

## 髄液プロテオーム解析による AESD 早期診断マーカーの探索

研究分担者 山形崇倫 自治医科大学医学部小児科学教授

### 研究要旨

けいれん重積型脳症 (AESD) の早期診断のためのバイオマーカー同定と、発症機序と病態を解明するために、AESD を発症した患者の初回けいれん後早期の髄液で変化している蛋白の同定を試みた。AESD 3 例、比較対照として一相性脳症 3 例の、初回痙攣後 10 時間以内の髄液を用い、二次元電気泳動 (2D-DIGE 法) により蛋白質を展開し、AESD で発現が有意に増加していたスポット 6 か所、有意に発現が低下していたスポット 4 か所の蛋白を抽出して、質量分析を行い同定した。AESD で発現が増加していたスポット 6 か所中、5 か所は免疫グロブリン系であった。もう一つの蛋白も、免疫系に関連する蛋白で 2.5 倍上昇しており、早期診断のバイオマーカーとして有望と考えられ、他の患者の髄液を集積して解析予定である。AESD で発現が低下していたスポットは、免疫系、アポトーシスに関連、神経修復に関与する蛋白等で、これらの蛋白は、病態に関連している可能性が考えられ、他の患者の髄液で確認する予定である。AESD にも炎症や抗原抗体反応などの免疫反応が関与している可能性が示唆された。また、神経修復に関連する蛋白の発現が低下していたことなどからは、細胞興奮毒性による細胞障害からの回復過程に異常があるために発症する可能性も考えられる。

### 研究協力者

小島華林 自治医科大学医学部小児科学助教

### A. 研究目的

けいれん重積型脳症 (AESD) は、発熱に伴い、けいれん重積を起こした後に、一時的に意識状態が改善した後、2-4 日後に、再度けいれん発作や意識障害を起こす 2 相性の経過を取り、麻痺、知的障害やてんかんなどの後遺症を残すことが多い疾患である。現時点では、二相性の経過を見ないと診断が困難である。2 回目のけいれん・意識障害の発症後に治療しても、予後の改善は得られず、1 回目のけいれんの後、早

期に診断し、早期治療を行うことで、予後の改善が得られる可能性がある。そのために、初回けいれん後、早期に二相性の脳症を発症するリスクを判定するバイオマーカーが必要である。その、バイオマーカーの候補として、初回けいれん発症後早期の、髄液内で発現が変化している分子の同定が考えられる。

また、発症機序と病態を解明するためにも、髄液内で変化している分子を同定することは重要である。

よって、初回けいれん後早期の髄液で、AESD 発症した患者で変化している蛋白の同定を試みた。

## B. 研究方法

対象は、AESD 3 例（年齢：11 か月～1 歳 3 か月）で、比較対照として、一相性脳症 3 例（年齢：11 か月～2 歳 0 か月）。初回痙攣後、10 時間以内（2 時間～10 時間）の髄液を用い、二次元電気泳動（2D-DIGE 法）により蛋白質を展開し、両者（AESD と一相性脳症）の間で有意に増減したスポットを、質量分析を行い同定した。（倫理面への配慮）

研究実施にあたっては、自治医科大学遺伝子解析研究倫理審査委員会の承認を得て実施した。また、実施にあたっては、患者の親権者のインフォームドコンセントを得た。

## C. 研究結果

AESD で発現が増加していたスポット 6 か所、発現が低下していたスポット 4 か所の蛋白質を抽出して同定した。

AESD で発現が増加していたスポット 6 か所中、5 か所は、Ig-λ2 chain C region (1.3x)、Ig-γ2 chain C region (1.4x)、Ig-γ1 chain C region (1.5x)、Ig-κ chain V-I region(1.3x)、Ig-κ chain V-III region(1.3x)などの、免疫グロブリン系であった。もう一つの蛋白質も、免疫系に関連する蛋白質で 2.5 倍上昇しており、早期診断のバイオマーカーとして有望と考えられ、他の患者の髄液を集積して解析予定である。

AESD で発現が低下していたスポットは、免疫系、アポトーシスに関連する蛋白質、グリア細胞から分泌され神経修復に関与する蛋白質等で、一相性脳症では 1.3 倍から 3.6 倍増加していた。これらの蛋白質は、病

態に関連している可能性が考えられ、これらに関しても、他の患者の髄液で解析し、確認する予定である。

これまで、AESD の中心病態は細胞興奮毒性と考えられていたが、上記結果から、AESD にも炎症や抗原抗体反応などの免疫反応が関与している可能性が示唆された。よって、治療としては炎症を抑制するステロイド等の治療が妥当である。

また、神経修復に関連する蛋白質の発現が低下していたことなどからは、細胞興奮毒性による細胞障害からの回復過程に異常があるために発症する可能性もあり、さらに解析を継続する。

## D. 健康危険情報

特になし。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Miyauchi A, Monden Y, Osaka H, Takahashi Y, Yamagata T. A case of anti-NMDAR encephalitis presented hypotensive shock during plasma exchange. *Brain Dev.* 2015 [Epub ahead of print]
- 2) Tada H, Takanashi J, Okuno H, Kubota M, Yamagata T, Kawano G, Shiihara T, Hamano S, Hirose S, Hayashi T, Osaka H, Mizuguchi M. Predictive score for early diagnosis of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD). *J Neurol Sci.* 2015;358:62-5.
- 3) 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.

