

201442049A

厚生労働科学研究委託費
難治性疾患実用化研究事業

Dravet（ドラベ）症候群患者由来 iPS 細胞を用いた
認可医薬品スクリーニングによる革新的な医薬品開発の
シーズ探索研究に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

業務主任者 廣瀬 伸一

平成 27（2015）年 3 月

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） Dravet（ドラベ）症候群患者由来iPS細胞を用いた認可医薬品スクリーニングによる 革新的な医薬品開発のシーズ探索研究に関する研究 廣瀬 伸一	-----1
II. 学会等発表実績	----- 7
III. 研究成果の刊行物	-----12
IV. 別刷	-----16

厚生労働科学研究委託費（難治性疾患実用化研究事業）

委託業務成果報告（総括・業務項目）

Dravet（ドラベ）症候群患者由来iPS細胞を用いた認可医薬品スクリーニングによる革新的な医薬品開発のシーズ探索研究

福岡大学医学部小児科・教授・廣瀬伸一

研究要旨：Dravet（ドラベ）症候群は5万人に1人の発症の希少な難治性疾患である。患者は乳児以降の突然のけいれんで発症して精神発達遅滞や錐体外路症状など重篤な神経症状を来す。本研究ではドラベ患者 iPS 細胞由来神経細胞の電気生理学的異常をハイスループット機で解析することにより、認可医薬品 500 種以上をスクリーニングすることを目指した。異常を矯正することが出来た薬剤は、詳細な電気生理学実験でその効果を検証し、責任遺伝子 *SCN1A* のノックアウトドラベ症候群モデルマウスを使って、その医薬品の生体での効果を動物実験で確認することをめざす。今回、ドラベ症候群の患者皮膚より iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化させることに成功した。さらに分化させた神経細胞を健常対照者から同様な方法で得られたそれと比較検討し、その電気生理学的異常を明らかにした。ハイスループットスクリーニングに備え、iPS 細胞の樹立、維持の段階をフィーダー細胞不要の条件に変更することに成功し、アイソジェニックな iPS 細胞でドラベ症候群と健常対照を比較するため、健常対照 iPS 細胞にドラベ患者で発見された *SCN1A* 遺伝子異常を導入すること、その逆に成功した。以上をもって患者 iPS 細胞より分化させた神経細胞の電気生理学的特性を次世代微小電極システムで測定を始めた。本研究は、世界初の Dravet（ドラベ）症候群の iPS 細胞（人工万能幹細胞）由来神経細胞を用いて、多数の認可医薬品をスクリーニングして治療薬のシーズを探索する研究であり、ヒト脳を使うことができない中枢神経疾患の治療薬開発の先駆けとなると思われる。

A. 研究目的

対象となる疾患の Dravet（ドラベ）症候群は5万人に1人の発症の希少な難治性疾患である。患者は乳児以降の突然のけいれんで発症して精神発達遅滞や錐体外路症状など重篤な神経症状を来す。ナトリウムチャネルの遺伝子 *SCN1A* の変異に由来するが、その分子病態は原因不明である。効果的な治療法が未確立で、神経症状のため生活面への長期にわた

る支障を来す。その診断は *SCN1A* の遺伝子診断で可能である¹⁾。その病態は深刻で、真の病態に基づく、迅速でしかも安全な薬物のスクリーニングにより、革新的な治療法や予防法の開発に向けた研究が急務である。

しかしながら、ドラベ症候群は中枢神経疾患であり、治療薬・予防法の開発には患者脳細胞を利用する必要があるが、実現不能であった。申請者は最近、患者より iPS 細胞を樹立

し、神経細胞に分化させ、その分子病態を解明することに世界に先駆け成功した²⁾。このiPS細胞由来ヒト神経細胞を疾患モデルとして、すでに医薬品とし認可され安全に使用されている薬剤を網羅的にスクリーニングすれば、シーズ研究になるばかりか、いち早く臨床現場での利用につながると考えられた。

