

平成 26 年度厚生科学研究費補助金（障害者対策総合研究事業）
分担研究報告書

統合的遺伝子解析システムを用いたヒト発達障害研究

分担研究課題：年齢依存性てんかん性脳症の遺伝型と臨床型の関連性の解明

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：

PIGA は GPI(glycosyl-phosphatidyl-inositol)アンカーの最初の生合成ステップに関わり、モザイク変異により発作性夜間血色素尿症を引き起こす。最近、先天性 PIGA 変異の 1 家系男児 3 例が報告された。年齢依存性てんかん性脳症の患者 172 例について全エクソーム解析を行い、孤発男性 3 例と兄弟 2 例において 4 種類のヘミ接合性 PIGA 変異を同定した。孤発例 3 例は兄弟例 2 例と比較してより重症であった。重症例ではミオクローヌスとサプレッションバースト、高アルカリフォスファターゼ血症が認められ、Schinzel-Giedion 症候群と類似する特異顔貌や外表・内臓奇形を呈し、MRI では髄鞘化遅延と脳幹・基底核・視床・深部大脳白質の拡散制限パターンが特徴的であった。末梢血を用いた CD16 発現の FACS 解析が診断に有用である。年齢依存性てんかん性脳症においても PIGA 変異など先天性 GPI アンカー欠損症に留意する必要がある。

A．研究目的

年齢依存性てんかん性脳症は、発達期に応じた特徴的なてんかん発作と脳波所見を呈し、認知機能や運動障害などの発達障害を併発する。新生児期に発症する大田原症候群と乳児期に発症するウエスト症候群はその代表的疾患であり、私たちはこれまでに ARX, STXBP1, SPTAN1, KCNQ2 など複数の原因遺伝子を明らかにしてきた。

近年、年齢依存性てんかん性脳症において、GPI(glycosyl-phosphatidyl-inositol)アンカー欠損症の報告が散見される。GPI アンカーは、細胞表面タンパク質を細胞膜につなぎとめる糖脂質である。GPI アンカーの生合成とリモデリングには複数の遺伝子が関与し、最初の生合成ステップに関わる PIGA の造血幹細胞系列の後天的体細胞モザイク変異では発作性夜間血色素尿症をきたす。その一方、その他の先天性の GPI アンカー欠損症(PIGM, PIGV, PIGN, PIGL, PIGO, PIGT, PGAP2)では、てんかん性脳症の主症状であるてんかん発作と知的障害、運動障害の他に、顔貌異常などの外表奇形や骨格異常、心臓や腎尿路、消化管などの内臓奇形など多彩な症状が報告されている。最近、過成長と特異顔貌、ミオクローヌバーストを認める先天性 PIGA 変異の 1 家系男児 3 例が報告された(Johnston JJ, et al. Am J Hum Genet 2012)。

本研究では、てんかん性脳症の患者群における

PIGA 遺伝子変異の寄与とその臨床型を明らかにする事を目的とした。

B．研究方法

保護者の承諾を得て、脳形成異常や代謝異常、周産期障害による明らかな原因を除外された年齢依存性てんかん性脳症の患者 172 例（大田原症候群 50 例、早期ミオクローネ脳症 2 例、ウエスト症候群 50 例、乳児移動性部分発作 7 例、分類不能の乳児期発症てんかん性脳症 63 例；男 90 例、女 82 例）の末梢血リンパ球から DNA を抽出し、SureSelectXT Human All Exon Kit を用いて全エクソン領域をキャプチャー後、Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行ない、PIGA 変異の有無を確認した。次世代シーケンサーで認められた PIGA 変異は Sanger 法で変異を再確認し、同意が得られた母親の血液から DNA を抽出し保因者の判定を行った。また GPI アンカー型タンパク質の細胞表面への発現を調べるため、PIGA 変異陽性患者と正常対照の末梢血を FLAER と CD59, DAF, CD16, CD24, CD48 に対する各抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーによる FACS 解析を行った。さらに、PIGA 変異の機能解析として、プロモーターの強さが異なるベクターを用いて PIGA 欠損 JY5 細胞に野生型と変異型の PIGA cDNA を移入し、GPI アンカー型タンパク質の発現および PIGA タンパク質レベルを調べた。また、変異陽性例の臨床情

