

201442052A

厚生労働科学研究委託費

難治性疾患等克服研究事業  
(難治性疾患等実用化研究事業(難治性疾患実用化研究事業))

難治性てんかんを呈する希少疾患群の  
遺伝要因と分子病態の解明に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 加藤光広

平成27(2015)年3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（難治性疾患等克服研究事業（難治性疾患等実用化研究事業（難治性疾患実用化研究事業）））による委託業務として、国立大学法人山形大学 学長 小山 清人（研究代表者：加藤光広）が実施した平成26年度「難治性てんかんを呈する希少疾患群の遺伝要因と分子病態の解明」の成果を取りまとめたものです。

# 目 次

## I. 委託業務成果報告（総括）

- 難治性てんかんを呈する希少疾患群の遺伝要因と  
分子病態の解明に関する研究 ..... 1  
加藤 光広  
(資料) 成果報告会ポスター発表

## II. 委託業務成果報告（業務項目）

1. てんかん性脳症の遺伝要因の解明に関する研究 ..... 9  
才津 浩智
2. 遺伝子変異に基づいた病態解明に関する研究 ..... 12  
福田 敦夫
3. てんかん性脳症・皮質異形成の病理解析に関する研究 ..... 15  
柿田 明美
4. Aicardi症候群・Coffin-Siris症候群の  
遺伝要因の解明に関する研究 ..... 17  
三宅 紀子
5. 限局性皮質異形成の臨床的特徴に関する研究 ..... 21  
遠山 潤
6. 難治性てんかンをきたす皮質形成異常症の  
遺伝的要因の解明 ..... 24  
中島 光子
7. てんかん性脳症と巨脳症関連疾患の  
遺伝要因と臨床的特徴に関する研究 ..... 26  
中村 和幸

## III. 学会等発表実績 ..... 29

## IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 51

## I. 委託業務成果報告（総括）

## 難治性てんかんを呈する希少疾患群の遺伝要因と分子病態の解明に関する研究

業務主任者 加藤 光広 山形大学医学部附属病院 講師（病院教授）

### 研究要旨

知的障害や運動障害を併発し生活に大きな影響を与える難治性てんかんをきたす疾患群の遺伝要因と分子病態を明らかにし、新規治療法の探索を行った。297例の臨床情報とDNAが収集され、全エクソーム解析を行ったてんかん性脳症117例中、55例(47%)で遺伝素因が明らかにされ、2つの新規責任遺伝子を同定した。Coffin-Siris症候群の新たな責任遺伝子として *SOX11*を同定し、ゼブラフィッシュの脳細胞死が野生型ヒト*SOX11*に依ってレスキューされることを明らかにした。限局性皮質形成異常(FCD)の原因が、遺伝子Zのモザイク変異であることを明らかにした。希少疾患の症例集積のためには専門家のネットワーク形成が有効である。FCDの原因遺伝子Zは選択的治療薬開発のシーズとして有望である。

加藤 光広 山形大学医学部 講師（病院教授）  
才津 浩智 横浜市立大学医学部 准教授  
福田 敦夫 浜松医科大学 教授  
柿田 明美 新潟大学医学部 教授  
三宅 紀子 横浜市立大学医学部 准教授  
遠山 潤 国立病院機構西新潟中央病院 部長  
中村 和幸 山形大学医学部 医員  
中島 光子 横浜市立大学医学部 助教

のためには症例集積が欠かせない。対象疾患の全国主要診療施設における小児神経専門医を研究協力者として、日本小児神経学会共同研究支援委員会の支援を得て、今年度200例を目標にDNA検体を集積する。具体的には既に約1000検体の収集実績がある以下の方法を用いる。

a. 小児神経領域の臨床研究ネットワーク（蔵王セミナー：加藤主催で国内会員数約900名）の協力  
b. 限局性皮質異形成は新潟大（柿田）に、視床下部過誤腫は西新潟中央病院（遠山）にてんかん外科病理標本と症例が全国から多数集積。  
c. イスラエルを中心に世界中からてんかん性脳症の解析依頼。

### ②全エクソーム解析による遺伝子変異の同定

横浜市大 松本教授（遺伝子拠点研究班）と連携して全エクソーム解析を行い、遺伝子診断および新規責任遺伝子の同定を行う。対象疾患の多くは孤発性であり、トリオ解析及び腫瘍—血液検体解析による網羅的な生殖細胞／体細胞de novo変異の検出によって、新規責任遺伝子を同定する可能性は極めて高い。Aicardi症候群は全ゲノム解析での検討も行う。更に正常575例と患者群での変異を比較し、患者で稀な変異が有意に集積している遺伝子も網羅的に抽出し、遺伝要因を網羅的に検出する。

### ③遺伝子変異に基づいた病態解明

既にてんかん性脳症の3つの新規責任遺伝子を同定し、マウス初代培養神経細胞あるいはノックアウトマウスを用いた電気生理学的・病理組織学的な解析を開始しており、さらに継続発展させて

### A. 研究目的

難治性てんかんは知的障害や運動障害を併発し患者と家族の生活に大きな影響を与える。本研究は、難治性疾患克服研究事業の7研究班（大田原症候群などの年齢依存性てんかん性脳症、Landau-Kleffner症候群、脳形成障害、孔脳症、Aicardi症候群、Coffin-Siris症候群、傍シルビウス裂症候群）を引き継ぎ、更に3疾患（限局性皮質異形成、視床下部過誤腫、巨脳症関連症候群）を加えて、難治性てんかんをきたす疾患群の遺伝要因と分子病態を解明し新規治療法の探索を行うとともに、遺伝子変異と効果的な既存治療薬の関連性を調査し、難治性てんかんの個別化医療の実現をめざす。

### B. 研究方法

#### ①全国および世界規模での検体収集

対象はいずれも希少疾患であり、効率的な解析

病態を解明する。患者で同定された遺伝子変異を網羅的に解析する細胞モデルを確立するために、当該遺伝子のKnock down細胞と変異体の一過性発現解析系を構築する。

#### ④変異—臨床病型データベースの構築と診療ガイドラインの開発

これまで遺伝子変異を同定した多数の難治性てんかん患者において遺伝子型と臨床病型の関連性について検討する。本研究では、遺伝子変異陽性例と変異陰性例間で治療効果など臨床情報を比較し、変異陽性例に特徴的な臨床所見や効果的な薬剤を抽出する。これは本研究班でのみ可能な研究であり、得られた知見については診療ガイドラインとして公表するとともに、臨床病型・遺伝子変異情報を統合しデータベース化する。

#### ⑤対象疾患と研究成果の情報提供

対象疾患は患者数が少なくピアカウンセリングが困難である。患者会の設立と支援に携わってきた経験（加藤）を活かし、シンポジウムや患者と研究者の集まり、WEBを介した情報提供を行う。

（倫理面への配慮）

本研究は関連する日本小児神経学会等と協力して進める。また患者会と連携して研究成果の情報公開・啓発を推進することで、難治性てんかん患者に対する医療支援体制の充実が期待される。先行研究で倫理委員会の承認を得ており、利益相反に関しても十分配慮する。

### C. 研究結果

#### ①全国および世界規模での検体収集

7か月間で、目標を上回る297例（てんかん性脳症182例、孔脳症35例、限局性皮質異形成24症例（腫瘍—血液ペア）、視床下部過誤腫29症例、巨脳症—毛細血管奇形症4症例、Coffin-Siris症候群23例）のDNAと臨床情報が集積された。その多くは両親の検体がそろったトリオ検体であり、全エクソーム解析による原因遺伝子の同定に寄与する。