このため、今回の研究の目的はドラベ症候群の患者由来のiPS細胞から分化させた神経細胞を使い、ハイスループットの電気生理検査機器で、多数の既存の認可医薬品を網羅的にスクリーニングすることにより、既存薬の適応拡大、またはシーズを発見して、病態に基づく画期的な治療法の開発につながるものである。

B. 研究方法

I 患者iPS細胞由来神経細胞を用いた認可医薬品のハイスループットスクリーニング
Dravet(ドラベ)症候群患者のPS細胞、および、健常者のiPS細胞に遺伝子変異を導入した細胞を疾患特異的iPS細胞とする。健常者のiPS細胞と患者iPS細胞の遺伝子変異を矯正した細胞を対照とする。

以上のiPS細胞を次世代微小電極アレイシステムの48穴プレート内で神経細胞に分化させ(図2)、認可医薬品500種程度を様々な濃度で培養液中に加える。患者iPS細胞由来の神経細胞の活動電位は対照と比べ低下しているため、活動電位の正常化を指標にスクリーニングする。統計上優位な効果を認めた薬剤を候補薬剤として続く検証実験に供する。

II 患者iPS細胞由来神経細胞を用いた電気生理学的な候補薬剤の薬理検証

Iで選抜された薬剤の薬理作用を神経細胞を個別にパッチクランプすることにより検証

する。記録に際してあらかじめ対象神経細胞が蛍光を発する方法を申請者らが開発しており、この蛍光を指標にパッチクランプを行う。

III オータプス用いた患者iPS細胞由来神経細胞のシナプスネットワークへの候補薬剤の薬理検証

IIと同様にIで選抜された薬剤のシナプスへの薬理作用を、iPS細胞からオータプスを形成させことにより、候補薬剤のシナプスへの効果を検証する。

IV ドラベ症候群モデルマウスを用いた候補薬剤の薬効判定

申請者らは、ドラベ症候群の責任遺伝子SCN1Aを欠失した遺伝子改変マウスを作出することに成功した。このマウスはヒトドラベ症候群と同様に激しいけいれん、異常行動、脳波異常が観察される。IとIIで薬効が確認された薬剤をモデルマウスに投与して、症状や脳波が改善するか評価する。

倫理面への配慮

遺伝子バンクへの遺伝子の収集は、以前よりインフォームドコンセントを得て行ってきた。平成11年度厚生科学研究費補助金厚生科学特別研究事業「遺伝子による疾病対策・創薬に関する研究における生命倫理問題に関する調査報告」の中間報告を受け、同意書の整備、匿名化の徹底化を図り、福岡大学「医に関する倫理委員会」にて研究実施計画が審議され平成12年に承認された。

さらに平成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発表にともない、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ラーの設置などをバンク参加施設で統一し、倫理委医員会で改

定認可された。(てんかん・熱性けいれんの遺伝子研究、認可番号6-51)

「個人情報の保護に関する法律」(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。今後もバンク登録患者とその家族の人権擁護のため上記指針を遵守し、研究実施を行う予定である。遺伝子改変動物を用いた実験は福岡大学アニマルセンターの倫理委員会で審議されて認可されている。また「遺伝子組み換え生物などの規制による生物の多様性の確保に関する法律」を遵守し、動物の使用を行っている。尚、福岡大学病院には遺伝診療部があり、遺伝カウンセリングを実施している。

C. 研究結果

ドラベ症候群の患者皮膚より iPS 細胞を樹立し、神経細胞に分化させることに成功した。

分化させた神経細胞を健常対照者から同様な方法で得られたそれと比較検討し、その電気生理学的異常を明らかにした。

電気生理学的な異常は患者由来の GABA 系の介在神経における活動電位の減弱であった。

ハイスループットスクリーニングに備え、iPS 細胞の樹立、維持の段階をフィーダー細胞不要の条件に変更することに成功した。

アイソジェニックな iPS 細胞でドラベ症候群と健常対照を比較するため、健常対照 iPS 細胞にドラベ患者で発見された SCN1A 遺伝子異常を CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを利用して導入することに成功した。