桑島真理、長嶋雅子、中野祐子、門田行史、小坂仁、山形崇倫：急性脳症を反復した Sotos 症候群の 2 症例. 第 57 回日本小児神経学会学術集会 2015 年 5 月 28 日

## 2. 学会発表

## 我が国における難治頻回部分発作重積型急性脳炎の実態に関する研究

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 副参事研究員

### 研究要旨

我が国における難治頻回部分発作重積型急性脳炎の実態を把握するため、該当する症例を前方視的に集積・解析した。対象症例は26例で、平均7.5歳、男女比は19:7であった。25例で先行感染を認め、潜伏期間は平均4.5日。急性期のけいれん発作は全例で焦点発作を認め、眼球偏位、顔面間代、片側四肢間代発作が多かった。髄液細胞増加は76%、急性期の頭部MRIの信号異常は65%に認め、いずれも欧米からの報告よりも多い数字であった。治療の中心は高用量バルビツール酸であったが、24例でステロイドパルス療法が、19例で免疫グロブリン療法が実施され、我が国からの過去の報告と比較してその頻度は増加していた。予後は良好例が9例、中間例が11例、不良例が6例であり、全体的に予後が改善している傾向が見られた。

### 研究協力者

水野朋子 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

### A. 研究目的

難治頻回部分発作重積型急性脳炎 (acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures ; AERRPS) は発熱に伴い極めて難治かつ頻回の部分発作を呈する原因不明の脳炎で予後不良である。治療には高用量バルビツール酸が用いられることが多いが、長期使用の弊害も指摘されており有効な治療法はいまだ確立されていない。

本研究は我が国におけるAERRPS症例の臨床情報を集積・解析し、本疾患の特徴を明らかにすることを目的とする。

### B. 研究方法

2010年より厚生労働科学研究・難治性疾患克服研究事業として前方視的に全国調査を行った。AERRPSと暫定診断され、本調査に登録された症例の各主治医にアンケートを送付して臨床情報を収集し、解析を行った。

(倫理面への配慮)本研究は東京都医学総合研究所倫理委員会の承認を受け、患者家族には主治医から同意を得た。

2010年10月から2014年2月までに、28症例の登録があった。けいれん重積型脳症の既往がある1例と、短期間のミダゾラム持続投与でけいれんが抑制された1例を除く、26症例を解析対象とした。

### C. 研究結果

対象の年齢は2歳6か月-12歳4か月(平均7.5歳)、性別は男19例、女7例であった。25例で先行感染を認め、けいれん発

症までの潜伏期間は2-7日（平均4.5日）だった。

急性期のけいれんは、全般強直間代発作を38%、焦点発作を100%で認めた。発作型は眼球偏位、顔面間代、片側四肢間代発作を多く認めた。

髄液検査では、細胞数（/μl） $20.0 \pm 19.8$ （1-68, 76%で細胞数上昇（ $>5/\mu\text{l}$ ）あり）、蛋白（mg/dl） $35.3 \pm 20.4$ （4-104）であった。26例中1例で抗NMDA受容体抗体が陽性だったが、他に自己抗体陽性例は認めなかった。急性期脳波所見は全例で何らかの異常を認め、焦点性、多焦点性のてんかん性異常波を最も多く認められた。頭部MRIは65%で急性期に信号異常を認め、部位は海馬・扁桃体が最も多く、大脳皮質、基底核、視床が続いた。慢性期に脳萎縮を認めたのは73%で、このうち37%では急性期に異常所見を認めなかった。

治療は、急性期にバルビツール酸持続静注が92%で施行され、平均投与期間、平均最大投与量はそれぞれ $26.5 \pm 27.7$ （2-113）日、 $9.1 \pm 4.1$ （3-20）mg/kg/hrであった。免疫調整療法としてはステロイドパルス療法が24例（92%）、免疫グロブリン療法が19例（73%）、デキサメサゾン髄注が2例で行われていた。その他にアシクロビルが19例、エダラボンが7例で使用され、脳低（平）温療法が6例、ケトン食療法が4例で実施された。

予後はpediatric cerebral performance category (PCPC) scaleにて評価し、1-2を良好例、3を中間例、4-5を不良例とした。良好例が9例、中間例が11例、不良例が6例であった。慢性期のてんかん発作は多くの例で認めたが、5例では発作は消失していた。

## D. 考察

本検討では髄液細胞数増多を76%の症例で認め、海外の報告よりも多い傾向にあった。また急性期MRIで異常所見を認める症例も多く、視床病変で予後不良の傾向があった。一方で急性期に異常を認めず慢性期に脳萎縮をきたす例もあった。

