象も本研究で明らかになった抑制系のGABAergic神経細胞の機能不全の病態から容易に説明できた。

E. 結論

*SCN1A*の変異はDravet症候群の病態を、患者iPS細胞から分化させたヒト神経細胞を用いて明らかにした。その本態は抑制系のGABAergic神経細胞の機能不全であり、iPS細胞を利用することにより、病態に基づい

た治療法の開発が期待された。以上より、患者由来のiPS細胞を利用した病態研究とそれに続く治療法の開発は多くの神経疾患に応用可能で有用な手法になると思われた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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(7): 564-572.
- 2) Higurashi N, Uchida T, Hirose S, Okano H. Current Trends in Dravet syndrome Research. *J Neurol Neurophysiol*. 2013 in press.
- 3) Sugawara T, Yoshida S, Onodera N, Wada K, Hirose S, Kaneko S. Detection of SCN1A mutations in patients with severe myoclonic epilepsy in infancy by custom resequencing array. *Journal of Epileptology*. 2013 21:5-13.

- 4) Yamada J, Zhu G, Okada M, Hirose S, Yoshida S, Shiba Y, Migita K, Mori F, Sugawara T, Chen L, Liu F, Yoshida S, Ueno S, Kaneko S. A novel prophylactic effect of furosemide treatment on autosomal dominant nocturnal frontal lobe epilepsy (ADNFLE). *Epilepsy Res.* 2013;107(1-2):127-37. Epub 2013/09/21.
- 5) Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi J, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M. ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus. *Neurology.* 2013;80(17):1571-6. Epub 2013/03/29.
- 6) Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S. Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Mov Disord.* 2013. Epub 2013/10/15.
- 7) Nakazawa M, Okumura A, Niiijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T. Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy. *Brain Dev.* 2013;35(7):667-9. Epub 2012/11/28.
- 8) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Lossin C, Baram TZ, Hirose S. Novel HCN2 Mutation Contributes to Febrile Seizures by Shifting the Channel's Kinetics in a Temperature-Dependent Manner. *PLOS ONE.* 2013;8(12):e80376. Epub 2013/12/11.
- 9) Migita K, Yamada J, Nikaido Y, Shi X, Kaneko S, Hirose S, Ueno S. Properties of a novel GABAA receptor $\gamma 2$ subunit mutation associated with seizures. *J Pharmacol Sci.* 2013;121(1):84-7. Epub 2012/12/22.
- 10) 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 WT, 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):524-30. Epub 2012/10/18.
- 11) 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):467-71. Epub 2013/09/14.
- 12) 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.
- 13) Inoue T, Kawawaki H, Kuki I, Nabatame S, Tomonoh Y, Sukigara S, Horino A, Nukui M, Okazaki S, Tomiwa K, Kimura-Ohba S, Inoue T, Hirose S, Shiomi M, Itoh M. A case of severe progressive early-onset epileptic encephalopathy: unique GABAergic interneuron distribution and imaging. *J Neurol Sci*. 2013;327(1-2):65-72. Epub 2013/02/21.
- 14) Inoue T, Ihara Y, Tomonoh Y, Nakamura N, Ninomiya S, Fujita T, Ideguchi H, Yasumoto S, Zhang B, Hirose S. Early onset and focal spike discharges as indicators of poor prognosis for myoclonic-astatic epilepsy. *Brain Dev*. 2013. Epub 2013/09/24.
- 15) Hirose S, Scheffer IE, Marini C, De Jonghe P, Andermann E, Goldman AM, Kauffman M, Tan NC, Lowenstein DH, Sisodiya SM, Ottman R, Berkovic SF, Genetics Commission of the International League Against E. SCN1A testing for epilepsy: application in clinical practice. *Epilepsia*. 2013;54(5):946-52. Epub 2013/04/17.
- 16) Higurashi N, Uchida T, Lossin C, Misumi Y, Okada Y, Akamatsu W, Imaizumi Y, Zhang B, Nabeshima K, Mori MX, Katsurabayashi S, Shirasaka Y, Okano H, Hirose S. A human Dravet syndrome model from patient induced pluripotent stem cells. *Mol Brain*. 2013;6:19. Epub 2013/05/04.
- 17) Higurashi N, Okano H, Hirose S. The effect of SCN1A mutations on patient-derived GABAergic neurons: what are the implications for future Dravet syndrome therapeutics? *Future Neurol*. 2013;8(5):487-9
- 18) Higurashi N, Nakamura M, Sugai M, Ohfu M, Sakauchi M, Sugawara Y, Nakamura K, Kato M, Usui D, Mogami Y, Fujiwara Y, Ito T, Ikeda H, Imai K, Takahashi Y, Nukui M, Inoue T, Okazaki S, Kirino T, Tomonoh Y, Inoue T, Takano K, Shimakawa S, Hirose S. PCDH19-related female-limited epilepsy: further details regarding early clinical features and therapeutic efficacy. *Epilepsy Res*. 2013;106(1-2):191-9. Epub 2013/05/29.
- 2, 学会発表
- 1) Ihara Y, Ishii A, Kaneko S, Hirose S. A genetic analysis of benign neonatal epilepsy in Japan. *International Symposium on Neonatal Seizures and Related disorders (ISNS) The 15th*