これと相対して、ドラベ症候群から樹立した iPS 細胞の SCN1A 遺伝子異常を CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを利用して修復することに成功した。

患者 iPS 細胞より分化させた神経細胞の電気生理学的特性を次世代微小電極アレイシステムで測定を始めた。

D. 考察

市販医薬品のスクリーニングはゼブラフィッシュを使った研究があるが、ヒト iPS 細胞を疾患モデルとして利用するスクリーニングは、知りうる限り本研究が世界初である。すでに前臨床研究で必要となる遺伝子改変ドラベ症候群モデル動物の作出は成功しており、臨床応用を目指した医薬品等開発研究分野につながられる。本研究は、世界初の Dravet (ドラベ) 症候群の iPS 細胞(人工万能幹細胞)由来神経細胞を用いて、多数の認可医薬品をスクリーニングして治療薬のシーズを探索する研究であり、ヒト脳を使うことができない中枢神経疾患の治療薬開発の先駆けとなるとも思われた。

E. 結論

本研究ではドラベ患者 iPS 細胞由来神経細胞の電気生理学的異常をハイスループット機で解析することにより、認可医薬品をスクリーニングすることが可能となった。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 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, Carol J. Milligan, Steven Petrou, Sarah E. Heron, Leanne M. Dibbens, 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. Epub 2014/12/03.
 3. Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Tomonoh Y, Inoue T, Hoshina M, Satomi R, Ohfu M, Itomi K, Takano K, Kirino T, Hirose S. Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in *PCDH19* female epilepsy. *Seizure*. 2015;27:1-5.
 4. Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawawaki H, Kubota M, Yamagata T, Miyamoto A, Yamanaka G, Amemiya K, Kikuchi K, Kamei A, Akasaka M, Anzai Y, Mizuguchi M. Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline. *Brain Dev*. 2015;37:463-70. Epub 2014/08/27.
 5. 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.
 6. 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.
 7. 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. *Elfn1* recruits presynaptic *mGluR7* in trans and its loss results in seizures. *Nat Commun*. 2014;5:4501. Epub 2014/07/23.
 8. 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. Epub 2014/01/17.
 9. 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. Epub 2013/10/15.
 10. 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. Epub 2014/05/06.
 11. 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. Epub 2014/05/21.
 12. 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. Epub 2014/02/01.
 13. Hirose S. Mutant GABA_A receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy. *Prog Brain Res*. 2014;213:55-85. Epub 2014/09/10.
 14. 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, Vilsen B, for the ATPAWG, (Hirose S, et al.). Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations. *Lancet Neurol*. 2014;13(5):503-14. Epub 2014/04/18.

2. 学会発表

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 (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, Yamamaoto T, The 16th annual meeting of the infantile seizure society, Cappadocia, Turkey, 6/22-27, 2014
3. THE pathomechanisms of Dravet syndrome: Lessons From patient-Derived Induced Pluripotent stem Cells (iPSCs). Hirose S. The 16th annual meeting of the infantile seizure society (ISES 2014), Cappadocia, Turkey, 6/22-27, 2014
4. 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
5. 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
6. *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、玄菜梨、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
7. *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

8. 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
9. 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。)

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. 少難治てんかん診療マニ診断と治療社. 稀ユアル. 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ユアル. 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.

実用新案登録

なし

その他

学 会 等 発 表 実 績

委託業務題目「Dravet（ドラベ）症候群患者由来iPS細胞を用いた認可医薬品スクリーニングによる革新的な医薬品開発のシーズ探索研究」

機関名 福岡大学

1. 学会等における口頭・ポスター発表

発表した成果（発表題目、口頭・ポスター発表の別）	発表者氏名	発表した場所（学会等名）	発表した時期	国内・外の別
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	2014年11月	国内
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	2014年11月	国内
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	2014年10月	国内
SCN1A異常を有する3症例に対するステ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	2014年10月	国内
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、菅原祐之、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	2014年10月	国内
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 (ISES 2014)	2014年6月	国外