#### ②全エクソーム解析による遺伝子変異の同定

既知責任遺伝子の分子診断と新規責任遺伝子の同定を目標とし、てんかん性脳症117例で全エクソーム解析が終了し、55例（47%）で分子診断が可能であった。てんかん性脳症の既知遺伝子である*SCN1A*, *CDKL5*, *KCNQ2*, *KCNT1*, *SCN2A*, *SCN8A*, 等の他に、2つの新規責任遺伝子 X, Y を同定した。新規責任遺伝子の同定では、*SOX11* が Coffin-Siris 症候群の新たな責任遺伝子であることを報告した(Nat Commun 2014)。また、これまで原因がまったく不明であった限局性皮質異形成(Focal Cortical Dysplasia; FCD)の脳病理組織を用いて FCDIIB 型において遺伝子 Z の体細胞変異を同定し、遺伝子 Z のモザイク変異が FCDIIB 型の原因であることを明らかにした(論文

投稿中)。

#### ③遺伝子変異に基づいた病態解明

*sox11a/b* をノックダウンしたゼブラフィッシュは脳細胞死をきたし、野生型のヒト *SOX11* ではレスキューされるが、変異体ではレスキューされないことを明らかにした。また、FCDIIB で同定した遺伝子 Z の変異を、培養細胞と子宮内エレクトロポレーションでマウス胎仔にそれぞれ導入し、活性変化と *in vivo* での形態変化を観察中である。

#### ④変異—臨床病型データベースの構築と診療ガイドラインの開発

てんかん性脳症で同定した8遺伝子 (*QARS*, *BRAT1*, *TBLIXR1*, *PNKP*, *SCN8A*, *PIGT*, *PIGA*, *EEF1A2*) の変異症例の臨床像に関する論文報告を行った。また、不随意運動を伴う乳児てんかん性脳症症例11例中9例で遺伝子変異を同定し、臨床症状との関連性を明らかにし、*SPTAN1* 変異を持つてんかん症例の臨床症状と遺伝子型を明らかにした。

### D. 考察

本研究の対象疾患はいずれも非常にまれであり、国内の患者数に関する先行研究の全国疫学調査によれば大田原症候群は30例(回収率21.2%)、Aicardi 症候群は60例(回収率66.6%)の存在が確認されるのみであるにも関わらず、遺伝子解析のためのDNAを主体とする生体試料と臨床情報が順調に集積され、世界に比肩するリサーチリソースが形成されている。その理由として、イスラエルを中心とする海外からの依頼とともに、国内の小児神経科医の強い協力が挙げられる。その中心は、20年前から行なっている全国の小児神経科医の有志が診断不明例 *undiagnosed diseases* を持ち寄ってそれぞれの専門家が意見を出し合いながら診断を行う活動（小児神経症例検討会（蔵王セミナー））である。現在はIT技術（メーリングリスト、ホームページ、等）の活用によってさらに幅広いネットワークを形成し、日本小児神経学会会員約3,700名に対し、本メーリングリストには900名超の小児神経を専門とする医師が登録されており、研究内容およびその成果が比較的容易に現場の医師に周知されやすい環境がある。超希少疾患において研究の成否の鍵を握るのは症例情報の収集と検体の集積であり、米国においてはNIHが7年間で100億円を越える資金を投じて診断不明例の診断拠点ネットワーク *undiagnosed diseases network* を構成するプロジェクトが2014年7月から開始された。難治性てんかんをきたす小児神経疾患には診断不明例が多く、小児神経症例検討会（蔵王セミナー）は診断不明例の診断と希少疾患収集に圧倒的な費用対効果を示す貴重な存在である。機動性も高く、今後も希少疾患症例収集のモデルケースになると考えられる。

難治性てんかんの中で比較的症例数が多いてんかん性脳症においては、全エクソーム解析によって約半数で原因遺伝子が同定され、てんかん性脳症の原因における遺伝素因の重要性が明らかになった。原因遺伝子は多岐にわたっており、全エクソーム解析はてんかん性脳症の遺伝素因の解明に有効な手段である。その一方、既知遺伝子の同定が多いため変異スクリーニングとしては候補遺伝子に絞ったターゲットキャプチャーを用いて複数検体を処理することで解析費用を下げることが必要と考えられる。欧米では既に診療として次世代シーケンサーが臨床応用されているが、国内においてははまだ保険適用がなされておらず研究として遺伝子解析を行わざるを得ないのが実状である。今後、遺伝子診断に基づく治療法を広めるに際し、効率的な変異スクリーニング法の開発と保険適用が大きな課題である。

今回初めて明らかにした FCD の原因遺伝子 Z は信号伝達経路を構成し、既存の治療薬が選択的に有効と考えられる。すでに培養細胞およびマウスを用いて病態解析を行っており、今後遺伝子 Z に対する選択的治療薬の有効性を検証する予定である。有効性が検証されれば、これまでは外科手術しか方法がなかった FCD に対して、新たに内科的治療法の選択肢が増えることになり、外科手術不能例や外科手術無効例に対しても恩恵が与えられることになる。

原因遺伝子が同定された疾患については逐次遺伝型と表現型の関連性について報告した。担当責任者の遠山らが2008年に新たな疾患単位として報告し、同じく担当責任者の才津らが2010年に原因遺伝子を報告した *SPTAN1* 変異による髄鞘形成不全を伴う早期発症 West 症候群については、遠山の発表がシアトルで開催された2014年の米国てんかん学会においてプレスリリースの対象に選ばれ、臨床から分子遺伝学まで網羅的にまとめた英文総説が刊行予定であり、日本発の難治性てんかんにおける疾患単位と遺伝要因解明の情報発信として特筆される。

## E. 結論

希少疾患の症例集積のためには専門家のネットワーク形成が有効である。てんかん性脳症の半数は多岐の遺伝素因が占め、2つの新規遺伝子の同定がされ、全エクソーム解析が有効である。限局性皮質異形成で明らかにした原因遺伝子 Z は選択的治療薬開発のシーズとして有望である。

## F. 健康危険情報 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* doi:10.1038/jhg.2014.71

2) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Shimizu A, Torii C, Kanemura Y, Kosaki K: Targeted next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. *Clin Genet* doi:10.1111/cge.12492.

3) Okamoto N, Miya F, Tsunoda T, Yanagihara K, Kato M, Saitoh S, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K: *KIF1A* mutation in a patient with progressive neurodegeneration. *J Hum Genet* 59:639-41,2014.

4) Nakashima M, Miyajima M, Sugano H, Iimura Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Saitsu H, Arai H, Matsumoto N: The somatic *GNAQ* mutation c.548G>A (p.R183Q) is consistently found in Sturge-Weber syndrome. *J Hum Genet* 59:691-3,2014.

5) 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.

6) 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.

7) 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.