報（発作型・脳波・頭部MRI・使用薬剤と効果・併発症など）を収集し、遺伝型、機能解析結果と比較した。

C．研究結果

孤発例3例と兄弟の2例において4つのヘミ接合性 *PIGA* 変異を同定した。1例の c.1234C>T [p.R412X] 変異は既報告と同一であった。他の3つのミスセンス変異 (c.230G.T [p.R77L], c.616A.T [p.I206F], c.355C.T [p.R119W]) は過去に報告のない新しい変異で、母も同じ変異を有していた。

変異症例の臨床情報のまとめを表に示す。症例1は特異顔貌、水腎水尿管症、肝芽腫の併発から Schinzel-Giedion 症候群として以前報告された (Watanabe S, et al. Brain Dev 34:151-155, 2012)。頭部MRIでは、症例1,2,5の孤発例3例において脳幹、基底核、視床、深部白質に拡散強調画像で高信号域、ADCマップで低信号域が認められた。症例3,4の兄弟例では頭部MRIは正常であった。症例1,2,5の脳波でサブプレッションバーストもしくは類似所見が認められたのに対し、症例3,4ではサブプレッションバーストは認められなかった。

5例ともCD16の細胞表面への発現が、正常の5-15%と著しく低下していた。プロモーターの強さの異なるベクターを用いた強制発現では、野生型 cDNA および強いプロモーターを用いた変異型 cDNA ではCD59, DAF, CD48の細胞表面への発現が回復したが、短縮された *PIGA* ではそれらの発現が回復されなかった。弱いプロモーターが組み込まれたベクターでは野生型のみCD59, DAF, CD48の発現が回復し、変異型および短縮された *PIGA* では回復されなかった。強いプロモーターのR412X変異型 cDNA を導入した細胞では、*PIGA* の弱い発現が認められた。

D．考察

てんかん性脳症の発端者172家系中4家系5例に、*PIGA*変異を同定した。*PIGA*の座位はXp22.2に位置し、予想通り患者は全例男性であり、男性における変異頻度は4.4%(4/90)であった。症例1,2,5の孤発例3例は特異顔貌、難治性てんかん、頭部MRI異常、重度の知的障害と運動障害を呈し、兄弟例2例と比較してより重症であった。重症例では、既報告と同じくミオクロヌスとサブプレッションバースト、高アルカリフォスファターゼ血症が認められ、*PIGA*変異例に特徴的な所見と考えられた。既報告と同じナンセンス変異p.R412Xが同定

された症例1は、出生時頭囲の増大、より早期発症の難治性てんかん、呼吸管理を必要とし早期死亡につながる重度呼吸障害など、既報告例3例と同様に、ミスセンス変異例に比べてより重症であった。*PIGA*の完全欠損は雄マウスでは胎生9日に致死となるが、今回の発現実験ではR412Xの顆粒球でGPIアンカー型タンパク質は減少しているが発現が認められた。強いプロモーターでは発現が正常レベルに回復していることから、ストップコドンの読み過ぎしリードスルーによって少量の完全長*PIGA*タンパク質が産生され部分的に機能していると考えられる。

兄弟例p.R77Lは、特異顔貌はなく運動障害も軽度で、発作の開始時期も遅く、脳波も発症時は正常で、頭部MRIにも異常を認めず、高アルカリフォスファターゼ血症はなく、比較的軽症であった。FACS解析では、R412X変異の症例1、R119Wの症例5と異なり、CD16の発現のみが低下し、弱いプロモーターを用いた解析でもR412X変異と比べて、DAFとCD48の発現が多く、機能解析の結果と一致していた。臨床的な重症度は*PIGA*タンパク質の残存活性に比例すると推測される。

大脳白質の髄鞘化遅延と白質、脳梁の低形成、軽度の脳萎縮、軽度の小脳低形成は*PIGN*, *PGAP2*, *DPM1*, *DPM2*など他の先天性GPIアンカー欠損症でも報告されているが、重症例3例で認められた頭部MRIの拡散強調画像とADCマップの異常信号はこれまで報告がない。類似所見は非ケトン性高グリシン血症、フェニールケトン尿症、メーブルシロップ尿症、リー脳症、乳児神経軸索ジストロフィー、ウイルソン病、異染色性白質ジストロフィー、カナバン病など特異的な先天性代謝異常症でも認められる。特に、非ケトン性高グリシン血症は早期ミオクロニー脳症の併発が多く、ミオクロヌスと脳波でサブプレッションバーストを示す点が*PIGA*変異例と臨床的にも類似しており、共通の病態が推測される。