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, (ISES 2014)	2014年6月	国外
THE pathomechanisms of Dravet syndrome: Lessons From patient-Derived Induced Pluripotent stem Cells (iPSCs)	Hirose S	The 16th annual meeting of the infantile seizure society, (ISES 2014)	2014年6月	国外

2. 学会誌・雑誌等における論文掲載	発表者氏名	発表した場所 (学会誌・雑誌等名)	発表した時期	国内・外の別
Single nucleotide variations in CLCN6 identified in patients with benign partial epilepsies in infancy and/or febrile seizures.	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.	PLoS ONE.	2015 in press.	国外
A case of recurrent encephalopathy with SCN2A missense mutation.	Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Saitoh M, Mizuguchi M, Ihara Y, Ishii A, Hirose S.	Brain Dev.	2015 in press.	国外

Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy.	Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Tomonoh Y, Inoue T, Hoshina M, Satomi R, Ohfu M, Itomi K, Takano K, Kirino T, Hirose S.	Seizure	2015	国外
Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline.	Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawawaki H, Kubota M, Yamagata T, Miyamoto A, Yamanaka G, Amemiya K, Kikuchi K, Kamei A, Akasaka M, Anzai Y, Mizuguchi M.	Brain Dev.	2015	国外
Effect of CYP2C19 polymorphisms on stiripentol administration in Japanese cases of Dravet syndrome.	Kouga T, Shimbo H, Iai M, Yamashita S, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Yamakawa K, Osaka H.	Brain Dev.	2014年	国外
The kick-in system: a novel rapid knock-in strategy.	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.	PLoS ONE	2014年	国外

<p>Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures. Nat Commun.</p>	<p>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.</p>	<p>Nat Commun.</p>	<p>2014年</p>	<p>国外</p>
<p>Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood.</p>	<p>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.</p>	<p>Neurology.</p>		<p>国外</p>
<p>Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism.</p>	<p>Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S.</p>	<p>Mov Disord.</p>	<p>2014年</p>	<p>国外</p>

Obesity attenuates D2 autoreceptor-mediated inhibition of putative ventral tegmental area dopaminergic neurons.	Koyama S, Mori M, Kanamaru S, Sazawa T, Miyazaki A, Terai H, Hirose S.	Physiol Rep.	2014年	国外
A novel SCN1A mutation in a cytoplasmic loop in intractable juvenile myoclonic epilepsy without febrile seizures.	Jingami N, Matsumoto R, Ito H, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Ikeda A, Takahashi R.	Epileptic Disord.	2014年	国外
Association of nonsense mutation in GABRG2 with abnormal trafficking of GABAA receptors in severe epilepsy.	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.	Epilepsy Res.	2014年	国外
Mutant GABAA receptor subunits in genetic (idiopathic) epilepsy.	Hirose S.	Prog Brain Res.	2014年	国外
Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations.	Hemzen 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, Vilsen B, for the ATPAWG, (Hirose S, et al,	Lancet Neurol	2014年	国外

研究成果の刊行に関する一覧表

廣瀬伸一

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
Hirose S.	Mutant GA BAA recept or subunits in genetic (idiopathic) epilepsy.	Ortrud K. Steinlein	Progress in Brain Research.	Elsevier		2014	55-85
井上 貴仁 廣瀬 伸一	新生児マス・スクリーニングを契機に発見された古典型ファブリー病の1家系	衛藤 義勝	ファブリー病症例集	(株)メディカルトリビューン		2014	46-50
日暮 憲道 井原 由紀子 廣瀬 伸一	遺伝子診断が臨床上役立つケースは	池田 昭夫	症例から学ぶ戦略的てんかん診断・治療	南山堂		2014	221-223
廣瀬 伸一	小児の先進医療	五十嵐隆	小児科研修ノート 第2版	診断と治療社		2014	96-98