8) 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.
- 9) 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.
  - 10) 加藤光広: 外性器異常を伴う X 連鎖性滑脳症. In, *神経症候群 (第2版) (IV) —その他の神経疾患を含めて—*. 大阪: 日本臨牀社:111-4,2014.
  - 11) 加藤光広: Miller-Dieker 症候群. In, *神経症候群 (第2版) (IV) —その他の神経疾患を含めて—*. 大阪: 日本臨牀社:108-10,2014.
  - 12) 加藤光広: 古典型滑脳症 (無脳回・厚脳回・皮質下帯状異所性灰白質). In, *神経症候群 (第2版) (IV) —その他の神経疾患を含めて—*. 大阪: 日本臨牀社:104-7,2014.
  - 13) 加藤光広: 大田原症候群 (サブレッション・バーストを伴う早期乳児てんかん性脳症) と早期ミオクロニー脳症. *小児科* 55:1145-53,2014.
  - 14) 加藤光広: 難治性てんかんの分子遺伝学. *脳と発達* 46:191-4,2014.
  - 15) 加藤光広: その他のてんかん発作を呈する神経疾患の遺伝子異常. In: 日本てんかん学会 ed, *てんかん専門医ガイドブック*. 東京: 診断と治療社:18-20,2014.
  - 16) 加藤光広: 滑脳症. *神経症候群 (第2版) (VI) —その他の神経疾患を含めて—*. 大阪: 日本臨牀社:149-52,2014.
  - 17) 加藤光広: Aicardi 症候群. *神経症候群 (第2版) (VI) —その他の神経疾患を含めて—*. 大阪: 日本臨牀社:145-8,2014.
  - 18) 中村和幸, 加藤光広: 年齢依存性てんかん性脳症. *こどもケア* 9:7-11,2014.
2. 学会発表
- 1) Kato M: Interneuronopathies and genetics of the epileptic encephalopathies. 10th Asian & Oceanian Epilepsy Congress: Singapore, August 7-10, 2014 (invited lecture)
  - 2) Nobuhiko Okamoto, Fuyuki Miya, Tatsuhiko Tsunoda, Mitsuhiro Kato, Shinji Saitoh, Mami Yamasaki, Yonehiro Kanemura, Kenjiro Kosaki: Next-generation sequencing in the diagnosis of neurodevelopmental disorders. European Society of Human Genetics 2014: Milan, Italy May 31 - June 3, 2014
  - 3) Jun Tohyama, Noriyuki Akasaka, Yu Kobayashi, Shinichi Magara, Hideshi Kawashima, Mitsuhiro Kato, Naomichi Matsumoto, Hiroto Saito: 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
  - 4) Naoko Ishihara, Setsuri Yokoi, Hiroyuki Yamamoto, Jun Natsume, Makiko Tsutsumi, Tamae Ohye, Mitsuhiro Kato, Shinji Saito, Hiroki Kurahashi: Two cases of lissencephaly with marked hydrocephalus caused by *TUBA1A* mutation. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics: San Diego, CA October 18-22, 2014
  - 5) Yutaka Negishi, Ayako Hattori, Ikumi Hori, Naoki Ando, Fuyuki Miya, Tatsuhiko Tsunoda, Nobuhiko Okamoto, Mitsuhiro Kato, Mami Yamasaki, Yonehiro Kanemura, Kenjiro Kosaki, Shinji Saitoh: Truncating mutation of *NF1A* causes a brain malformation and urinary tract defect. 64th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics: San Diego, CA October 18-22, 2014
  - 6) 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 *STXBP1* encephalopathy: Clinical delineation of 32 Japanese patients including 14 novel patients. American Epilepsy Society 2014, 68th Annual Meeting: Seattle, USA December 5-9, 2014
  - 7) J. Tohyama, M. Nakashima, Z. Renner, Primec, C. Gaik-Siew, S. Nabatame, M. Kato, N. Matsumoto, H. Saitsu: Distinct Phenotypes And Genotypes Of SPTAN1 Encephalopathy. American Epilepsy Society 2014, 68th Annual Meeting:

Seattle, USA December 5-9, 2014

- 8) 加藤光広: 乳幼児てんかん性脳症の例の遺伝子診断—臨床症状から解析法の選択について. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日 (招待講演)
- 9) 加藤光広: West 症候群および関連症候群. 日本てんかん学会第 9 回てんかん学研修セミナー: 東京 2014 年 10 月 4 日 (招待講演)
- 10) 加藤光広: 脳形成異常の分子病態と臨床. 第 56 回日本小児神経学会学術集会 教育講演: 浜松 2014 年 5 月 29-31 日 (招待講演)
- 11) 加藤光広: 次世代シーケンス技術を用いた小児神経稀少難病研究の現状と今後. 第 117 回日本小児科学会学術集会: 名古屋 2014 年 4 月 11-13 日 (招待講演)
- 12) 加藤光広: 新しい疾患概念「介在ニューロン病」について. 第 21 回日本神経学会東北地方会 生涯教育講演会: 仙台 2014 年 3 月 8 日 (招待講演)
- 13) 加藤光広: てんかんと皮質形成異常の診療に必要な最近の遺伝知識. 第 55 回日本小児神経学会近畿地方会 教育講演: 大阪 2014 年 3 月 1 日 (招待講演)
- 14) 加藤光広: 分子病態から探る稀少難治てんかんの臨床像. 第 30 回佐賀てんかん懇話会: 佐賀 2014 年 11 月 25 日 (招待講演)
- 15) 加藤光広: 希少難病の原因遺伝子探索と臨床へのフィードバック—てんかん性脳症を中心に—. 東京医科歯科大学小児科マンデーセミナー: 東京 2014 年 9 月 29 日 (招待講演)
- 16) 加藤光広: 分子病態から探るてんかん源性—てんかんと遺伝の正しい理解のために—. 第 24 回福岡・久留米てんかん研究会: 福岡 2014 年 6 月 6 日 (招待講演)
- 17) 中島光子、宮嶋雅一、新井一、加藤光広、松本直通: **Sturge-Weber syndrome** における **GNAQ** 体細胞変異の同定. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 18) 大場ちひろ、加藤光広、高橋悟、寺嶋宙、久保田雅也、川脇壽、松藤まゆみ、小島泰子、舘野昭彦、中島光子、西山精視、鶴崎美德、三宅紀子、田中章景、才津浩智、松本直通: **SCN8A** の *de novo* 変異が原因となる乳児期早期発症の難治性てんかんについての検討. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 19) 露崎悠、佐藤睦美、渡辺肇子、安西理恵、市川和志、井合瑞江、山下純正、後藤知英、黒澤健司、中村和幸、加藤光広、才津浩智、松本直通: **PIK3R2** 遺伝子変異を認めた **Megalencephaly-polymicrogyria-polydactyly-hydrocephalus (MPPH)** 症候群の軽症例. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 20) 原田敦子、宮冬樹、金村米博、山中巧、吉川大和、宇都宮英綱、桒中正博、岡本伸彦、角田達彦、加藤光広、齋藤伸治、小崎健次郎、山崎麻美: 難治性シヤント機能不全を呈した **Dandy-Walker malformation** における **PLG** 遺伝子変異. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 21) 根岸豊、堀いくみ、服部文子、安藤直樹、齋藤伸治、水野健太郎、宮冬樹、角田達彦、岡本伸彦、加藤光広、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎: **NF1A** 遺伝子変異は **1p32-p31** 欠失症候群の中核症状を規定する. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 22) 岡本伸彦、宮冬樹、角田達彦、加藤光広、齋藤伸治、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎: 進行性小脳萎縮を伴う新規神経変性症における **KIF1A** 変異. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 23) 宮冬樹、加藤光広、塩濱直、岡本伸彦、齋藤伸治、山崎麻美、阿部哲雄、森園隆、Keith A. Boroevich、秋山真太郎、久保充明、小崎健次郎、金村米博、角田達彦: 複合ターゲットエンリッチメント法による **exome** 解析と疾患原因変異の同定. 日本人類遺伝学会第 59 回大会・日本遺伝子診療学会第 21 回大会合同大会: 東京 2014 年 11 月 20-22 日
- 24) 岡本奈那、岡本伸彦、宮冬樹、角田達彦、加藤光広、齋藤伸治、山崎麻美、金村米博、小崎健次郎: 神経疾患を標的にした次世代シーケンサー解析で診断した **Baraitser-Winter** 症候群の 1 例. 第 31 回日本障害者歯科学会総会: 仙台 2014 年 11 月 14-16 日
- 25) 鹿島田彩子、高橋孝治、石渡久子、馬場信平、加藤光広、菅原祐之: 難治てんかんとしてフォローされ 17 歳で全エクソーム解析により小児交互性片麻痺と診断された 1 例. 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会: 東京 2014 年 10 月 2-3 日
- 26) 石渡久子、鹿島田彩子、高橋孝治、黒神経彦、下平雅之、佐久間啓、才津浩智、加藤光広、菅原祐之: てんかんで発症し、脳症様エピソード