症例1はSchinzel-Giedion症候群と共通の臨床所見を示していた。*SETBP1*変異を有さないSchinzel-Giedion症候群の症例においては、*PIGA*変異もしくは他の先天性GPIアンカー欠損症が隠れている可能性がある。

E．結論

PIGA 変異は様々なタイプの乳児期発症てんかん性脳症をきたし、特にミオクロヌスと脳波でサブプレッションバーストを示すSchinzel-Giedion 症候群と類似する特異顔貌や

外表・内臓奇形を呈し、MRI では髄鞘化遅延と脳幹・基底核・視床・深部大脳白質の拡散制限パターンが特徴的である。末梢血を用いた CD16 発現の FACS 解析が診断に有用である。年齢依存性てんかん性脳症においても *PIGA* 変異など先天性 GPI アンカー欠損症に留意が必要である。

F . 健康危険情報
特になし。

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1) Saitsu H, Tohyama J, Walsh T, Kato M, Kobayashi Y, Lee M, Tsurusaki Y, Miyake N, Goto YI, Nishino I, Ohtake A, King MC, Matsumoto N: A girl with West syndrome and autistic features harboring a *de novo* *TBL1XR1* mutation. *J Hum Genet* 59:581-583,2014.
- 2) Ohba C, Kato M, Takahashi S, Lerman-Sagie T, Lev D, Terashima H, Kubota M, Kawawaki H, Matsufuji M, Kojima Y, Tateno A, Goldberg-Stern H, Straussberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saitsu H: Early onset epileptic encephalopathy caused by *de novo* *SCN8A* mutations. *Epilepsia* 55:994-1000,2014.
- 3) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saitsu H, Matsumoto N: Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. *Neurogenetics* 15:193-200,2014.
- 4) Nakamura K, Kato M, Tohyama J, Shiohama T, Hayasaka K, Nishiyama K, Kodera H, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Matsumoto N, Saitsu H: *AKT3* and *PIK3R2* mutations in two patients with megalencephaly-related syndromes: MCAP and MPPH. *Clin Genet* 85:396-8,2014.
- 5) Leventer RJ, Jansen FE, Mandelstam SA, Ho A, Mohamed I, Sarnat HB, Kato M, Fukasawa T, Saitsu H, Matsumoto N, Itoh M, Kalnins RM, Chow CW, Harvey AS, Jackson GD, Crino PB, Berkovic SF, Scheffer IE: Is focal cortical dysplasia sporadic? Family evidence for genetic susceptibility. *Epilepsia* 55:e22-6,2014.
- 6) Kato M, Saitsu H, Murakami Y, Kikuchi K, Watanabe S, Iai M, Miya K, Matsuura R, Takayama R, Ohba C, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hamano S, Osaka H, Hayasaka K, Kinoshita T, Matsumoto N: *PIGA* mutations cause early-onset epileptic encephalopathies and distinctive features. *Neurology* 82:1587-96,2014.

学会発表

- 1) Mitsuhiro Kato: Interneuronopathies and genetics of the epileptic encephalopathies. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress: Singapore, August 7-10, 2014 (invited lecture)
- 2) Jun Tohyama, Noriyuki Akasaka, Yu Kobayashi, Shinichi Magara, Hideshi Kawashima, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, Hirotomoto Saitsu: Genetic analysis in infantile epileptic encephalopathies with movement disorder: a single center study. 11th European Congress on Epileptology: Stockholm, Sweden June 29 - July 3, 2014
- 3) M. Kato, H. Saitsu, H. Osaka, K. Nakamura, T. Watanabe, H. Terashima, T. Ikeda, T. Kumada, H. Matsumoto, T. Yamaguchi, J. Azuma, Y. Tominaga, M. Shinpoo, H. Arai, S. Hirai, S. Takeshita, E. Nakagawa, H. Uchio, Y. Nonoda, T. Iwasaki, T. Chiyonobu, A. Sudo, S. Kimura, Y. Takami, Y. Inaba, T. Wada, S. Kumada, M. Shimono, S. Miyama, K. Orii, N. Akasaka, J. Tohyama, M. Kubota, M. Nakashima, N. Matsumoto: Epilepsy in *STXBPI* encephalopathy: Clinical delineation of 32 Japanese patients including 14 novel patients. 68th American Epilepsy Society Annual Meeting, December 5-9, 2014, Seattle, USA
- 4) J. Tohyama, M. Nakashima, Z. Rener, Primec, C. Gaik-Siew, S. Nabatame, M. Kato, N. Matsumoto, H. Saitsu: Distinct Phenotypes And Genotypes Of SPTAN1 Encephalopathy. 68th American Epilepsy Society Annual Meeting, December 5-9, 2014, Seattle, USA

