

遺伝子異常によるてんかん性脳症に関する研究

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

てんかん重積を来す疾患のなかで遺伝子異常により起こる遺伝性疾患は重要である。全エキソーム解析に代表される網羅的遺伝子解析技術の発展により、遺伝子異常が原因となるてんかん性脳症の存在が明らかとなった。原因となる遺伝子は多数あるが、私たちはAngelman症候群とmTOR経路が関連する疾患に注目した。Angelman症候群はてんかんと脳波異常を特徴とする疾患であり、遺伝学的診断が可能である。mTOR経路の機能亢進は巨脳症を示すことが多く、治療薬が存在する。遺伝学的解析としては、体系的解析に加えて、複数の候補遺伝子を搭載した遺伝子パネルを構築し、次世代シーケンサーで網羅的な解析を実施した。mTOR経路の異常には生化学的解析を追加した。てんかん重積を示す種々の基礎疾患に対する診断の道筋を示すことができた。

A．研究目的

てんかん重積を示す脳炎脳症の基礎疾患として遺伝性てんかん性脳症は重要である。近年の全エキソーム解析に代表される網羅的遺伝子解析技術の発展により、遺伝子異常が原因となるてんかん性脳症の存在が明らかとなっている。てんかん性脳症の原因遺伝子は多数報告されている。私たちはその中で、Angelman症候群（AS）とmTOR経路に注目した。ASはてんかん、知的障害、失調様運動障害を特徴とする疾患であり、小児神経領域では広く認識されている。広汎性棘徐波複合を示す脳波異常を示すてんかんでは、しばしば鑑別診断に上げられる。一方、mTOR経路は神経細胞の増殖に必須の経路であり、結節性硬化症の病態として知られている。mTOR経路の機能亢進を示す生殖細胞性変異は遺伝性巨脳症の原因として知られている。また、体細胞突然変異は皮質形成異常の主要な原因である。このようにmTOR経路の変異はてんかんの原因として重要である。さらに、mTOR経路にはシロリムスやエベロリムスなどの阻害剤が存在し、新しい治療薬として注目されている。ASについては系統的な遺伝学的解析を実施した。mTOR経路については、mTOR経路に関連する15遺伝子を搭載した遺伝子パネルを構築し、さらに生化学的解析を行った。

B．研究方法

AS解析については、臨床的にASが疑われた86例を当初の対象とした。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、*SLC9A6*、*TCF4*、*MBD5*、*CDKL5*、*MECP2*、*FOXG1*の6個の遺伝子のコーディング領域を対象とするシーケンシングパネルをAmpliSeq（Life technologies）により作成し、Ion PGMにて解析を行った。

mTOR経路関連疾患では、+2SD以上の頭囲拡大があり、発達の遅れもしくはてんかんがある児28名を対象とした。27名にはmTOR経路に関連する15個の遺伝子を搭載した遺伝子パネルを用いて、Ion PGMにてエクソン領域をシーケンシングした。3例に全エキソーム解析を実施し、内1例は最初から全エキソーム解析を行った。27例は末梢白血球からゲノムDNAを抽出し、1例では手術検体として得られた脳組織からゲノムDNAを抽出した。生化学的解析としては患者由来リンパ芽球を樹立し、mTOR経路の下流に存在するリン酸化S6蛋白をウエスタンブロットにて測定し、対照である

GAPDH と比較した。
(倫理面への配慮)

本研究は名古屋市立大学大学院医学研究科および名古屋市立大学病院倫理審査委員会で承認され、患者もしくは代諾者から書面による同意を得た。

C . 研究結果

AS解析では、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。従って、25/84(29%)がASと確定診断できた。これらの解析で原因が同定できなかった例に加えて、その後、同様の例を集積し、最終的には76名がAS次世代解析に進んだ。76例中6名(7.9%)に病因と考えられる変異を同定した。*MECP2*が3名、*TCF4*が2名、*SLC9A6*が1名であった。*MECP2*の変異は、p.Arg133Cys、p.Asp151Tyr、p.Arg148*であり、既報の変異かナンセンス変異であった。*TCF4*はVal581Glyとp.Gly496Serfs*10であり、いずれもde novo変異であった。*SCL9A6*の変異はc.1141-8C>Aのスプライシング変異であり、リンパ芽球を用いたRNAの解析で、正常なスプライシング産物が産生されないことが確認された。