- 一ドを経て著明な退行を示した SSADH 欠損症の一例. 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会: 東京 2014 年 10 月 2-3 日
- 27) 西倉紀子、松井潤、吉岡誠一郎、高野知行、竹内義博、加藤光広: *CDKL5* 遺伝子異常を伴い遅発性の悪化を示したてんかん性脳症の女兒例. 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会: 東京 2014 年 10 月 2-3 日
- 28) 中村 和幸、小寺 啓文、加藤 光広、小坂 仁、前垣 義弘、萩野谷 和裕、岡本 伸彦、井合 瑞江、才津 浩智、松本 直通: A Newly identified congenital disorder of glycosylation caused by de novo mutations in *SLC35A2* encoding a UDP-galactose transporter is associated with early-onset epileptic encephalopathy. 第 48 回日本てんかん学会年次学術集会: 東京 2014 年 10 月 2-3 日
- 29) Kazuyuki Nakamura, Mitsuhiro Kato, Hideki Hoshino, Hiroshi Terashima, Hitoshi Osaka, Shinichi Nakamura, Jun Tohyama, Takashi Shiihara, Masaya Kubota, Kiyoshi Hayasaka, Hiroto Saito: De novo mutations in *GNAO1* cause epileptic encephalopathy and involuntary movement. (English session) 第 56 回日本小児神経学会総会: 浜松 2013 年 5 月 29 日-5 月 31 日
- 30) Kazuhiro Muramatsu, Satoko Kumada, Kenji Sugai, Emi Kasai-Yoshida, Noriko Sawaura, Hiroya Nishida, Ai Hoshino, Fukiko Ryujin, Seiichirou Yoshioka, Mitsuhiro Kato, Hirokazu Arakawa, Hiroto Saito, Naomichi Matsumoto: *WDR45* mutation causes static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood (SENDA). 第 56 回日本小児神経学会総会: 浜松 2014 年 5 月 29 日-5 月 31 日
- 31) 竹下美佳、山中岳、森地振一郎、石田悠、小穴信吾、宮島祐、河島尚志、才津浩智、加藤光広: *SCN1A* の変異を認めたてんかん性脳症の 1 男児例. 第 56 回日本小児神経学会総会: 浜松 2014 年 5 月 29 日-5 月 31 日
- 32) 井上貴仁、石井敦士、鶴澤礼実、中村紀子、金海武志、才津浩智、加藤光広、廣瀬伸一、小川厚: *KCNT1* 遺伝子の新生変異が同定された West 症候群の女兒例. 第 56 回日本小児神経学会総会: 浜松 2014 年 5 月 29 日-5 月 31 日
- 33) 高橋孝治、保立麻美子、馬場信平、中島啓介、鹿島田彩子、菅原祐之、加藤光広、才津浩智: West 症候群を発症した Potocki-Shaffer 症候群の一例. 第 56 回日本小児神経学会総会: 浜松 2014 年 5 月 29 日-5 月 31 日
- 34) 渡辺祐紀、宮尾成明、平岩明子、板澤寿子、宮一志、吉田丈俊、加藤光広、村上良子、足立雄一: *PIGA* 遺伝子変異による多発小奇形、難治性てんかんをきたした男児例. 第 117 回日本小児科学会学術集会: 名古屋 2014 年 4 月 11-13 日
- 35) 加納優治、刈屋桂、栗林良多、坪井弥生、渡部功之、鈴木宏、今高城治、石井徹、加藤光広、有阪治: 単純脳回型小頭症の姉弟例. 第 117 回日本小児科学会学術集会: 名古屋 2014 年 4 月 11-13 日
- 36) 石渡久子、馬場信平、森山剣光、中島啓介、鹿島田彩子、加藤光広、中島光子、菅原祐之、岩川善英: *SCN2A* 変異を有し、特異な経過を辿ったてんかんの一例. 第 61 回日本小児神経学会関東地方会学術集会: つくば 2014 年 9 月 20 日
- 37) 原田敦子、山中巧、加藤光広、宇都宮英綱、山崎麻美: 突然死を来した巨脳症の一例. 第 55 回日本小児神経学会近畿地方会: 大阪 2014 年 3 月 1 日
- 38) 清和ちづる、白幡恵美、伊東愛子、中村和幸、高橋信也、加藤光広: *CDKL5* 変異を認めた早期発症てんかん性脳症の 1 例. 第 19 回山形小児神経研究会: 山形 2014 年 9 月 19 日
- 39) 篠崎敏行、石垣隆介、田邊さおり、木村敏之、加藤光広: 睡眠障害 (中途覚醒) を伴うてんかん性脳症の 1 例. 第 19 回山形小児神経研究会: 山形 2014 年 9 月 19 日
- 40) 村上良子、井上徳光、加藤光広、木下タロウ: 先天性 *PIGA* 欠損症について. 第 51 回補体シンポジウム: 神戸 2014 年 8 月 22 日-23 日
- 41) 高山留美子、曾田久美子、安保亘、加藤光広: *PIGA* 遺伝子変異による遺伝性 GPI アンカー欠損症の 1 例. 第 20 回漆山てんかんセミナー: 静岡 2014 年 6 月 14 日

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

平成 26 年 9 月 12 日 特許第 5608863 号

「新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法」

発明者 松本直通、才津 浩智

##### 2. 実用新案登録

なし

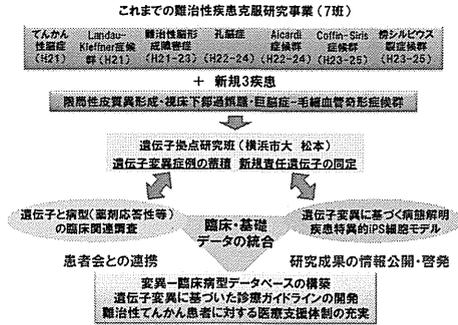
##### 3. その他

平成26年度厚生労働科学研究委託業務(難治性疾患実用化研究事業)(H26-委託(難)-一般-052)  
**難治性てんかんを呈する稀少疾患群の遺伝要因と分子病態の解明に関する研究**

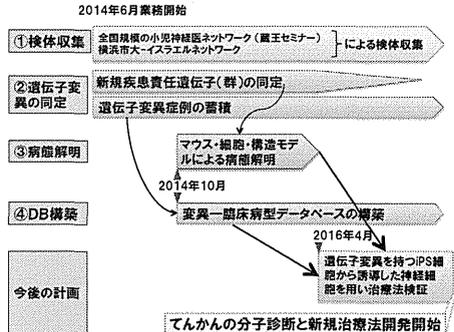
研究代表者 山形大学医学部附属病院小児科 加藤光広  
 研究分担者 横浜市立大学遺伝学 才津 浩智、三宅紀子、中島光子  
 浜松医科大学神経生理学 福田敦夫

研究分担者 新潟大学脳研究所神経病理学 柿田明美  
 国立病院機構西新潟中央病院てんかんセンター 遠山潤  
 山形大学医学部附属病院小児科 中村和幸

**対象: 難治性てんかんを呈する稀少疾患群**



**業務計画(マイルストーン)**

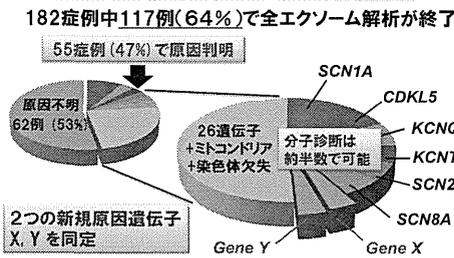


**成果 ①検体収集**

目標 200例/年	(2014年4月~10月)
てんかん性脳症	182症例
孔脳症	35症例
限局性皮質異形成	24症例(腫瘍-血液 24ペア)
視床下部過誤腫	29症例(腫瘍-血液 15ペア)
巨脳症-毛細血管奇形症	4症例
Coffin-Siris症候群	23症例