過去の症例と比較し、本検討では予後不良例は減少傾向であった。その理由として、本疾患が認知され、早期から積極的なけいれんコントロール、免疫調整療法が行われるようになったことが影響している可能性があるが、多数例での多変量解析が必要である。慢性期のてんかん発作はコントロール良好例も認められ、レベチラセタムをはじめとする新規抗てんかん薬の関与も推測される。バルビツール酸持続静注期間が長いと予後不良の傾向が認められた点は既報告と同様であったが、長期間必要なのはそれだけ重症であるとも考えられる。しかしバルビツール酸持続静注から離脱を図るためケトン食療法やレベチラセタム等の新規抗てんかん薬を早期に試す価値があると考えられる。

さらにバルビツール酸持続静注からの離脱が困難な例では、より強力に炎症を抑制する治療として今後免疫抑制剤の使用なども検討していく必要がある。

## E. 健康危険情報

該当事項なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Takasawa K, Takeda S, Nishioka M, Sakuma H, Morio T, Shimohira M. Steroid-responsive status epilepticus caused by human

- parvovirus B19 encephalitis. *Pediatr Infect Dis J*. 2016;35:227-8.
- 2) Nakahara E, Sakuma H, Kimura-Kuroda J, Shimizu T, Okumura A, Hayashi M. A diagnostic approach for identifying anti-neuronal antibodies in children with suspected autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* 2015;285:150-5.
- 3) Sakuma H, Tanuma N, Kuki I, Takahashi Y, Shiomi M, Hayashi M. Intrathecal overproduction of proinflammatory cytokines and chemokines in febrile infection-related refractory status epilepticus. *J Neurol Neurosurg Psychiatr* 2015;86:820-2.
- 4) Higurashi N, Takahashi Y, Kashimada A, Sugawara Y, Sakuma H, et al. Immediate suppression of seizure clusters by corticosteroids in PCDH19 female epilepsy. *Seizure* 2015 27:1-5.
- 1) 佐久間啓. けいれん重積・てんかんと神経炎症. 第49回日本てんかん学会学術集会. 2015.10.31. 長崎
- 2) 佐久間啓. 急性脳炎・脳症とサイトカイン: シンポジウム「急性脳炎・脳症の理解を深めるために」第57回日本小児神経学会学術集会. 2015.5.29. 大阪.
- 3) Sakuma H, Tanuma N, Kuki I, Takahashi Y, Shiomi M, Hayashi M. Intrathecal overproduction of pro-inflammatory cytokines and chemokines in acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology. 2015.5.14-16, Taipei, Taiwan.

## 2. 学会発表

### 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

その他: なし

## 可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳症家族例の遺伝子解析に関する研究

研究分担者 奥村彰久 愛知医科大学医学部小児科教授

### 研究要旨

可逆性脳梁膨大部病変を伴う軽症脳症（MERS）は、頭部 MRI 拡散強調画像における脳梁膨大部の一過性の拡散能低下を特徴とする急性脳症のサブタイプである。MERS の発症機序は未だ十分に解明されておらず、遺伝学的背景の研究は進んでいない。本研究では、3 世代にわたって MERS およびそれに類似した神経症状を呈した家族例 5 例について遺伝学的解析を行った。5 例について全エクソーム解析を行ったところ遺伝子 A に 5 例に共通し、アミノ酸変異を伴うバリエントを同定した。遺伝子 A は中枢神経に発現しており、中枢神経内の炎症と関連があることが判明しており MERS との関係が否定できない。本研究の成果は急性脳症の遺伝学的背景を明らかにするのみならず、発熱に伴う異常言動のリスク因子の同定にも有用である可能性があると思われる。

### A. 研究目的

可逆性脳梁膨大部病変を伴う急性脳症（MERS）は、頭部 MRI 拡散強調画像における脳梁膨大部の一過性の拡散能低下を特徴とする急性脳症のサブタイプである。症例によっては、拡散能低下を脳梁全体や半卵円中心にも認めることがある。これらの病変は一般に数日以内に消失し、原則として不可逆性の病変を認めることはない。MERS の臨床症状は、異常言動や軽度の意識障害にとどまることが多く、その持続も数日以内である。神経学的予後も良好であり、特に治療をしなくても後障害なく回復するとされている。

現在まで MERS の病態は十分に明らかになっていない。MERS では急性期に低 Na 血症を伴うため、SIADH が関与していることが示唆されている。また、MERS は時に川崎病や上部尿路感染症に合併することが

報告されており、サイトカインなどの自然免疫反応の関与も考えられる。実際に MERS の症例では、その一部に髄液や血清中において IL-6 などのサイトカイン値の上昇も報告されている。

近年、遺伝子変異やバリエントと急性脳症との関係が注目されている。二相性脳症では *SCN1A* などの遺伝子変異やバリエントの報告がなされている。しかし、MERS においては遺伝学的背景の研究は進んでいない。我々は、3 世代にわたって MERS およびそれに類似した神経症状を認める家族例において、その遺伝学的背景を検討した。

### B. 研究方法

発端者は現在 6 歳の女兒である。2 歳時に発熱に伴ってけいれんを認め、意識減損が遷延したため入院した。3 歳時にも同

様のイベントがあり入院した。その際に頭部 MRI を施行したところ、脳梁および半卵円中心に拡散能低下を認め MERS と診断された。特に治療を行わなかったが、神経学的後障害なく回復した。それ以降も発熱に伴って異常言動を認めることがあり、時に入院加療が必要である。現在までの発達は正常で、神経学的所見にも異常を認めない。