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
Yamamoto T, Shimajima 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	27	1-5	2015 in press.
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.
Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy.	Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, Tomonoh Y, Inoue T, Hoshina M, Satomi R, Ohfu M, Itomi K, Takano K, Kirino T, Hirose S.	Seizure			2015
Saitoh M, Shinohara M, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Shiomi M, Kawawaki H, Kubota M, Yamagata T, Miyamoto A, Yamanaka G, Amemiya K, Kikuchi K, Kamei A, Akasaka M, Anzai Y, Mizuguchi M.	Clinical and genetic features of acute encephalopathy in children taking theophylline.	Brain Dev	37	463-70	2015

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	37(2)	243-9	2015
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	9(2)	e88549	2014
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.	Elfn1 recruits presynaptic mGluR7 in trans and its loss results in seizures.	Nat Commun.	5	4501	2014
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	82(6)	482-90	2014

Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Hirose S.	Intermediate form between alternating hemiplegia of childhood and rapid-onset dystonia-parkinsonism.	Mov Disord	29(1)	153-4	2014
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	2(5)	e12004	2014
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.	16(2)	227-31	2014
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	108(3)	420-32	2014
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, Vilsen B, for the ATPAWG, (Hirose S, et al,).	Distinct neurological disorders with ATP1A3 mutations.	Lancet Neurol	13(5)	503-14	2014

RESEARCH ARTICLE

Single Nucleotide Variations in *CLCN6* Identified in Patients with Benign Partial Epilepsies in Infancy and/or Febrile Seizures

Toshiyuki Yamamoto^{1*}, Keiko Shimojima¹, Noriko Sangu¹, Yuta Komoike², Atsushi Ishii³, Shinpei Abe⁴, Shintaro Yamashita⁵, Katsumi Imai⁶, Tetsuo Kubota⁷, Tatsuya Fukasawa⁷, Tohru Okanishi⁸, Hideo Enoki⁸, Takuya Tanabe⁹, Akira Saito¹⁰, Toru Furukawa¹, Toshiaki Shimizu⁴, Carol J. Milligan¹¹, Steven Petrou¹¹, Sarah E. Heron¹², Leanne M. Dibbens¹², Shinichi Hirose³, Akihisa Okumura⁴

1 Tokyo Women's Medical University Institute for Integrated Medical Sciences, Tokyo, Japan, **2** Department of Hygiene and Public Health I, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan, **3** Department of Pediatrics, Fukuoka University Faculty of Medicine, Fukuoka, Japan, **4** Department of Pediatrics, Juntendo University Faculty of Medicine, Tokyo, Japan, **5** Department of Pediatrics, Juntendo Nerima Hospital, Tokyo, Japan, **6** National Epilepsy Center, Shizuoka Institute of Epilepsy and Neurological Disorders, Shizuoka, Japan, **7** Department of Pediatrics, Anjo Kosei Hospital, Anjo, Japan, **8** Department of Child Neurology, Seirei Hamamatsu General Hospital, Hamamatsu, Japan, **9** Tanabe Monbayashi Child Clinic, Hirakata, Japan, **10** StaGen Co., Ltd., Tokyo, Japan, **11** Florey Neuroscience Institute, Melbourne Brain Centre, The University of Melbourne, Melbourne, Victoria, Australia, **12** Epilepsy Research Program, School of Pharmacy and Medical Sciences, University of South Australia, Adelaide, South Australia, Australia

* yamamoto.toshiyuki@twmu.ac.jp



OPEN ACCESS

Citation: Yamamoto T, Shimojima K, Sangu N, Komoike Y, Ishii A, Abe S, et al. (2015) Single Nucleotide Variations in *CLCN6* Identified in Patients with Benign Partial Epilepsies in Infancy and/or Febrile Seizures. PLoS ONE 10(3): e0118946. doi:10.1371/journal.pone.0118946

Academic Editor: Ryouhei Ishii, Osaka University Graduate School of Medicine, JAPAN

Received: February 3, 2014

Accepted: January 26, 2015

Published: March 20, 2015

Copyright: © 2015 Yamamoto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was partially supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research on Innovative Areas "Foundation of Synapse and Neurocircuit Pathology" (23110534); a Grant-in-Aid for scientific research and a Grant-in-Aid of Health Labor Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan; a Grant from the Mother and Child Health Foundation in Japan; and a Grant from Kawano Masanori Memorial Public Interest Incorporated Foundation for Promotion of Pediatrics (T.Y.). This study was partially supported by a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (24791090), Japan