H . 知的財産権の出願・登録状況
なし

表 PIGA 変異例の臨床所見

症例	1	2	3	4	5	IV-2	IV-4
Familial or sporadic	Sporadic	Sporadic	Familial (Proband)	Familial (Brother)	Sporadic	Familial (Proband)	Familial (Brother)
Mutation	c.1234C>T (p.R412X)	c.616A>T (p.I206F)	c. 230G>T (p.R77L)	c. 230G>T (p.R77L)	c.355C>T (p.R119W)	c.1234C>T (p.R412X)	c.1234C>T (p.R412X)
Current age	Six years	10 years	Eight years	18 months	15 months	Died at 11 weeks	Died at 10 weeks
Sex	Male	Male	Male	Male	Male	Male	Male
Clinical diagnosis	Ohtahara syndrome, early myoclonic encephalopathy, Schinzel–Giedion syndrome	West syndrome with hypomyelination	Early-onset epileptic encephalopathy	Early-onset epileptic encephalopathy	West syndrome		
Polyhydramnios	+	-	-	-	+	-	+
Gestation	33 weeks	40 weeks	38 weeks	36 weeks	39 weeks	full term	35 weeks
Birth weight	2,857 g	3,566 g	2,715 g	1,896 g	3,468 g	3,540 g	3,500 g
Birth length	42.0 cm	50 cm	50 cm	N.D.	47 cm	53.5 cm	48 cm
Birth head circumference	33.2 cm	N.D.	32.5 cm	N.D.	33.5 cm	37 cm	35.5 cm
Facial dysmorphism	+	+	-	-	+	+	+
Vesicoureteral reflux	+	N.D.	-	-	N.D.	+	N.D.
Joint contractures	+	+	-	-	-	+	+
Hypotonia	+	-	-	-	+	+	+
Hyperreflexia	N.D.	-	-	-	+	+	+

Seizure onset	One month	Three months	Seven months	Seven months	Three months	Neonate	Neonate
Seizure types	Tonic seizures followed by frequent myoclonus	Myoclonus or epileptic spasm-like movement	Tonic seizures, secondarily generalized seizures	Tonic or clonic seizures	Myoclonic seizures, tonic spasms	Myoclonic seizures	Severe myoclonic seizures
EEG findings	Suppression burst at neonatal period	Hypsarrhythmia at 3 months, periodic bursts of multifocal epileptic discharges similar to suppression burst pattern at 10 years	Normal at 7 months, irregular spike-and-slow wave and multifocal spikes at 2 and 5 years	Normal at 7 months	Hypsarrhythmia at 3 months, suppression burst at 5 months	Suppression burst	Suppression burst
Seizure prognosis	Intractable	Intractable	Seizure-free at 3 years with TPM	Seizure free at 15 months	Intractable	Intractable	Intractable
Development	Hypotonic quadriplegia, profound intellectual disability	Spastic quadriplegia, profound intellectual disability	Profound intellectual disability with autism, but no motor disturbance	Moderate intellectual disability, but no motor disturbance	Hypotonic quadriplegia, profound intellectual disability	Early death	Early death
Thin corpus callosum	+	+	-	-	+(at 9 months)	+	+
White matter immaturity	+	+	-	-	+(at 9 months)	+	+
Restricted diffusion pattern	+	+	-	-	+	N.D.	N.D.
Elevated serum alkaline phosphatase	N.D.	+	-	-	+	N.D.	+

IV-2 と IV-4 は既報告(Johnston JJ, et al. Am J Hum Genet 90, 295-300, 2012), N.D., not determined; TPM, topiramate