- Annual Meeting 2013.4.12-14/ Tokyo, Japan
- 2) Inoue T, Fujita T, Tomonoh Y, Ninomiya S, Nakamura N, Ideguchi H, Yasumoto S, Hirose S. Effects of lamotrigine on a patient with early myoclonic encephalopathy. International Symposium on Neonatal Seizures and Related disorders (ISNS) The 16th Annual Meeting 2013.4.12-14/Tokyo, Japan
- 3) Hirose S, Ihara Y, Ishii A. Frequency of Mutations of KCNQ2 and KCNQ3 in Benign Neonatal Epilepsy in Japan. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/Soul, Korea
- 4) Uchida T, Deshimaru M, Koyama S, Yanagawa Y, Hirose S. KCNQ2 mutation enhances firing activity of gabaergic interneurons in the hippocampus of neonatal mice. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/Soul, Korea
- 5) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Hirose S. Electrophysiological analysis of mutant HCN channels found in febrile seizure patients. Korean Epilepsy Congress 2013. 2013.6.13-15/ Soul, Korea
- 6) Hirose S. Molecular basis of benign familial infantile epilepsy and related syndromes. 30th international Epilepsy Congress. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 7) Ihara Y, Ishii A, Kaneko S, Hirose S, The Epilepsy Genetic Study Group Japan. KCNQ2 and KCNQ3 abnormalities in benign neonatal epilepsy (BNE): a genetic analysis of BNE in Japan. 30th international Epilepsy Congress. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 8) 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. 2013.6.23-27/ Montreal, Canada
- 9) Nakamura Y, Shi X, Numata T, Mori Y, Inoue R, Hirose S. Novel HCN2 mutation found in febrile seizure patients affects temperature sensitivity. 2013.9.4-7/ Hamamatsu, Japan.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
1. 特願2008-031002 : てんかんモデル非ヒト哺乳動物
 2. 特願2008-273446 : 変異導入遺伝子およびそれを導入したノックイン非ヒト動物
 3. 特願2009-188152 : 注意欠陥/多動

性障害診断用モデル非ヒト動物

4. 特願2010-60019：リーシークエン
スDNAチップおよび最適抗てん
かん薬決定方法

寄与した指針又はガイドライン等：

1. 廣瀬伸一. 遺伝学的診断マニュアル. 稀少難治てんかん診療マニュアル. 診断と治療社2013:109-13.
2. 日暮憲道、廣瀬伸一. 女性に発症するPCDH19関連てんかん. 稀少難治てんかん診療マニュアル. 診断と治療社. 2013:22-4.
3. Hirose S, Scheffer IE, Marini C,

De Jonghe P, Andermann E,
Goldman AM, Kauffman M, Tan
NC, Lowenstein DH, Sisodiya
SM, Ottman R, Berkovic SF,
Genetics Commission of the
International League Against E.
SCN1A testing for epilepsy:
application in clinical practice.
Epilepsia. 2013;54(5):946-52.
Epub 2013/04/17.