巨脳症患者においては、病変変異は*PTEN* 6例、*AKT3* 3例、*PIK3R2* 3例、*PIK3CA* 1例、*SHOC2* 1例の計14例(50%)に同定した。*SHOC2*はパネルに搭載されていないが、全エキソーム解析で同定された。*PIK3CA*の1例は片側巨脳症の児で、血液では変異は同定されず、罹患脳組織でのみ変異が同定され、モザイクであった。病変変異が同定された児で生化学的解析が可能であった児はすべてリン酸化S6蛋白の発現が増加しており、mTOR経路の活性亢進が確認された。変異陰性の中にもリン酸化S6の亢進例が存在した。原因遺伝子と表現型との関連は巨脳症、発達の遅れは共通して存在する。顔貌特徴での区別も難しい。一方、MRIの所見は*PTEN*変異例では皮質形成異常が見られないことが特徴と考えられる。てんかん発作は6例(21.4%)に合併していた。合併率は多くないが、てんかん発症例は難治性に経過している。特に、モザイクである片側巨脳症例は外科手術が必要となっている。また、*AKT3*変異例はけいれん重積後脳症のために死亡している。また、*PTEN*変異例6例にはてんかん合併例はいなかった。

D . 考察

ASでは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。このことは臨床的にASが疑われる例の大部分はASではなく、類似疾患であること

を示す。このようなAS類似疾患については、次世代解析を実施することで、7.9%がRett症候群、Pitt-Hopkins症候群もしくはChristianson症候群であることが示された。今回搭載した6遺伝子はその変異がAS様の症状を示すことが知られている遺伝子である。実際に、これらの疾患がASと疑われる患者のなかに存在することが明らかになった。これらの疾患は特に、乳児期から小児期早期には発達遅滞、てんかん、失調様運動を示し、ASと症状が重なっている。しかし、年齢が高くなるに従い、次第にそれぞれの特徴が現れる。ところが、遺伝学的診断はより早期に実施される傾向にあるため、臨床的に完全に区別することは困難であると思われる。

mTOR経路の15遺伝子を搭載した遺伝子パネル解析は遺伝性巨脳症の診断に有用であった。臨床的には互いに重なり合っているために、区別することは困難である。そのため、遺伝子診断は正確な診断のために、有用である。生化学的解析を加えることで、変異の意義を明らかにすることが可能になる。機能亢進型変異はミスセンス変異が多いため、多型との区別が難しい。そのため、生化学的解析との組み合わせは、正確な遺伝子診断のために有用と考えられる。本研究ではリンパ芽球様細胞を使用したために、全例での検査ができなかった。今後は白血球から直接蛋白を抽出し、簡便に検査ができるかどうかが課題である。

mTOR経路には阻害剤が存在し、結節性硬化症などにすでに保険適応が認められている。*AKT3*変異の死亡例などの重症例に対しては、mTOR阻害剤が救命的な意義を有する可能性がある。さらに、片側巨脳症や限局性皮質形成障害などのmTOR経路のモザイクで発症する疾患は極めててんかん原性が高く、mTOR阻害剤が抗てんかん薬やてんかん重積の薬物として意義がある可能性がある。mTOR阻害剤を適切に使用するためには、患者の遺伝学的背景が示されていることが必要である。今回の研究は、そのために基礎的データを提供することが出来たと考える。

E . 結論

ASおよびmTOR経路が関連する巨脳症の次世代シーケンシングを用いた遺伝学的解析方法を確立した。網羅的遺伝子解析を行うことで、表現型と遺伝型が必ずしも一致しない実態が明らかになった。遺伝性疾患の診断には網羅的遺伝学的診断が必要であり、さらに、生化学的解析などを加えることで診断率が上昇する。