目標を大きく上回る297例が7か月間で集積

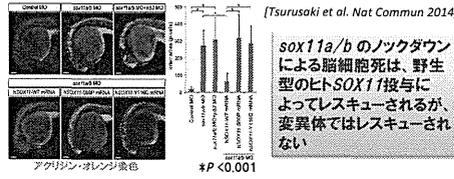
**成果 ②てんかん性脳症の遺伝子解析**



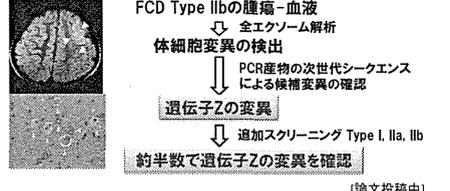
**成果 ②Coffin-Siris症候群の新規責任遺伝子同定**



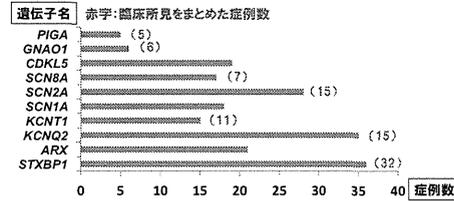
**成果 ③sox11a/bノックダウンセラフィッシュの脳細胞死**



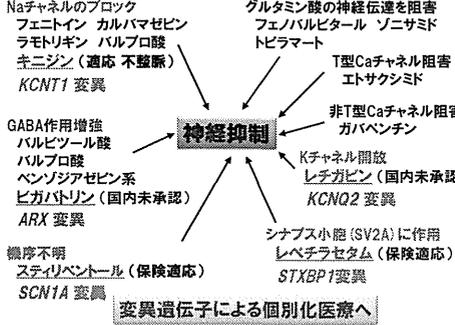
**成果 ②限局性皮質異形成(FCD)の原因遺伝子同定**



**成果 ④変異-臨床病型データベース構築**



**医薬品開発の展望: 抗てんかん薬の作用機序と個別化医療**



変異症例および臨床所見のまとめは順調に進んでいる

- まとめ**
- ①検体は目標を越える297検体が7か月間で収集された
  - ②対象疾患の新規原因遺伝子をすでに4個同定した
  - ③病態解明は細胞レベルで進んでいる
  - ④てんかん性脳症の約半数に既知の原因遺伝子変異を同定し、遺伝型と臨床情報を対比したデータベースを構築中である

**謝辞**  
 研究に同意して協力いただきました患者様と御家族、主治医の皆様へ深く感謝申し上げます。

## Ⅱ. 委託業務成果報告（業務項目）

## てんかん性脳症の遺伝要因の解明

担当責任者 才津 浩智 横浜市立大学 医学部 遺伝学

### 研究要旨

てんかん性脳症患者 182 症例が業務期間中に集積しており、うち 117 症例に対して全エクソーム解析を施行した。117 症例中 55 症例（47%）で原因遺伝子変異の同定が可能であり、変異—臨床病型データベースの構築に向けた変異症例の蓄積は順調に進んでいる。新規の責任遺伝子の同定にも成功している。また、これまでに蓄積した変異症例の中から、*QARS*, *BRAT1*, *TBL1XR1*, *PNKP*, *SCN8A*, *PIGT*, *PIGA*, *EEF1A2* 変異症例について、臨床像に関する論文報告を行った。

### A. 研究目的

てんかん性脳症は、多くが乳幼児～小児期に発症し、精神運動発達遅滞を伴う難治性の疾患群である。神経学的予後の改善のためには、早期に適切な治療を行う必要がある。本研究は、全エクソーム解析による網羅的な遺伝子解析を行うことで、てんかん性脳症の遺伝要因を解明し、変異—臨床病型を明らかにすることを目的とした。

### B. 研究方法

#### 1) 症例の集積

山形大学(業務主任者 加藤)を始めとする全国の施設、およびイスラエル・マレーシアの海外から、広く症例を集積した。

#### 2) 全エクソーム解析

集積した症例に対して、SureSelect All Exon V5 Kit (アジレントテクノロジーズ社)を用いてエクソンキャプチャを施行し、HiSeq 2000/2500を用いてシーケンスを行った。

#### 3) 変異—臨床病型の検討

責任遺伝子の遺伝子型とてんかん性脳症の臨

床所見との詳細な比較検討を行い、特定の遺伝子変異による臨床病型の確立を試みた。

#### (倫理面への配慮)

本研究計画は、三省のヒトゲノム解析に関する共通指針(2001年・2004年および2005年改訂)を遵守して組織された横浜市立大学医学部倫理委員会において、本研究の申請・昇任を得、承認された研究計画を遵守し研究を遂行している。個人情報保護法に十分留意しながら研究を施行している。

### C. 研究結果

#### 1) 症例の集積

てんかん性脳症患者 182 症例が業務期間中に集積した。ほとんどの症例でご両親検体も集積しており、迅速な変異の確認が可能であった。

#### 2) 全エクソーム解析

117 症例に対して全エクソーム解析を施行した。117 症例中 55 症例（47%）で原因遺伝子変異の同定が可能であった。見つかった遺伝子異常は、34 遺伝子およびミトコンドリアゲノム変異、染色体欠失の多岐にわたり、網羅的遺伝子解析

系の有用性が示唆される。34 遺伝子の中には 2 つの新規責任遺伝子も含まれており、てんかん性脳症の遺伝要因の解明は順調に進んでいる。主要な責任遺伝子においては、*STXBPI* 36 例、*ARX* 21 例、*KCNQ2* 35 例、*KCNT1* 15 例、*SCN1A* 18 例、*SCN2A* 28 例、*SCN8A* 17 例、*CDKL5* 19 例、*GNAO1* 6 例、*PIGA* 5 例が集積しており、変異—臨床病型データベースの構築に向けた変異症例の蓄積は順調に進んでいる。

### 3) 変異—臨床病型の検討

これまでに蓄積した変異症例の中から、*QARS* (Kodera et al, J Hum Genet. 2015)、*BRAT1* (Saito et al, J Hum Genet. 2014)、*TBL1XR1* (Saito et al, J Hum Genet. 2014)、*PNKP* (Nakashima et al, J Hum Genet. 2014)、*SCN8A* (Ohba et al, Epilepsia. 2014)、*PIGT* (Nakashima et al, Neurogenetics. 2014)、*PIGA* (Kato et al, Neurology. 2014)、*EEF1A2* (Nakajima et al, Clin Genet. 2014) 変異症例について、臨床像に関する論文報告を行った。これらの報告により、各遺伝子の変異がもたらす臨床所見が明らかとなった。これらは、診断のみならず、治療薬の選択においても大きな助けになる研究成果である。

### D. 考察

近年の次世代シーケンサーを利用した網羅的遺伝子解析によって、てんかん性脳症の遺伝要因が急速に解明されてきている。実際に本研究においても、47%の患者において、全エクソームによる遺伝子診断が可能であった。見つかった遺伝子異常は、34 遺伝子およびミトコンドリアゲノム変異、染色体欠失の多岐にわたるが、2 万の遺伝子を対象とする全エクソームに代わって 100 遺伝子程度を対象とするターゲットリシーケンス解析が費用対効果という点で有用である可能性が示唆された。

海外においては、遺伝子変異同定による個別化医療の試みが既に始まっており、てんかん性脳症の遺伝子解析は、今後のますますその重要性を増すと考えられる。

### E. 結論

研究初年度 (9 カ月間) で、症例の蓄積数、遺伝子変異診断数、ともに十分な成果が得られている。新規責任遺伝子の同定や変異—臨床病型の検討の論文報告も多数あり、本研究は順調に進んでいる。

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1) Kodera H, Osaka H, Iai M, Aida N, Yamashita A, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. Mutations in the glutaminyl-tRNA synthetase gene cause early-onset epileptic encephalopathy. J Hum Genet. 2015 60(2):97-101.