2. 実用新案登録
なし

安静時機能的MRIによる急性脳症の機能的結合に関する研究

研究分担者 山内 秀雄（埼玉医科大学小児科 教授）

研究要旨

急性脳症における神経学的後遺症として運動機能障害などの他に、知的障害・発達障害などをはじめとする高次機能障害については画像化する方法に乏しかった。急性脳症に認められる高次機能障害の評価として安静時機能的磁気共鳴画像法（RS-fMRI）が有用であるかの予備実験を行った。

A. 研究目的

安静時機能的磁気共鳴画像法（以下RS-fMRI）は安静時脳活動のゆらぎから脳内機能的結合の抽出し画像化する方法である。現在痴呆研究領域などにおいてその有用性が報告されている。これまでのところ海内外ともに小児・成人の急性脳症を対象とした研究報告はない。本研究は小児急性脳症にRS-fMRIを施行することによって、脳内機能的結合の異常について検討することが目的である。最終的には急性期の撮像も含めた形で施行することを目指す。まずは神経学的後遺症を認めた児に対してRS-fMRIを施行し、その有用性について考察することを目的とした。

B. 研究方法

当院入院外来で診療中の急性脳症の神経学的後遺症を有するけいれん重積型急性脳

症3名を対象とする。標準的MRI終了後に追加する形でRS-fMRIを施行する。

MRI撮像装置は3T MRI Skyraを使用し、撮像時間は約7分間、データ解析は東京大学医学系研究科分子脳病態科学林俊宏博士とともにやり、データ解析方法はUS-ADNI2およびHCPを使用する。

（倫理面の配慮）

MRIデータは連結可能匿名化とし院外研究施設に移送される場合は匿名化された情報のみが送られることとし、個人情報保護に努める。

C. 研究結果

予備実験として本研究の実施場所である埼玉医科大学病院放射線科MRI室に設置された3T MRI Skyraを用いて本報告者自身脳のRS-fMRIを施行し良好な画像描出を確認した。

D. 考察

小児急性脳症のRS-fMRIを画像化するためには、対象脳のfMRI画像データを取得するとともに、年齢相当の標準脳が必要であり、また画像化までの統計学的手法の自動化（現在マニュアルで施行している）が必要である。本研究期間中には急性脳症患者のRS-fMRI画像化までには至らなかった。

E. 結論

小児急性脳症を対象とするRS-fMRI画像化をできるだけ早急に行い評価に役立てる必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
水口雅	急性脳症, ライ症候群.	日本臨牀社	別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 25, 感染症症候群 (第2版) — 症候群から感染性単一疾患までを含めて—	日本臨牀社	東京	2013	148-152
水口雅	ウイルス性脳炎・脊髄炎・髄膜炎概論.	日本臨牀社	別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 26, 神経症候群 (第2版) — その他の神経疾患を含めて—	日本臨牀社	東京	2013	529-535
水口雅	大腸菌.	日本臨牀社	別冊日本臨牀, 新領域別症候群シリーズ, No. 26, 神経症候群 (第2版) — その他の神経疾患を含めて—	日本臨牀社	東京	2013	774-778
高梨潤一	小児神経疾患.	日本磁気共鳴医学Proton MRSの臨床有用性検討会	Proton MRS の臨床有用性コンセンサスガイド 2013年度版	日本磁気共鳴医学	東京	2013	36-48
高梨潤一	可逆性の脳梁病変を有する軽症脳炎脳症.	青木茂樹、阿部修、増谷佳孝、高原太郎	これでわかる拡散MRI 第3版	秀潤社	東京	2013	284-285
高梨潤一	二相性脳症・痙攣重積型急性脳症.	青木茂樹、阿部修、増谷佳孝、高原太郎	これでわかる拡散MRI 第3版	秀潤社	東京	2013	286-289
廣瀬伸一	てんかん.	日本小児神経学会教育委員会	小児神経学の進歩 第42集	診断と治療社	東京	2013	106-112