Abstract

Nucleotide alterations in the gene encoding proline-rich transmembrane protein 2 (*PRRT2*) have been identified in most patients with benign partial epilepsies in infancy (BPEI)/benign familial infantile epilepsy (BFIE). However, not all patients harbor these *PRRT2* mutations, indicating the involvement of genes other than *PRRT2*. In this study, we performed whole exome sequencing analysis for a large family affected with *PRRT2*-unrelated BPEI. We identified a non-synonymous single nucleotide variation (SNV) in the voltage-sensitive chloride channel 6 gene (*CLCN6*). A cohort study of 48 BPEI patients without *PRRT2* mutations revealed a different *CLCN6* SNV in a patient, his sibling and his father who had a history of febrile seizures (FS) but not BPEI. Another study of 48 patients with FS identified an additional SNV in *CLCN6*. Chloride channels (CLCs) are involved in a multitude of physiologic processes and some members of the CLC family have been linked to inherited diseases. However, a phenotypic correlation has not been confirmed for *CLCN6*. Although we could not detect significant biological effects linked to the identified *CLCN6* SNVs, further studies should investigate potential *CLCN6* variants that may underlie the genetic susceptibility to convulsive disorders.

Society for the Promotion of Science (JSPS), a Grant from the Japan Epilepsy Research Foundation (JERF), and a Grant from Kanae Foundation for the promotion of Medical Science in Japan (K.S.). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: Dr. Akira Saito is an employee of StaGen Co., Ltd. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials.

Introduction

Benign partial epilepsy in infancy (BPEI) is an epileptic syndrome described by Watanabe and Okumura [1]. BPEI is analogous to benign familial infantile epilepsy (BFIE) according to the revised terminology for organization of seizures and epilepsies [2]. The clinical features of BPEI include the onset of epilepsy during 3 to 10 months of age, clustering seizures, absence of abnormalities in electroencephalogram (EEG) or neuroimaging, favorable outcome of seizure control, and normal neurodevelopment [3]. Additionally, about 40% affected children have a family history of BPEI [3]. Some BPEI patients demonstrate paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD), suggesting an overlap between BPEI and infantile convulsions and choreoathetosis syndrome (ICCA). We have also shown that approximately 10% children with BPEI experience convulsions associated with mild gastroenteritis [3].

Recently, Chen et al. (2011) identified mutations in the gene encoding proline-rich transmembrane protein 2 (*PRRT2*) by whole exome sequencing analysis of eight Chinese families affected by autosomal-dominant PKD [4]. Subsequently, Heron et al. (2012) detected five different *PRRT2* mutations in 14 of 17 families affected by BPEI and in five of six families affected by ICCA [5]. These findings indicate that *PRRT2* is one of the major genes related to BPEI/BFIE and ICCA. However, not all BPEI patients harbor *PRRT2* mutations. In our study, mutated *PRRT2* was detected in about half of the Japanese BPEI patients, indicating the existence of other BPEI genes in the Japanese population.

In this study, we performed genomic analyses to identify additional genes involved in BPEI development.

Materials and Methods

This study was approved by the ethical committee of Tokyo Women's Medical University (registration #206). Written informed consent was obtained from all patients or their legal guardians.

Subjects

Blood samples and clinical information were collected on patients afflicted with BPEI, convulsions with mild gastroenteritis, and febrile seizures (FS). We defined BPEI as epilepsy meeting all of the following conditions: (A) clinical diagnosis of focal seizures and/or secondary generalized seizures; (B) normal psychomotor development and neurological findings prior to seizure onset; (C) normal interictal EEG; (D) normal neuroimaging findings; and (E) seizure onset at 3–12 months of age [3,6]. All samples from patients with BPEI have been previously analyzed by nucleotide sequencing of *PRRT2* coding regions [7]. Patients' clinical histories, with regard to seizure/convulsion episodes, were based on interviews of family members. FS definition was based on at least one seizure incident associated with pyrexia over 38°C.

