

厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患等政策研究事業）
分担研究報告書

希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築

分担研究者 廣瀬伸一 福岡大学医学部小児科・教授

研究要旨

次世代シーケンサーの登場により、難治性てんかんを引き起こす遺伝子異常が最近数多く報告されるようになった。希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築をするためには、このような遺伝子変異を網羅的に解析する必要がある。これに先立つ基礎研究として、日本人の難治性てんかんに対し次世代シーケンサーにより遺伝子異常の解析を開始した。330例の主に難治性てんかんの症例に112個のてんかん遺伝子に対するターゲットキャプチャーシーケンス法を実施して169例に様々な遺伝子異常を見いだした。今後はこの手法と情報をもとに、希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築を計りたい。

A. 研究目的

希少難治性てんかんのレジストリ構築による総合的研究での、希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築をめざし、その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患者を対象に、すでにてんかんで異常が報告された遺伝子の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の検索探索を行った。次世代シーケンサーの登場により、最近難治性てんかんを引き起こす遺伝子異常が数多く報告されるようになっている。

B. 研究方法

今回対象の難治性てんかんとしては330例で、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関連てんかんなどであった。次世代シーケンサーIllumina Miseqを用いて、112個のてんかん遺伝子に対するターゲットキャプチャーシーケンス法によるエクソームシーケンスを行った。得られたバリエーションは健常者60000名超のエクソームデータ

で得られたバリエーション情報と比較した。この情報で極めて稀で、予測プログラムで有害性が疑われるバリエーションが見られた場合、臨床症状と照らし病原性のあるバリエーションを絞り込んだ。その後、PCRサンガー法で、両親でのバリエーションの有無を確認し、バリエーションが新生であるまたは、臨床症状と連鎖している場合は病的変異と判定した。

臨床症状からDravet症候群とPCDH19関連てんかんを疑いながら、それぞれSCN1AとPCDH19にターゲットキャプチャーシーケンス法を用いて変異が同定されなかった場合は、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。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

330例に病的遺伝子変異を確定した症例は169例であった。変異が認められた主だった遺伝子は、SCN1A(43例)、KCNQ2(15例)、KCN T1(8例) PCDH19(8例)、SCN2A(8例) SCN8 A(8例)であった。

D. 考察

次世代シーケンサーを用いたターゲットキャプチャーシーケンス法によるエクソームシーケンスはてんかん、けいれんの遺伝子変異を網羅的に同定に有用であった。

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、本法を用いた網羅的遺伝子検索が可能と思われた。

E. 結論

次世代シーケンサーを用いたターゲットキャプチャーシーケンス法によるエクソームシーケンスはてんかん、けいれんの遺伝子変異を網羅的に同定することが可能であった。今後はこの手法と情報をもとに、希少難治性てんかんの遺伝子解析キーステーション構築を計りたい。

健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hanaya R, Niantiaro FH, Kashida Y, Hosoyama H, Maruyama S, Otsubo T, Tanak

a K, Ishii A, Hirose S, Arita K. Vagus nerve stimulation for genetic epilepsy with febrile seizures plus (GEFS+) accompanying seizures with impaired consciousness. *Epilepsy Behav Case Rep.* 2017;7:16-9.

2. Ishii A, Kang JQ, Schornak CC, Hernandez CC, Shen W, Watkins JC, Macdonald RL, Hirose S. A de novo missense mutation of GABRB2 causes early myoclonic encephalopathy. *J Med Genet.* 2017;54(3):202-11.

3. 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.

4. Meisler MH, Helman G, Hammer MF, Fureman BE, Gaillard WD, Goldin AL, Hirose S, Ishii A, Kroner BL, Lossin C, Mefford HC, Parent JM, Patel M, Schreiber J, Stewart R, Whittemore V, Wilcox K, Wagnon JL, Pearl PL, Vanderver A, Scheffer IE. SCN8A encephalopathy: Research progress and prospects. *Epilepsia.* 2016;57(7):1027-35.

5. Ju J, Hirose S, Shi XY, Ishii A, Hu LY, Zou LP. Treatment with Oral ATP decreases alternating hemiplegia of childhood with de novo ATP1A3 Mutation. *Orphanet J Rare Dis.* 2016;11(1):55.

6. Ihara Y, Tomonoh Y, Deshimaru M, Zhang B, Uchida T, Ishii A, Hirose S. Retigabine, a Kv7.2/Kv7.3-Channel Opener, Attenuates Drug-Induced Seizures in Knock-In Mice Harboring Kcnq2 Mutations. *PLoS*

ONE. 2016;11(2):e0150095.

2. 学会発表

1. Kcnq2変異マウスの薬剤誘発てんかん発作に対するK⁺チャネル開講薬の有効性Retigabine attenuated seizures in knock-in mice harboring Kcnq2 mutations 井原由紀子、友納優子、石井敦士、廣瀬伸一 第119回日本小児科学会学術集会 2016/5/13-15札幌
2. "How to interpret the results of a genetic test for epilepsy: What are the Limitations?" / Hirose S. Epilepsy Research Symposium, 韓国2016. 3/17
3. How to interpret the results of a genetic test for epilepsy, / Hirose S. 11th Asian & Oceanian epilepsy congress, Hong Kong 2016. 5/13-16
4. Genetic predisposition to acute encephalopathy with status epilepticus. / Saitoh M, Hoshino A, Ishii A, Ihara Y, Hirose S, Mizuguchi M The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders (ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京
5. A case of dravet syndrome affected an acute encephalopathy. / Sokoda T, Ni

shizawa Y, Matsui J, Nishikura N, Takano T, Takeuchi Y, Ishii A, Hirose S The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京

6. The effect of steroid pulse therapy on a case of Dravet / Fujita T, Ideguchi H, Watanabe E, Tomonoh Y, Ihara Y, Inoue T, Takahashi Y, Hirose S The 18th annual meeting of infantile seizure society International Symposium on Acute Encephalopathy in Infancy and Its Related Disorders(ISAE2016) 2016.7/1-7/3 東京
7. Characteristics of SCN1A Mutation locations in a Cohort of 285 Japanese Dravet Syndrome Patients Ishii A, Watkins J, Chen D, Hirose S, Hammer M AES Annual Meeting 2016.12/2-12/6 アメリカ

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他