発端者の家系には、以下のように同様の症状を認めるものが複数認められた。

母：11 歳時に発熱した際に急に話せなくなり、体も動かなくなった。2-3 日で回復した。

母の弟：6 歳時に授業中に発熱した際に動けなくなり、寝たきりの状態が 2～3 日続いたが、自然に回復した。

母の妹：8 歳時に発熱に伴って、けいれん・軽度意識障害・異常限度を認めた。

母方祖母：幼児期に発熱に伴って急に話せなくなり、身体も動かなくなることが 2 回あった。

母方曾祖母：発熱時に急に話せなくなり、身体も動かなくなることがあった。

この家系のうち、母方曾祖母を除いた 5 例についてインフォームドコンセントを得た後に採血し遺伝子解析を行った。遺伝子解析は、次世代シーケンサーを用いて全エクソーム解析を行った。この家系では常染色体優性遺伝であると想定し、以下の条件を満たす SNV を抽出した：1) 5 例に共通する、2) heterozygous SNV である、3) エクソン中に存在するまたは splicing に影響する、4) アミノ酸変異を伴う、5) NHLBI Exome Sequencing Project ・ 1000 Genomes ・ HGVD ・ ExAC の全てで頻度が 1% 未満。

### C. 研究結果

前述のフィルターで 102 個の SNV が判明した。これらの SNV を 39 個の遺伝子に絞り込んで解析したところ、中枢神経系に特異的に発現する遺伝子 A に 5 人が共有するミスセンスバリエントを確認した。このバリエントはアミノ酸のグルタミンからアルギニンへの変異を伴い、頻度データベースに同バリエントの登録は認めなかった。変異部位のアミノ酸（グルタミン）は種間で非常に高い配列保存性を呈していた。各種 prediction tools ではこのバリエントは disease causing と予測された。さらに、5 症例すべてにおいてサンガー法で同バリエントの存在を確認した。

### D. 考察

本研究では、MERS 家系例について全エクソーム解析を施行し、その発症に関与する可能性がある候補遺伝子 A を同定することができた。この結果は、MERS の発症には遺伝学的な因子が関与する可能性を示唆する。

本研究で同定された遺伝子 A については、ノックアウトモデルマウスで中枢神経系の炎症を起こすことが確認されている。これまでの研究の結果から MERS ではサイトカインなどの自然免疫反応との関連が示唆されている。したがって、遺伝子 A のバリエントにより感染によって何らかのトリガーがかかり中枢神経内で過剰な炎症反応が起きる可能性は否定できない。また、今回の同定されたバリエントは、遺伝子 A の DNA 結合ドメインとして機能予測されている箇所に存在する。このことは、今回同定されたバリエントが遺伝子 A の機能に影響する可能性を示唆する。今回の研究では 1 家系での解析に留まったため、遺伝子 A が MERS の孤発例に関与している

か否かは不明である。今後、MERS 孤発例についても遺伝子 A の解析を施行し、その関与の有無を解明する必要がある。

また、MERSの神経症状は、明らかな画像異常を伴わない発熱時の異常言動と類似しており、一つの疾患スペクトラムである可能性がある。発熱時の異常言動は家族集積性があることが知られており、何らかの遺伝学的因子の関与が示唆される。したがって、今回同定された遺伝子Aは発熱に伴う異常言動にも関与している可能性がある。遺伝子Aが発熱時の異常言動に関与していることが判明した場合、予め遺伝子Aのバリエーションの有無を調べることによりその発症予測ができる可能性がある。それが可能になった場合には、発熱時の監視を十分に行うことなどにより異常言動によって惹起される二次障害の予防に有用であることが期待される。

## E. 結論

3世代にわたってMERSおよびその類似の神経症状を認めた5家族例について、全エクソーム解析を施行し候補遺伝子Aを同定した。MERS孤発例における遺伝子Aのバリエーションの有無を検討することにより、MERSの遺伝学的背景を明らかにすることが期待される。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Okumura A, Nakazawa M, Igarashi A, Abe S, Ikeno M, Nakahara E, Yamashiro Y, Shimizu T, Takahashi T. Anti-aquaporin 4 antibody-positive acute disseminated encephalomyelitis. *Brain Dev* 2015; 37(3): 339-43.

Ito Y, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Azuma Y, Tsuji T, Okumura A, Kubota T, Ando N, Saitoh S, Miura K, Negoro T, Watanabe K, Kojima S. Seizure characteristics of epilepsy in childhood after acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *Epilepsia* 2015; 56(8): 1286-93.

Nakahara E, Sakuma H, Kimura-Kuroda J, Shimizu T, Okumura A, Hayashi M. A diagnostic approach for identifying anti-neuronal antibodies in children with suspected autoimmune encephalitis. *J Neuroimmunol* 2015; 285: 150-5.

Nakazawa M, Akasaka M, Hasegawa T, Suzuki T, Shima T, Takanashi J, Yamamoto A, Ishidou Y, Kikuchi K, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for acute encephalopathy in children. *Brain Dev* 2015; 37(4): 418-22.

