

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）  
分担研究報告書

希少難治性てんかんのレジストリ構築による総合的研究  
- 希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築 -

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

希少難治性てんかんは、その多くが乳幼児・小児期にてんかん性脳症を来し発達障害に至るため、適切な診療体制の普及と有効な治療法の開発、および予防が喫緊の深題である。このため、レジストリの遺伝子解析のキーステーションリンク構築を目指し、診断精度の向上を計るため、走行性焦点発作を伴う乳児てんかん、Dravet症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん）、片側痙攣片麻痺てんかん症候群、PCDH19関連てんかんおよびKCNQ2関連乳児早期てんかん性脳症についての遺伝子解析を行った。いずれの希少難治性てんかんでも遺伝子異常を発見できたが、今後解析を必要とする候補遺伝子および、レジストリ登録症例の増加にそなえ、今後次世代シーケンサーによる、遺伝子解析キーステーション構築をおこなう予定である。

A．研究目的

遺伝子解析のキーステーションとして、全国からレジストリに寄せられる検体の遺伝子異常を網羅的に検索してその情報を臨床情報と一緒にレジストリに登録を行う。この遺伝子検索にはPCDH19等を始めとする、希少難治性てんかんを引き起こす遺伝子が含まれる。

B．研究方法

本年度は遊走性焦点発作を伴う乳児てんかん、Dravet症候群（乳児重症ミオクロニーてんかん）、片側痙攣片麻痺てんかん症候群、PCDH19関連てんかんおよびKCNQ2関連乳児早期てんかん性脳症についての遺伝子解析を行った。本年度は遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんでは主にKCNT1遺伝子、Dravet症候群ではSCN1A, 2A, 1B等のNa<sup>+</sup>チャネル遺伝子の他、GABRG2等のGABAA受容体関連の遺伝

子、片側痙攣片麻痺てんかん症候群に対しては、CACNA1A, ATP1A2, SCN1A and PRRT2, PCDH19関連てんかんではPCDH19、KCNQ2関連乳児早期てんかん性脳症については、KCNQ2のほかKCNQ3などの候補遺伝子に関して、サンガー法を用いて直接シーケンス法のほか、一部の遺伝子に対しては、MLPA法を用いて関連遺伝子を含む、染色体の微小欠失を検索した。

この他、West症候群に対してはColumbia大学のゲノム解析センターと共同で次世代シーケンサーを用いた、てんかんの候補遺伝子の網羅的解析を開始した。

（倫理面への配慮）

患者遺伝子変異解析を行うにあたり、「平成13年の文部科学省・厚生労働省・経済産業省のヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に従い、施設間の譲渡書の作成、同意書の改定、説明文書の準備および遺伝カウンセ

セラーの設置などをバンク参加施設で統一し、さらに「個人情報保護に関する法律」(平成15年5月30日法律第57号)を受け、同意書の整備、匿名化の再評価を実施した。以上の指針・法律に基づき、患者遺伝子変異解析は福岡大学病院倫理委員会で改定認可された方法で実施した(平成21年9月24日承認済み)。今後、更なる患者遺伝子変異解析が必要な場合は「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針(平成25年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第1号)」に基づき実施する予定である。

尚、福岡大学病院には遺伝診療部があり、必要に応じて遺伝カウンセリングを実施している。

#### C. 研究結果

遊走性焦点発作を伴う乳児てんかんは12例のうち3例にKCNT1遺伝子異常を見いだした。Dravet症候群は755例解析し318例にSCN1Aの遺伝子異常を17例に微小欠失を見いだしGABRG2等のGABA受容体関連の遺伝子には変異はなかった。片側痙攣片麻痺てんかん症候群では、CACNA1Aに異常を1例に見いだした。PCDH19関連てんかんは80例収集して、内17例にPCDH19の異常を見いだした。乳児早期てんかん性脳症では、KCNQ2の遺伝子の異常は見いだせなかった。現在、West症候群の次世代シーケンサーによるてんかんの候補遺伝子の網羅的解析は進行中である。

#### D. 考察

稀少難治性てんかんで、候補遺伝子解析により、遺伝子異常を同定することが可能であった。その情報をもとに今後、稀少難治性てんかんの病態解明がすすみ、引いてはその情報が病

態に基づく画期的な治療開発につながると期待される。一方、今後稀少難治性てんかんで報告される遺伝子の増加と、レジストリに登録される患者数の増加が予想されるため、現在のサンガーシーケンスを用いた方法では、時間的に限界に達すると思われる。このため、今回実験的にWest症候群に対して実施して居る次世代シーケンサーによるてんかん候補遺伝子の網羅的解析が望まれる。

以上を踏まえ、当施設ではレジストリに登録される症例の遺伝子解析キーステーションとなるべく、次世代シーケンサーを導入して、現在稼働準備中である。

#### E. 結論

稀少難治性てんかんに関連する多くの遺伝子が報告されるようになり、適切な診療体制の普及と有効な治療法の開発に、稀少難治性てんかんレジストリに遺伝子解析の情報が必須であり、今後さらなる遺伝子解析キーステーション構築が望まれる。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