2) Saito H, Yamashita S, Tanaka Y, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Matsumoto N. Compound heterozygous BRAT1 mutations cause familial Ohtahara syndrome with hypertonia and microcephaly. J Hum Genet. 2014 59(12):687-90.

3) Saito 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. 2014 59(10):581-3.

4) Nakashima M, Kashii H, Murakami Y, Kato M, Tsurusaki Y, Miyake N, Kubota M, Kinoshita T, Saito H, Matsumoto N. Novel compound heterozygous *PIGT* mutations caused multiple congenital anomalies-hypotonia-seizures syndrome 3. Neurogenetics. 2014 15(3):193-200.

5) Nakashima M, Takano K, Osaka H, Aida N, Tsurusaki Y, Miyake N, Saito H, Matsumoto N. Causative novel *PNKP* mutations and concomitant *PCDH15* mutations in a patient with microcephaly

with early-onset seizures and developmental delay syndrome and hearing loss. *J Hum Genet.* 2014 59(8):471-4.

6) 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, Strausberg R, Marom D, Leshinsky-Silver E, Nakashima M, Nishiyama K, Tsurusaki Y, Miyake N, Tanaka F, Matsumoto N, Saitu H. Early onset epileptic encephalopathy caused by de novo *SCN8A* mutations. *Epilepsia.* 2014 55(7):994-1000.

7) Kato M, Saitu 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.* 2014 6;82(18):1587-96.

8) Nakajima J, Okamoto N, Tohyama J, Kato M, Arai H, Funahashi O, Tsurusaki Y,

Nakashima M, Kawashima H, Saitu H, Matsumoto N, Miyake N. De novo *EEF1A2* mutations in patients with characteristic facial features, intellectual disability, autistic behaviors and epilepsy. *Clin Genet.* 2014

## 2. 学会発表

1) 才津浩智. シンポジウム「エクソーム解析による包括的遺伝子診断 (乳幼児てんかん性脳症の遺伝子診断)」 2014年11月20日、タワーホール船堀、東京

2) 才津浩智. 招待講演「次世代シーケンサーを用いた包括的遺伝子診断」2014アジレントゲノミックスフォーラム 2014年6月4日、国際ファッションセンター、東京

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1) 特許取得

平成26年9月12日

特許第5608863号

「新生児期～乳児期発症の難治性てんかんの検出方法」

発明者 松本直通、才津 浩智

## 遺伝子変異に基づいた病態解明

担当責任者 福田 敦夫 浜松医科大学 医学部 教授

### 研究要旨

てんかん性脳症の責任遺伝子として同定された遺伝子の変異体を発現系細胞及び神経細胞に発現させ機能解析を行う。パッチクランプ法を用いて、発現系細胞では主にコードする蛋白の電気生理学的特性を解析して、遺伝子変異の影響を明らかにする。神経細胞では、受動的・活動的細胞膜特性に加えて、培養系あるいはin vivo発現系を用いて興奮性・抑制性シナプス後電流を解析し、神経回路の形成やその機能における遺伝子変異の影響を解析する。以上から、変異遺伝子がコードする変異蛋白が、脳波所見や臨床症状を説明しうるか検討し、電気生理学的解析による病態解明を目指す。

### A. 研究目的

脳波所見でのdiffuse spike and waveを特徴とする、全般性けいれんを示す症例で見えられた遅延整流性Kチャンネルの2種の遺伝子異常をマウスの培養大脳皮質神経細胞に発現させ、パッチクランプ法を用いて、変異蛋白が神経細胞の受動的細胞膜特性や活動電位の波形や発火特性などの活動的細胞膜特性に加に与える影響を解析し、神経回路や脳機能への影響を考察・説明する。

### B. 研究方法

細胞は胎生16日のICRマウスの大脳皮質から採取し、採取直後にトランスフェクション試薬を用いてベクターを導入後、培養9-14日の間に実験を行った。遅延整流性Kチャンネルの各mutant（変異①、変異②）及びcontrol（empty [nucEGFPのみ]）、野生型の4種類のデータは2回の異なる日に採取・遺伝子導入した細胞群から得られたものを統合した。

電気生理学的計測は、ホールセルパッチクランプ法を適用し、カレントクランプ下に静止膜電位、電流注入により誘起される膜電位の変化、活動電位の発生過程、後過分極過程、持続的電流注入に対する活動電位の連続発火パターン等がどのように影響を受けるかを解析した。

（倫理面への配慮）

実験動物として、マウスを使用した。動物愛護上の観点から、すべての処置はペントバルビタールによる麻酔下に行い、動物に苦痛を与えないように配慮した。また、実験は必要欠くべからざる場合にのみ行い、実験に供する動物の数を必要最小限にとどめた。本実験計画については、浜松医科大学動物実験委員会に動物実験計画申請書を提

出し許可を受けた上でを行い、すべて「浜松医科大学における動物実験指針」に従ったものである。また、本実験計画における動物の取り扱い、使用法は、日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」および日本生理学会「動物実験指針」に準拠した。また、ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針をはじめとする関連法令と指針を遵守し、各研究者の所属機関の倫理審査委員会の審査を受け、施設長の承認を得て研究を遂行する。

### C. 研究結果

まず、上記4種類の遺伝子を導入した培養神経細胞の静止膜電位の比較では、変異①遺伝子導入細胞で、empty（エンドのKチャンネルのみ）より3 mV浅かったが、他の3群と有意差はなかった。活動電位の閾膜電位についても、変異①と野生型は、変異②及びemptyに比べ有意に4 mV程高かった。

閾膜電位以下の静止膜電位近傍での膜のイオン透過性は、変異①および変異②でemptyや野生型に比べ有意に上昇していた。これらの膜透過性の上昇は、チャンネル特性の変化により静止膜時にも開口する遅延整流性Kチャンネル数が増えたことによると考えられた。

閾膜電位に到達するまでの短時間（2-5 ms）の電流注入により誘発された単発の活動電位の特性では、野生型と変異①はemptyに比べて活動電位の再分極過程が遅く、その結果活動電位の半値幅が有意に広がっていた。一方、活動電位活性化過程の速さや振幅には有意差はなかった。再分極後の後過分極の到達電位が、変異①ではemptyや野生型と比して有意に脱分極側にシフトしていた。

次に、500 msの持続的な電流注入により誘起さ

れた活動電位の連発発火への影響を調べるため、各細胞で1発の活動電位を発生させるのに必要な最小電流値 (rheobase) を基準にして、その定数倍の電流を加えた際の発火数の変化について調べた。静止膜電位近傍での膜透過性が高い変異①や変異②では、予想通りrheobaseは高くなっていた。emptyや野生型ではrheobaseの2倍・3倍の電流を加えることにより発火数は増加していった。一方、変異①は、rheobaseの電流で必ず1発は発火するが、それ以上に大きな電流を加えても更なる発火は0-2発にとどまった。変異②ではrheobaseの2倍で発火数は増加するものの、電流注入中の発火の減衰が顕著で、rheobaseの3倍では発火数はむしろ減少した。連続発火中の各活動電位スパイク間の谷底の膜電位は、emptyや野生型では顕著な上昇がないのに対し、変異①では1発目の発火終了直後の膜電位が他に比して大きく上昇しており、変異②でも初発及び連続発火中に顕著なスパイク間膜電位の上昇が認められた。

続いて、各細胞で1発目の発火の上昇速度を基準にして、その連続発火中の個々のスパイクの上昇速度の変化を調べた。emptyや野生型ではスパイク間膜電位の上昇が抑えられている分、次のスパイク発生前にNavチャンネルが不活性化から脱している割合が多いのに比して、変異①や変異②ではスパイク間膜電位の顕著な上昇に伴いNavチャンネルの不活性化が解除されにくくなっていた。