Nakazawa M, Toda S, Abe S, Ikeno M, Igarashi A, Nakahara E, Yamashita S, Niijima S, Shimizu T, Okumura A. Efficacy and safety of fosphenytoin for benign convulsions with mild gastroenteritis. *Brain Dev* 2015;37(9): 864-7.

Okanishi T, Yamamoto H, Hosokawa T, Ando N, Nagayama Y, Hashimoto Y, Maihara T, Goto T, Kubota T, Kawaguchi C, Yoshida H, Sugiura K, Itomi S, Ohno K, Takanashi J, Hayakawa M, Otsubo H, Okumura A.

Diffusion-weighted MRI for early diagnosis of neonatal herpes simplex encephalitis. *Brain Dev* 2015; 37(4): 423-31.

Takanashi J, Shiihara T, Hasegawa T, Takayanagi M, Hara M, Okumura A, Mizuguchi M. Clinically mild encephalitis with a reversible splenic lesion (MERS) after mumps vaccination. *J Neurol Sci* 2015; 349(1-2): 226-8.

Yamamoto H, Okumura A, Natsume J, Kojima S, Mizuguchi M. A severity score for acute necrotizing encephalopathy. *Brain Dev* 2015; 37(3): 322-7.

Yamamoto H, Natsume J, Kidokoro H, Ishihara N, Suzuki M, Tsuji T, Kubota T, Yamada A, Ozeki M, Kato Z, Kawamura Y, Yoshikawa T, Okumura A, Ando N, Saitoh S, Takahashi Y, Watanabe K, Kojima S. Clinical and neuroimaging findings in children with posterior reversible encephalopathy syndrome. *Eur J Paediatr Neurol* 2015; 19(6): 672-8.

## 2. 学会発表

奥村彰久. 小児の急性脳炎・脳症. 第263回日本小児科学会東海地方会、名古屋、2015.2.1.

Akihisa Okumura, Shinpei Abe, Mika Nakazawa, Michihiko Takasu, Hirokazu Kurahashi, Toshiaki Shimizu. Were attitude toward epilepsy and driving license affected by media coverage? 第

118回日本小児科学会学術集会、大阪、2015.4.16.

Akihisa Okumura, Toshiyuki Yamamoto, Masakazu Miyajima, Keiko Shimojima, Satoshi Kondo, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Hirokazu Kurahashi, Michihiko Takasu, Toshiaki Shimizu. 3p Interstitial Deletion Including PRICKLE2 in Identical Twins with Autistic Features. 第57回日本小児神経学会学術集会、大阪、2015.5.29.

奥村彰久、辻健司、久保田哲夫、安藤直樹、夏目淳、齋藤伸治、東海小児神経研究. 09-10 シーズン以降の小児のインフルエンザ脳症の実態. 第20回日本神経感染症学会学術集会、長野、2015.10.23.

Akihisa Okumura, Eisuke Arai, Yuri Kitamura, Shinpei Abe, Mitsuru Ikeno, Michihiko Takasu, Hirokazu Kurahashi, Takuro Fujimaki, Toshiyuki Yamamoto, Toshiaki Shimizu. Epilepsy Phenotypes in Siblings with Norrie Disease. 第49回日本てんかん学会学術集会、長崎、2015.10.30.

## G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## Angelman 症候群および関連疾患に関する研究

研究分担者 齋藤伸治 名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野教授

### 研究要旨

てんかんを主要な症候とする先天性遺伝性疾患 Angelman 症候群 (AS) を対象として、発症原因ごとの分類を試みた。商業的解析が可能な欠失例は場外した。解析した 86 例中、片親性ダイソミー 3 例、刷り込み変異 3 例、UBE3A 変異陽性 19 例であった。変異が陰性であった 45 例中、1 例に MECP2 変異を同定した。AS の原因は多彩であり、また、疑い例のなかに、AS 以外の疾患も存在する。

### A. 研究目的

Angelman 症候群 (AS) はてんかんを主要な症候とする症候群である。原因は 15q11-q13 に存在する UBE3A の機能喪失であり、その原因として 15q11-q13 の母性欠失、15 番染色体の父性片親性ダイソミー、刷り込み変異、UBE3A の変異が存在する。そのため、診断には体系的な遺伝学的診断が必要である。AS に合併するてんかんは全般発作が中心であり、時に非けいれん性てんかん重積を起こすことが知られている。そのため、AS はてんかん重積を研究するための重要なモデルである。しかし、臨床的診断では正確な診断はできず、また、遺伝学的分類を行わなければ、解析の基盤を築くことができない。そこで、私たちは、臨床的に AS が疑われた患児の発症原因ごとの分類を行うことを目的とした。

### B. 研究方法

臨床的に AS が疑われた 86 例を対象とした。商業的に診断が可能である、母性欠失例は今回の解析からは除外した。遺伝学的診断は、SNRPN 遺伝子の DNA メチル化テス