F . 研究発表

1. 論文発表

- 1) Negishi Y*, Miya F*, Hattori A, Mizuno

- K, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NF1A* 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.
 - 5) Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K, Negishi Y, Kudo T, Ito R, Kikuchi A, Arai-Ichinoi N, Kure S, Saitoh S. Molecular genetic dissection and neonatal/infantile intrahepatic cholestasis using targeted next-generation sequencing. *J Pediatr* 171:171-177.e4, 2016.
 - 6) Hori I, Miya F, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Novel splicing mutation in the *ASXL3* gene causing Bainbridge-Ropers syndrome. *Am J Med Genet A*. 170:1863-7, 2016.
 - 7) Saito H, Watanabe M, Akita T, Ohba C, Sugai K, Ong WP, Shiraishi H, Yuasa S, Matsumoto H, Beng KT, Saitoh S, Miyatake S, Nakashima M, Miyake N, Kato M, Fukuda A, Matsumoto N. Impaired neuronal *KCC2* function by biallelic *SLC12A5* mutations in migrating focal seizures and severe developmental delay. *Sci Rep* 6:30072, 2016.
 - 8) Tsutsumi M, Yokoi S, Miya F, Miyata M, Kato M, Okamoto N, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S, Kurahashi H. Novel compound heterozygous variants in *PLK4* identified in a patient with autosomal recessive microcephaly and chorioretinopathy. *Eur J Hum Genet* 24:1702-6, 2016.
 - 9) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Johmura Y, Nakagawa M, Ando N, Hori I, Togawa T, Aoyama K, Ohashi K, Fukumura S, Mizuno S, Umemura A, Kishimoto Y, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Nakanishi M, Saitoh S. A combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway-associated megalencephaly. *BMC Med Genet* 18:4, 2017.
 - 10) 2. Kato K, Miya F, Hori I, Ieda D, Ohashi K, Negishi Y, Hattori A, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. A novel missense mutation in the HECT domain of *NEDD4L* identified in a girl with periventricular nodular heterotopia, polymicrogyria and cleft palate. *J Hum Genet*. 62:861-863, 2017.
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術集会(大阪) 2015年5月29日
 - 2) Negishi Y, Miya F, Hattori A, Hori I, Ando N, Okamoto N, Kato M, Tsunoda T, Yamasaki M, Kanemura Y, Kosaki K, Saitoh S. Truncating mutation in *NF1A* causes brain malformation and urinary tract defects. 日本小児神経学会学術集会(大阪) 2015年5月29日
 - 3) 堀いくみ、他. *Vici*症候群9例の臨床的および遺伝学的検討. 日本小児神経学会学術集会(東京) 2016年6月3-5日
 - 4) 堀いくみ、他. *CTCF*遺伝子欠失を認めた2女児の臨床的および遺伝学的検討. 日本小児遺伝学会学術集会(東京) 2016年12月9-10日
 - 5) Negishi Y et al. Combination of genetic and biochemical analyses for the diagnosis of PI3K-AKT-mTOR pathway associated megalencephaly syndromes. International Congress of Human Genetics (Kyoto, Japan). 2016年4月4-7日
 - 6) Hori I et al. Novel Splicing Mutation in

the *ASXL3* gene causes Bainbridge-Ropers Syndrome. International Congress of Human Genetics (Kyoto, Japan). 2016年4月4-7日

- 7) Negishi Y, Ieda D, Miyamoto T, Hori I, Hattori A, Nozaki Y, Komaki H, Tohyama J, Nagasaki K, Tada H, Oishi H, Saitoh S. Truncating *MAGEL2* mutations produce fetal lethality in mice and may recapitulate pathogenesis of Schaaf-Yang syndrome. 67th Annual Meeting of the American Society of Human Genetics. 2017年10月18-21日 (Orland, USA)
- 8) Nakamura Y, Togawa Y, Okuno Y, Muramatsu H, Ieda D, Hori I, Negishi Y, Hattori A, Saitoh S. A patient with compound heterozygous mutations in *SZT2* represents a discernible clinical entity with developmental delay, macrocephaly and dysmorphic corpus callosum. 第59回日本小児神経学会学術集会(大阪)2017年6月16-18日

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