- (1) Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, Yamashita S, Imai K, Kubota T, Fukasawa T, Okanishi T, Enoki H, Tanabe T, Saito A, Furukawa T, Shimizu T, Milligan J. C, Petrou S, Heron E. S, Dibbens M, Leanne Hirose S, Okumura A. Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures. PLoS ONE. 2015 in press.
- (2) Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Saitoh M, Mizuguchi M, Ihara Y, Ishii A, Hirose S. A case of recurrent

- encephalopathy with SCN2A missense mutation. *Brain Dev.* 2015 in press.
- (3) 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.* 2015;37(2):243-9. Epub 2014/05/14.
- (4) Tomonoh Y, Deshimaru M, Araki K, Miyazaki Y, Arasaki T, Tanaka Y, Kitamura H, Mori F, Wakabayashi K, Yamashita S, Saito R, Itoh M, Uchida T, Yamada J, Migita K, Ueno S, Kitaura H, Kakita A, Lossin C, Takano Y, Hirose S. The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy. *PLoS ONE.* 2014;9(2):e88549. Epub 2014/03/04.
- (5) Tomioka NH, Yasuda H, Miyamoto H, Hatayama M, Morimura N, Matsumoto Y, Suzuki T, Odagawa M, Odaka YS, Iwayama Y, Won Um J, Ko J, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Yamada K, Yoshikawa T, Yamakawa K, Aruga J. E1fn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun.* 2014;5:4501. Epub 2014/07/23.
- (6) 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):482-90.
- (7) 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):153-4.
- (8) Koyama S, Mori M, Kanamaru S, Sazawa T, Miyazaki A, Terai H, Hirose S. Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons. *Physiol Rep.* 2014;2(5):e12004.
- (9) Jingami N, Matsumoto R, Ito H, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Ikeda A, Takahashi R. A novel SCN1A mutation in a cytoplasmic loop in intractable juvenile myoclonic epilepsy without febrile seizures. *Epileptic Disord.* 2014;16(2):227-31.
- (10) 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):420-32.
- (11) Hirose S. Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Prog Brain Res.* 2014;213:55-85.
- (12) Heinzen EL, Arzimanoglou A, Brashear A, Clapcote SJ, Gurrieri F, Goldstein DB, Johannesson SH, Mikati MA, Neville B, Nicole S, Ozelius LJ, Poulsen H, Schyns T, Sweadner KJ, van den

Maagdenberg A, Vilisen B, for the ATPAWG, (Hirose S, et al). Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. Lancet Neurol. 2014;13(5):503-14.

#### 学会発表

- (1) 1.A Neonatal Case of Malignant migrating Partial Seizures in infancy. Sato T, Watanabe Y, Watanabe K, Yamashita M, Hashimoto K, Dateki S, Shirakawa T, Nakashima Y, Ihara Y, Ishii A, Hirose S, Moriuchi H. The 16th annual meeting of the infantile seizure society society (ISES 2014), Cappadocia, Turkey, 6/22-27, 2014
- (2) A recurrent KCNT1 mutation in two sporadic cases with malignant migrating partial seizures in infancy. Okumura A, Ishii A, Shioda M, Kidokoro H, Sakauchi M, Shimada S, Shimizu T, Osawa M, Hirose S, Yamamoto T, The 16th annual meeting of the infantile seizure society, Cappadocia, Turkey, 6/22-27, 2014
- (3) ノロウイルス感染による低ナトリウム(Na)血症性脳症の脳波変化 藤田貴子、倉田佐和、川谷恵理、友納優子、井原由紀子、金海武志、井手口博、廣瀬伸一、安元佐和 第44回日本臨床神経生理学会 福岡 2014.11/19-21
- (4) 脳波異常が認知行動面に影響を及ぼしていた Panayiotopoulos 症候群(PS)の2例 井原由紀子、藤田貴子、川谷恵理、友納優子、金海武志、井手口博、廣瀬伸一、安元佐和 第44回日本臨床神経生理学会 福岡 2014.11/19-21
- (5) PRRT2 遺伝子変異をみとめ乳幼児期に多彩なてんかん発作を認めた女児例 松下浩子、本田有衣子、玄茉莉、岡野創造、

石井敦士、廣瀬伸一 第48回日本てんかん学会 東京 2014.10/2-10/3

- (6) SCN1A 異常を有する3症例に対するスチリペントールの効果の検討 石原尚子、小川千香子、竹内智哉、廣瀬伸一、倉橋浩樹、夏目淳 第48回日本てんかん学会 東京 2014.10/2-10/3
- (7) Inflammatory aspects of PCDH19-related epilepsy PCDH1 関連てんかんの免疫学的側面 日暮憲道、高橋幸利、鹿島田彩子、菅原祐介、佐久間啓、保科めぐみ、大府正治、友納優子、廣瀬伸一 第48回日本てんかん学会 東京 2014.10/2-10/3
- (8) Phenotype of 20q 13.3 Microdeletion Including KCNQ2 and CHRNA4, Kurahashi H, Ishii A, Shimojima K, Yoshitomi S, Imai K, Imamura M, Seki Y, Shimizu T, Hirose S, Yamamoto T, Okumura A. 第48回日本てんかん学会 東京 2014.10/2-10/3

#### 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.  
診断と治療社. 稀少難治てんかん診療マニ  
ュアル. 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. 診断と治療社. 稀  
少難治てんかん診療マニュアル.  
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