ト、両親の検体を用いた 15 番染色体の多型解析、15q11-q13 刷り込み中心の欠失解析のための MLPA 法、UBE3A 遺伝子のサンガー法による塩基配列決定を実施した。これらの方法にて原因が同定されなかった時は、S と表現型が似ていることが報告されている、6 個の遺伝子 (SLC9A6、TCF4、MBD5、CDKL5、MECP2、FOXP1) のコーディング領域を対象とするシークエンスパネルを AmpliSeq (Lifetechnologies) により作成し、Ion PGM を用いて解析した。

### C. 研究結果

15 番染色体父性片親性ダイソミー 3 例、刷り込み変異 3 例、UBE3A 変異 19 例を同定した。刷り込み変異 3 例のうち 1 例に刷り込み中心の微細欠失を同定した。残り 2 例はエピソード変異と判断した。これらの解析で原因が同定できなかった 45 例中 1 例に MECP2 遺伝子のナンセンス変異を同定し、この例は Rett 症候群であることが明らかになった。

体系的な遺伝学的診断において AS 疑い

例 86 例中 25 例 (29%) が遺伝学的に AS と確定診断をすることができた。確定診断できなかつたなかの 1 例は遺伝学的解析の結果 AS ではなく Rett 症候群であることが明らかになった。AS と Rett 症候群は臨床的に重なる症状が多く、特に乳児期に区別することは困難である。正確な診断には遺伝学的診断が重要であることが示されたと考える。AS の 10% は原因が不明と言われているが、今回の解析ではむしろ診断がつかない例が多く見られた。このことは、臨床現場においては必ずしも典型的でなくても診断を否定したいとの要求が多いため、疑い例に対して広く遺伝学的診断を行っている実態を反映していると思われる。

てんかん重積に対する適切な治療法を考察するためには、確実な診断が欠かせない。そのために、体系的な遺伝学的診断が保険診療として位置づけられることが必要であると考えられる。

#### D. 健康危険情報

なし

#### E. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Negishi Y\*, Miya F\*, Hattori A, Mizuno K, Horii I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFIA* causes brain malformation and urinary tract defects. *Hum Genome Var* 2:15007, 2015.  
\* Equal contribution.
- 2) Miya F, Kato M, Shiohama T, Okamoto N, Saitoh S, Yamasaki M, Shigemizu D,

Abe T, Morizono T, Boroevich KA, Kosaki K, Kanemura Y, Tsunoda T. A combination of targeted enrichment methodologies for whole-exome sequencing reveals novel pathogenic mutations. *Sci Rep* 5:9331, 2015.

- 3) Yokoi S, Ishihara N, Miya F, Tsutsumi M, Yanagihara I, Fujita N, Yamamoto H, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Kojima S, Saitoh S, Kurahashi H, Natsume J. TUBA1A mutation can cause a hydranencephaly-like severe form of cortical dysgenesis. *Sci Rep* 5:15165, 2015.
- 4) Saitoh S. Clinical, molecular, and neurophysiological features in Angelman syndrome. *J Pediatr Epilepsy* 4:17-22, 2015.

#### 2. 学会発表

- 1) 齋藤伸治. 小児神経科医に必要な遺伝学的検査の解釈. 日本小児神経学会学会術集会 (大阪) 2015 年 5 月 29 日
- 2) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Horii I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NFIA* causes brain malformation and urinary tract defects. 日本小児神経学会学会術集会 (大阪) 2015 年 5 月 29 日

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

## 難治性てんかんの遺伝子解析

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

小児の急性脳症・けいれん重積状態の遺伝学的背景に、難治性てんかんを引き起こす遺伝子が関係することが、報告されている。難治性てんかんを引き起こす遺伝子と小児の急性脳症・けいれん重積状態の遺伝学的背景との関連を明らかにするためには、今後網羅的な遺伝子解析が必要である。これに先立つ基礎研究として、日本人の難治性てんかんのうち、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。いずれの難治性てんかんでも遺伝子異常を発見できた。今後はこの情報をもとに、次世代シーケンサーにより、難治性てんかんを引き起こす遺伝子と小児の急性脳症・けいれん重積状態を明らかにする予定である。

### A. 研究目的

小児の急性脳症・けいれん重積状態の関連遺伝子の網羅的な検索に備え、パイロットスタディーとして、日本人における難治性てんかんで、その遺伝子異常の探索を行った。いままでに、難治性てんかんの原因遺伝子と小児の急性脳症・けいれん重積状態の関連が示唆されている。

### B. 研究方法

今回対象の難治性てんかんとして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。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 GABA<sub>A</sub> 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 を、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。

（倫理面への配慮）

患者遺伝子変異解析を行うにあたり、「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、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、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。

### 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<sub>A</sub>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。今後、小児の急性脳症・けいれん重積状態を来した患者の検体を利用して、難治性てんかん関連遺伝子を中心としたパネルを用いた次世代シーケンスにより、網羅的に遺伝子異常を検索予定である。

### D. 健康危険情報

なし

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Shi XY, Tomonoh Y, Wang WZ, Ishii A, Higurashi N, Kurahashi H, Kaneko S, Hirose S, Epilepsy Genetic Study Group J. Efficacy of antiepileptic drugs for the treatment of Dravet syndrome with different genotypes. Brain Dev. 2016;38(1):40-6.
2. 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 CJ, Petrou S, Heron SE, Dibbens LM, 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;10(3):e0118946.