#### D. 考察

結果は野生型や変異①では活動電位再分極におけるK電流の寄与がemptyに比べて小さくなっていることを示唆している。これまでの多くの報告で遅延整流性Kチャンネルの阻害や欠失により活動電位再分極速度の低下や半値幅の増加が示されているが、今回は逆に再分極が遅くなっていた。emptyでは活性化の速いKチャンネルも再分極に寄与するのに対し、野生型や変異①では相対的に遅い活性化を示すKチャンネルの寄与が大部分のため、再分極が遅くなっていると考えられた。

連続発火が安定して継続するためには、まずスパイク間膜電位が低く保たれることが重要である。すなわち、スパイク中に不活性化したNavチャンネルが、十分な過分極により数多く回復することで、再び十分な膜電位上昇がおこり、その結果多くのKチャンネル活性化による素早い再分極が誘起される。今回注目した遅延整流性Kチャンネルの変異①や変異②では、本来の機能がそれぞれ損なわれていることにより、活性化による素早い再分極が誘起されず、それぞれに特徴的な連続発火の減衰がもたらされていると考えられた。

#### E. 結論

遅延整流性Kチャンネルの2種の遺伝子異常が、

活動電位の発火パターンを顕著に変化させることから、症例の脳波で見られるdiffuse spike and waveやけいれん発作、知能や運動の発達遅延と関連する可能性が十分に考えられた。さらに因果関係を説明するためには、培養細胞や発現細胞を用いた膜電位固定法による、詳細なチャンネル機能解析も必要であると結論した。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Okabe, A., Shimizu-Okabe, C., Arata, A., Konishi, S., Fukuda, A. and Takayama, C. KCC2-mediated regulation of respiration-related rhythmic activity during postnatal development in mouse medulla oblongata. *Brain Res* 1601:31-39, 2015.
2. Qian, T., Chen, R., Nakamura, M., Furukawa, T., Kumada, T., Akita, T., Kilb, W., Luhmann, H. J., Nakahara, D., and \*Fukuda, A. Activity-dependent endogenous taurine release facilitates excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats. *Front Cell Neurosci* 8:33, 2014.
3. Chen, R., Okabe, A., Sun, H., Sharopov, S., Hanganu-Opatz, I.L., Kolbaev, S.N., Fukuda, A., Luhmann, H.J. and Kilb, W. Activation of glycine receptors modulates spontaneous epileptiform activity in the immature rat hippocampus. *J Physiol* 592:2153-2168, 2014.
4. Furukawa, T., Yamada, J., Akita, T., Matsushima, Y., Yanagawa, Y. and \*Fukuda, A. Roles of taurine-mediated tonic GABA<sub>A</sub>-receptor activation in radial migration of neurons in the developing cerebral cortex. *Front Cell Neurosci* 8:88, 2014.
5. Uchida, T., Furukawa, T., Iwata, S., Yanagawa, Y. and \*Fukuda, A. Selective loss of parvalbumin-positive GABAergic interneurons in the cerebral cortex of maternally stressed *Gad1*-heterozygous mouse offspring. *Transl Psychiatry* 4 e371, 2014.
6. Wang, T., Kumada, T., Morishima, T., Iwata, S., Kaneko, T., Yanagawa, Y., Yoshida, S. and \*Fukuda, A. Accumulation of GABAergic neurons, causing a focal ambient GABA gradient, and downregulation of *KCC2* are induced during microgyrus formation in a mouse model of polymicrogyria. *Cereb Cortex* 24:1088-1101, 2014.
7. Edamura, M., Murakami, G., Meng, H., Itakura, M., Shigemoto R., Fukuda, A. and Nakahara, D. Functional deficiency of MHC class I enhances LTP and abolishes LTD in the nucleus accumbens of mice. *PLoS ONE* 9:107099, 2014.

##### 2. 学会発表

1. Fukuda, A. Prenatal stress-induced selective

- deterioration of neurogenesis of parvalbuminpositive GABAergic neurons. シンポジウム ” Recent findings in development, function and disease of GABAergic neurons” 第 92 回日本生理学会大会, 神戸, 3/21-23(23), 2015.
2. Watanabe, M., Iwata, S., Furukawa, T., Kumada, T., Uchida, T., Hirose, S. and Fukuda, A. Functional regulation of neuronal  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter KCC2. シンポジウム ” Morphological and functional mechanisms and their dynamics in the multimodality of inhibitory neural system” 第 92 回日本生理学会大会, 神戸, 3/21-23(23), 2015.
  3. 古川智範, 福田敦夫. 母体由来タウリンが胎仔脳の形成とその特異性に与える影響. 第 41 回日本脳科学学会, 福井, 11.22-23(22), 2014.
  4. Fukuda, A. and Wang, T. Alterations in extracellular sugar chain in prenatally stressed mouse brain. SFG & JSCR 2014 Joint Annual Meeting Satellite Symposium II: “Glycans in Neuroscience”, 11/16-19(16), USA, 2014.
  5. 柿沢圭亮, 渡部美穂, 柳川右千夫, 沖隆, 福田敦夫. GAD67-GFP knockin マウスを用いた CRH ニューロン制御における GABA の役割についての検討. 第 61 回中部日本生理学会, 名古屋, 11/7-8(7), 2014.
  6. 福田敦夫. : 発達期のマルチモーダルな GABA 受容体作用から麻酔薬毒性を考察する. (発達期脳に対する麻酔薬の毒性、最新の知見—基礎から今日の臨床をどうするか—) 第 34 回日本臨牀麻酔学会, 東京, 11/1-3(2), 2014.
  7. 柿沢圭亮, 渡部美穂, 大川雄太, 大石敏弘, 山下美保, 柳川右千夫, 沖隆, 福田敦夫. GAD67-GFP ノックインマウスを用いた CRH ニューロン制御における GABA の役割についての検討. 第 41 回日本神経内分泌学会学術集会, 東京, 10/31-11/1(11/1), 2014.
  8. Fukuda, A., Furukawa, T., Yamada, J., Akita, T., Matsushima, Y., Yanagawa, Y. Maternally-derived ambient taurine plays a pivotal role in radial migration in the embryonic mouse neocortex by tonically activating GABA<sub>A</sub> receptors. 第 37 回日本神経科学大会, 横浜, 9.11-13 (12), 2014.
  9. Fukuda, A. Maternal taurine modulates immature aspect of GABA actions involved in epileptogenesis. The 16th Annual Meeting of Infantile Seizure Society (ISS): International Symposium on Epileptic Syndromes of Early Infancy and Childhood (ISES), Cappadocia, Turkey, 6/23-27(23), 2014.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## てんかん性脳症・皮質異形成の病理解析

担当責任者 柿田明美 新潟大学 脳研究所 教授

### 研究要旨

難治性てんかんを呈する希少疾患群の遺伝要因と分子病態の解明に向け、難治性てんかん患者のてんかん原性焦点脳組織に対する病理組織学的診断を行った。その対象組織は、全国各地のてんかんセンターで行われた外科手術によって摘出されたものであり、新規に病理診断した 80 例の中には、限局性皮質異形成 16 例など本研究事業が対象とする希少疾患群を含むものである。限局性皮質異形成の責任遺伝子 X を同定し、同病態における X 産生蛋白機能経路の発現異常を明らかにした。病理診断は臨床病型とともに、難治性てんかん患者の病態を理解する上で重要であり、病理標本リソースを使い遺伝学的背景や分子病態を明らかにすることは、対象患者の診療や治療、あるいは医療行政や研究のために重要なものになると考えられた。