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
Sakai E, Yamanaka G, Kawashima H, Morishima Y, Ishida Y, Oana S, Miyajima T, Shinohara M, Saitoh M, Mizuguchi M.	A case of recurrent acute encephalopathy with febrile convulsive status epilepticus with carnitine palmitoyltransferase II variation.	Neuropediatrics	44(4)	218-221	2013
Shinohara M, Saitoh M, Nishizawa D, Ikeda K, Hirose S, Takanashi JI, Takita J, Kikuchi K, Kubota M, Yamanaka G, Shiihara T, Kumakura A, Kikuchi M, Toyoshima M, Goto T, Yamanouchi H, Mizuguchi M.	ADORA2A polymorphism predisposes children to encephalopathy with febrile status epilepticus.	Neurology	80(17)	1571-1576	2013
Mizuguchi M.	Influenza encephalopathy and related neuropsychiatric syndromes.	Influenza and Other Respiratory Viruses	7(Suppl 3)	67-71	2013
水口雅.	急性脳症—発症の遺伝的背景—	Neuroinfection	18(1)	54-59	2013
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Morichi S, Muguruma T, Saito O, Fujimoto JI, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T.	Severe form of encephalopathy associated with 2009 pandemic influenza A (H1N1) in Japan.	Journal of Clinical Virology	56 (1)	25-30	2013
Okumura A, Nakagawa S, Kawashima H, Muguruma T, Saito O, Fujimoto J, Toida C, Kuga S, Imamura T, Shimizu T, Kondo N, Morishima T.	Unexpected cardiopulmonary arrest associated with influenza: our experience during the 2009 pandemic in Japan.	Influenza and Other Respiratory Viruses	7 (5)	759-760	2013
Igarashi A, Okumura A, Kitamura Y, Jinbo K, Akatsuka S, Tanuma N, Shimizu T, Hayashi M.	Acute limbic encephalitis with focal hyperperfusion on single photon emission computed tomography.	Brain and Develoment	35 (2)	181-184	2013

Suganuma H, Okumura A, Kitamura Y, Shoji H, Shimizu T.	Effect of hypoxic-ischemic insults on the composition of fatty acids in the brain of neonatal rats.	Annals of Nutrition and Metabolism	62(2)	123-128	2013
Kubota T, Fukasawa T, Kitamura E, Magota M, Kato Y, Natsume J, Okumura A.	Epileptic seizures induced by dexmedetomidine in a neonate.	Brain and Development	35 (4)	360-362	2013
Hiraiwa-Sofue A, Ito Y, Ohta R, Kimura H, Okumura A.	Human herpesvirus 6-associated encephalopathy in a child with Dravet syndrome.	Neuropediatrics.	44 (3)	155-158	2013
Nakazawa M, Okumura A, Nijima S, Yamashita S, Shimono K, Hirose S, Shimizu T.	Oral mexiletine for lidocaine-responsive neonatal epilepsy.	Brain and Development	35 (7)	667-669	2013
Nakano T, Okumura A, Tanabe T, Niwa S, Fukushima M, Yonemochi R, Eda H, Tsutsumi H.	Safety evaluation of laninamivir octanoate hydrate through analysis of adverse events reported during early post-marketing phase vigilance.	Scandinavian Journal of Infectious Diseases	45 (6)	469-477	2013
Ishii A, Shioda M, Okumura A, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T.	A recurrent <i>KCNT1</i> mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy.	Gene	531 (2)	467-471	2013
Hachiya Y, Uruha A, Kasai-Yoshida E, Shimoda K, Satoh-Shirai I, Kumada S, Kurihara E, Suzuki K, Ohba A, Hamano S, Sakuma H.	Rituximab ameliorates anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis by removal of short-lived plasmablasts	Journal of Neuroimmunology	265(1-2)	128-130	2013
Sakuma H and Noto D, Takahashi K, Saika R, Saga R, Yamada M, Yamamura T, Miyake S.	Development of a culture system to induce microglia-like cells from haematopoietic cells.	Neuropathology and Applied Neurobiology	in press		2014
佐久間啓	難治頻回部分発作重積型急性脳炎をめぐる最近の話題	脳と発達	45(2)	110-114	2013