3. Tada H, Takanashi J, Okuno H, Kubota M, Yamagata T, Kawano G, Shiihara T, Hamano S, Hirose S, Hayashi T, Osaka H, Mizuguchi M. Predictive score for early diagnosis of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD). J Neurol Sci. 2015;358(1-2):62-5.

4. Shi XY, Yang XF, Tomonoh Y, Hu LY, Ju J, Hirose S, Zou LP. Development of a mouse model of infantile spasms induced by N-methyl-D-aspartate. Epilepsy Res. 2015;118:29-33.

5. 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.

6. Saitoh M, Ishii A, Ihara Y, Hoshino A, Terashima H, Kubota M, Kikuchi K, Yamanaka G, Amemiya K, Hirose S, Mizuguchi M. Missense mutations in sodium channel SCN1A and SCN2A predispose children to encephalopathy with severe febrile seizures. Epilepsy Res. 2015;117:1-6.

7. 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.

8. Kano S, Yuan M, Cardarelli RA, Maegawa G, Higurashi N, Gaval-Cruz M, Wilson AM, Tristan C, Kondo MA, Chen Y, Koga M, Obie C, Ishizuka K, Seshadri S, Srivastava R, Kato TA, Horiuchi Y,

Sedlak TW, Lee Y, Rapoport JL, Hirose S, Okano H, Valle D, O'Donnell P, Sawa A, Kai M. Clinical utility of neuronal cells directly converted from fibroblasts of patients for neuropsychiatric disorders: studies of lysosomal storage diseases and channelopathy. *Curr Mol Med.* 2015;15(2):138-45.

9. Ishii A, Hirose S. Ring Chromosome 20 Syndrome and Epilepsy. *J Pediatr Epilepsy.* 2015;4:47-52.

10. 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.

11. 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;37(6):631-4.

## 2. 学会発表

1. Mchannelopathy in Early-life Seizures. Hirose S, The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, Taipei, Taiwan, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

2. Genetic Analysis for Hemiplegic Migraine Identified A Novel ATP1A2 Splicing Mutation Causing Bilateral Hemispheric Involvement. Ishii A, The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

3. Identification of a De Novo KCNT1 Mutation in a Girl with Infantile Spasms, Inoue T, Ishii A, Tsurusawa R, Nakamura N, Kanaumi T, Saito H, Kato M, Hirose S, Ogawa A. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

4. Retigabine, a Kv7.2 Channel Opener, Attenuated Drug-induced Seizures in Knock-in Mice Harboring KCNQ2 Mutations. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress

of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

5. A Case of Hashimoto Encephalopathy with Grave's Disease. Yamaguchi H, Kawatani E, Tomonoh Y, Yoshimura K, Ideguchi H, Inoue T, Takahashi Y, Yasumoto S, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

6. Peripheral Neuropathy and Orthostatic Dysregulation Associated with Multiple Autoantibodies. Kawatani E, Fujita T, Onozawa K, Tomonoh Y, Ideguchi H, Inoue T, Shimono M, Koike H, Yasumoto S, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17 Taipei, Taiwan

7. Neurological Complications of in-patients with Exanthem Subitum. Fujita T, Ideguchi H, Kawatani E, Tomonoh Y, Ihara Y, Kanaumi T, Inoue T, Takahashi Y, Hirose S, Yasumoto S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

8. A KCNQ2 Mutation Enhances Firing and GABA Release of GABAergic Interneurons in the Neonatal Hippocampus. Uchida T, Deshimaru M, Yanagawa Y, Koyama S, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

9. Immediate Suppression of Seizure Clusters by Corticosteroids in PCDH19 Female Epilepsy. Higurashi N, Takahashi Y, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan

10. Genome Editing of SCN1A in iPS Cells to Study the Pathomechanisms of Dravet Syndrome. Tanaka Y, Sone T, Uchida T, Higurashi N, Ishikawa M, Okano H, Hirose S. The 13th Asian and Oceanian Congress of Child Neurology, 2015. 5. 14-17, Taipei, Taiwan,

11. The identification and characterization of novel HCN2 mutation found in febrile seizure patients. Nakamura Y, 25th Meeting of The International Society for

Neurochemistry, 2015. 8. 23-27,  
Cairns, Australia

12. A Kcnq2 mutation facilitates  
firing and GABA release of GABAergic  
interneurons in the neonatal  
hippocampus, Uchida T, Deshimaru M,  
Yanagawa Y, Koyama S, Hirose S.  
AMERICAN EPILEPSY Society, 69th Annual  
meeting, 2015. 12. 4-8, Philadelphia,  
America

#### F. 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

### 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.	小児の意識障害.	金澤一郎, 永井良三	今日の診断指 針, 第7版	医学書院	東京	2015	137-138
水口雅.	Reye症候群.	兼本浩祐, 丸英一, 小 国弘量, 池 田昭夫, 川 合謙介	臨床てんかん 学	医学書院	東京	2015	485-486
高梨潤一	脳症		疾患から見る 画像診断の進 め方・読み方	診断と治 療社	東京	2015	81-85
倉橋宏和, 廣瀬伸一	メンデル(Mendel) 型の遺伝を示さな い一般のてんかん における遺伝性の 標準的な説明 一般的な年齢非依 存性焦点性てんか ん	兼本 浩祐 丸 栄一 小国 弘量 池田 昭夫 川合 謙介	臨床てんかん 学	医学書院	東京	2015	5章 106-108
石井敦士, 廣瀬伸一	メンデル(Mendel) 型の遺伝を示さな い一般のてんかん における遺伝性の 標準的な説明 若年ミオクロニー てんかんを含めた 特発性全般てんか ん	兼本 浩祐 丸 栄一 小国 弘量 池田 昭夫 川合 謙介	臨床てんかん 学	医学書院	東京	2015	5章 108-110
廣瀬伸一	熱性けいれん Febrile seizures (FS)	福井 次矢 高木 誠 小室 一成	今日の治療指 針 2016年版	医学書院	東京	2016	1452- 1453

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 H, Okumura A, Natsume J, Kojima S, Mizuguchi M.	A severity score for acute necrotizing encephalopathy.	Brain and Development	37(3)	322-327	2015
Takanashi JI, Shiihara T, Hasegawa T, Takayanagi M, Hara M, Okumura A, Mizuguchi M.	Clinically mild encephalitis with a reversible splenial lesion (MERS) after mumps vaccination.	Journal of the Neurological Sciences	349(1-2)	226-228	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 and Development	37(3)	463-470	2015
Nakano Y, Monden Y, Mizuguchi M, Nagashima M, Koike Y, Gunji Y, Takahashi N, Sugie H, Momoi, M.Y.	Acute encephalopathy with callosal, subcortical and thalamic lesions.	Neurology Asia	20(1)	85- 89	2015
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 and Development	37(6)	631-634	2015
Saitoh M, Ishii A, Ihara Y, Hoshino A, Terashima H, Kubota M, Kikuchi K, Yamanaka G, Amemiya K, Hirose S, Mizuguchi M.	Missense mutations in sodium channel SCN1A and SCN2A predispose children to encephalopathy with severe febrile seizures.	Epilepsy Research	117	1-6	2015
Takanashi JI, Mizuguchi M, Terai M, Barkovich AJ.	Disrupted glutamate-glutamine cycle in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion.	Neuroradiology	57(11)	1163-1168	2015
Tada H, Takanashi JI, Okuno H, Kubota M, Yamagata T, Kawano G, Shiihara T, Hamano SI, Hirose SI, Hayashi T, Osaka H, Mizuguchi M.	Predictive score for early diagnosis of acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion (AESD).	Journal of the Neurological Sciences	358(1-2)	62-65	2015

加藤昭生, 野田雅裕, 小林匠, 大場邦弘, 小鍛治雅之, 黒田誠, 齋藤真木子, 水口雅, 阿部淳.	横紋筋融解症を来した Toxic shock syndrome.	日本小児科学 会雑誌	119(9)	1391-1396	2015
水口雅	病態と輸液・栄養管理— 脳炎・脳症・髄膜炎.	小児科診療	78(6)	771-774	2015
Maegaki Y, Kurozawa Y, Tamasaki A, Togawa M, Tamura A, Hirao M, Nagao A, Kouda T, Okada T, Hayashibara H, Harada Y, Urushibara M, Sugiura C, Sejima H, Tanaka Y, Matsuda-Ohtahara H, Kasai T, Kishi K, Kaji S, Toyoshima M, Kanzaki S, Ohno K; Status Epilepticus Study Group.	Early predictors of status epilepticus-associated mortality and morbidity in children.	Brain and Development	37(5)	478-486	2015
Ueda R, Saito Y, Ohno K, Maruta K, Matsunami K, Saiki Y, Sokota T, Sugihara S, Nishimura Y, Tamasaki A, Narita A, Imamura A, Maegaki Y.	Effect of levetiracetam in acute encephalitis with refractory, repetitive partial seizures during acute and chronic phase.	Brain and Development	37(5)	471-477	2015
Omata T, Fujii K, Takanashi J, Murayama K, Takayanagi M, Muta K, Kodama K, Iida Y, Watanabe Y, Shimojo N	Drugs indicated for mitochondrial dysfunction as treatments for acute encephalopathy.	Journal of the Neurological Sciences	360	57-60	2016
Okanishi T, Yamamoto H, Hosokawa T, Ando N, Nagayama Y, Hashimoto Y, Maihara T, Goto T, Kutota M, Kawaguchi C, Yoshida H, Sugiura K, Itomi S, Ohno K, Takanashi J, Hayakawa M, Otsubo H, Okumura A	Diffusion-weighted MRI for early diagnosis of neonatal herpes simplex encephalitis	Brain and Development	37(4)	423-431	2015
Nakazawa M, Akasaka M, Hasegawa T, Suzuki T, Shima T, Takanashi J, Yamamoto A, Ishidou Y, Kikuchi K, Niijima S, Shimizu T, Okumura A	Efficacy and safety of fosphenytoin for acute encephalopathy in children	Brain and Development	37(4)	418-422	2015