Whole exome sequencing

Whole exome sequencing was performed for a Japanese family covering three generations (Family 1) using the Agilent SureSelect Human All Exon Capture kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) and pair-end sequencing on a SOLiD3 system (Life Technologies, Foster City, CA), as previously described [8]. Genomic DNA was isolated from blood samples of Family 1 members. Extracted results of the affected members of Family 1 (I-1, II-2, II-3, and III-1) were compared with that of the BPEI-unaffected member (II-4), used as a negative control (Fig. 1).

For prioritization, we focused only on non-synonymous variants, splice acceptor and donor site mutations, and frameshift insertion/deletions (indel) (S1 Fig.). We excluded the candidate

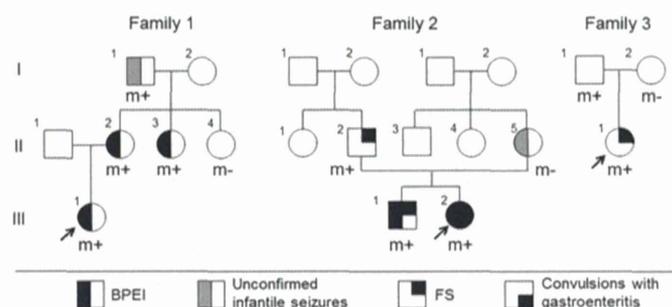


Fig 1. Family trees of three families harboring *CLCN6* variants. *CLCN6* variant-positive members are presented as (m+), and *CLCN6* variant-negative members are presented as (m-). Arrows indicate the proband in the family.

doi:10.1371/journal.pone.0118946.g001

variants that were located in segmental duplication regions and listed in the 1000 Genomes Project (<http://www.1000genomes.org/>) and dbSNP 132 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>). Because we assumed an autosomal dominant trait in Family 1, the variants shared by all the affected family members but not detected in the unaffected member were selected. Then, select non-synonymous variants were tested for mutational effects using amino acid substitution prediction tools, PolyPhen-2 [9] (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) and SIFT [10] (<http://sift.jcvi.org/>). Extracted variants were finally evaluated by Sanger sequencing as described elsewhere [11] to determine whether they segregated with the disease in this family.

Candidate gene validation

After selecting the candidate gene with a possible relationship to BPEI, we performed a cohort study to identify nucleotide alterations in the gene. Cohort 1 included 48 BPEI patients negative for *PRRT2* mutations and six children with a history of convulsions associated with mild gastroenteritis. Cohort 2 consisted of 48 unrelated patients with FS. All coding exons of *CLCN6* were analyzed by standard Sanger sequencing. Primer information is available in S1 Table. One hundred samples from healthy Japanese individuals were also used. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test.

Cell biological analysis

To confirm the pathological significance of the non-synonymous single nucleotide variants (SNVs) identified in this study, we compared the expression patterns and biological functions of the identified SNV-containing *CLCN6* with those of wild type *CLCN6* in COS-1 cells transfected with the respective expression plasmids. For this purpose, we constructed a plasmid encoding human wild type *CLCN6* complementary DNA (cDNA) and introduced two different SNVs (G250S and R319Q) into it.

Human Brain Total RNA purchased from Clontech (#636530; Mountain View, CA) was reverse-transcribed to cDNA using the SuperScript VILO cDNA Synthesis Kit (Life Technologies) according to the manufacturer's instruction. Then, *CLCN6* transcripts were amplified by PCR using the specific primers 5'-GGATCCGCCACCATGGCGGGGTGCAGGGGGTC-3' and 5'-GGATCCTTAAACTCGCCAAAGTTCAG-3', and the amplicons were cloned into the pGEM-T vector (Promega, Madison, WI). Twenty clones were established and genotyped by Sanger sequencing using T7 and Sp6 primers. Transcript variant 1-3 was selected and its full-length cDNA was subcloned into the pFLAG-CMV2M-2 expression vector containing the