### A. 目的

希少難治性てんかん患者の多くは乳幼児期あるいは小児期に発症し、重度の発達障害に至ることから、遺伝学的背景や分子病態を知り、適切な診療ガイドラインを作成し既存治療薬の効果を把握すること、並びに新規治療法を開発することは重要な課題である。本研究事業の目的は、てんかん性脳症、孔脳症、Aicardi 症候群、難治性脳形成異常、皮質異形成、傍シルビウス裂症候群の遺伝要因と臨床病型との関連性を明らかにすること、並びに遺伝子変異と既知治療薬の効果を検証し個別改良の方策を見出すことにある。

本分担研究の目的は、本邦各地のてんかんセンターから送られてくる外科手術組織に対し、正確な病理組織診断を行うこと、ならびに遺伝子解析を含む研究試料として、病理標本リソースを収集、保存、提供し、本研究事業を推進することにある。

### B. 対象と方法

本研究事業開始時点からこれまでの 11 か月間に病理組織診断依頼を受けた 80 例を対象とした。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、hematoxylin-eosin 染色、Klüver-Barrera 染色、GFAP 免疫染色、Neu-N 免疫染色を全例に行い、また症例ごとに必要な追加染色を行った。

#### （倫理面への配慮）

本研究事業の内容を、新潟大学医学部倫理委員会に審査申請し、承認（番号 2006：難治てんかん原性病巣の形成機序に関する病態病理学的解析。平成 26 年 10 月 24 日付）の答申を得ている。遺伝子検索を行う際には、遺伝子ごとに個別に、新潟大学医学部遺伝子倫理審査委員会に審査申請を行っている（結

節性硬化症 TSC1/TSC2：承認番号 521、平成 24 年 6 月 6 日付、片側巨脳症、限局性皮質異形成 MTOR および関連遺伝子：承認番号 529、平成 24 年 4 月 17 日付）。

新潟大学利益相反マネジメント委員会に臨床研究（本研究事業）に係る利益相反自己申告書を提出し、利益相反回避の必要がない旨、答申を得ている（平成 27 年 1 月 30 日付）。

### C. 結果

対象症例の多くが乳幼児期あるいは小児期に発症した希少難治性てんかん例であった。病理組織学的に、本研究事業が対象とする疾患群：限局性皮質異形成 (FCD type IIa: 10 例、FCD type IIb: 6 例)、結節性硬化症 1 例、片側巨脳症 1 例、視床下部過誤腫 12 例、異形成腫瘍 (DNT などの神経グリア混合性腫瘍) 12 例、海馬硬化症 18 例、Sturge-Weber 症候群 1 例などと診断した。その他、分類困難な皮質形成異常を示す症例や、炎症、癍痕性脳症、血管奇形も認められた。

限局性皮質異形成の病理標本リソースを本事業分担研究者に提供し、その結果、責任遺伝子 X を同定した。同リソースを用いた蛋白発現解析を行い、同病態における X 産生蛋白機能経路の発現異常を明らかにした（投稿中）。

### D. 考察

病理学的に診断が確定した症例数は順調に増え、本研究分担者が担当した症例は総数で 800 例を超えた。その多くは、本研究事業が対象疾患としている疾患群である。病因論的にも多彩な像を示していた。

本事業が解明を目指す病態のひとつである限局性皮質異形成について、本事業分担研究者との共同研

究を進め、責任遺伝子 X を同定した。病理組織学的診断は、同病態の病型分類に必須のものであり、病理標本リソースは研究試料として有用であった。

病理診断は臨床病型とともに、難治性てんかん患者の病態を理解する上で重要であり、病理標本リソースを使い遺伝学的背景や分子病態を明らかにすることは、対象患者の診療や治療、あるいは医療行政や研究のために重要なものになると考えられた。

## E. 結論

難治性てんかんを呈する希少疾患群の遺伝要因と分子病態の解明に向け、本研究事業開始後 80 例の新規手術症例を病理組織学的に診断した。それらは、限局性皮質異形成など、本研究事業が対象とする疾患群が多く認められた。限局性皮質異形成の責任遺伝子 X を同定し分子病態を解析した。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kimura T, Kitaura H, Masuda H, Kameyama S, Saito Y, Otsuki T, Nakazawa A, Morota N, Yamamoto T, Iida K, Takahashi H, Kakita A. Characteristic p57/Kip2 immunoreactivity of balloon cells in focal cortical dysplasia. *Neuropathology*, in press
- 2) Fukasawa T, Kubota T, Negoro T, Maruyama S, Honda R, Saito Y, Ito M, Kakita A, Sugai K, Otsuki T, Natsume J, Watanabe K. Two siblings with cortical dysplasias: focal cortical dysplasia and hemimegalencephaly: clinicoencephalographic features. *Pediatr Int*, in press.
- 3) 柿田明美. ヒトてんかん病巣におけるグリア細胞の病理組織学的所見. *臨床神経* 2014; 54(12): 1155-1157.
- 4) 柿田明美. 小児てんかん原性病巣の外科病理. *脳発達* 2014; 46(6): 413-417.

### 2. 学会発表

- 1) Kitaura H, Shirozu H, Shimizu H, Sonoda M, Murakami H, Masuda H, Takahashi H, Kameyama S, Kakita A. Different mechanism of epileptogenesis in subiculum and dentate gyrus in mesial temporal lobe epilepsy: an in vitro optical imaging study of resected human hippocampus. *Society for Neuroscience*, 2014 年 11 月.
- 2) 柿田明美. てんかん焦点の病理. 第 48 回日本て

んかん学会. 2014 年 10 月.

- 3) 園田真樹, 北浦弘樹, 伊藤陽祐, 白水洋史, 増田浩, 柿田明美, 亀山茂樹. 視床下部過誤腫の生検組織スライス標本を用いた生理学的・薬理学的研究. 第 48 回日本てんかん学会. 2014 年 10 月.
- 4) 伊藤陽祐, 増田浩, 白水洋史, 村上博淳, 園田真樹, 亀山茂樹, 北浦弘樹, 高橋均, 柿田明美. 視床下部過誤腫の生検組織スライス標本を用いた生理学的・薬理学的研究. 第 48 回日本てんかん学会. 2014 年 10 月.
- 5) 跡部真人, 須貝研司, 石山昭彦, 齋藤貴志, 斎藤義朗, 小牧宏文, 中川栄二, 佐々木征行, 高橋章夫, 大槻泰介, 伊藤雅之, 柿田明美. 限局性皮質形成異常によるてんかん患者の発作頻度の特徴について. 第 56 回日本小児神経学会. 2014 年 5 月.
- 6) 柿田明美. ヒトてんかん病巣におけるグリア細胞の病理組織学的所見. 第 55 回日本神経学会. 2014 年 5 月.
- 7) 北浦弘樹, 園田真樹, 清水宏, 白水洋史, 伊藤陽祐, 増田浩, 高橋均, 亀山茂樹, 柿田明美. 視床下部過誤腫におけるてんかん原性の in vitro 脳スライス標本を用いた検討. 第 55 回日本神経病理学会. 2014 年 6 月.
- 8) 古川絢子, 柿田明美, 千葉陽一, 樋口善博, 高橋均, 亀山茂樹, 島田厚良. 内側側頭葉てんかん患者の海馬硬化組織特異的な酸化損傷タンパクの同定. 第 55 回日本神経病理学会. 2014 年 6 月.
- 9) 塩谷彩子, 大槻泰介, 佐々木征行, 佐藤典子, 柿田明美, 齋藤祐子. 内側側頭葉てんかんにおける臨床病理学的研究. 第 55 回日本神経病理学会. 2014 年 6 月.
- 10) 清水宏, 花岡仁一, 金村米博, 山崎麻美, 田澤立之, 高橋均, 柿田明美. *LICAM* 遺伝子変異を伴う伴性劣性遺伝性水頭症の胎児例. 第 55 回日本神経病理学会. 2014 年 6 月.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし