

驚愕病の遺伝子解析

研究分担者 竹谷 健 島根大学医学部小児科 教授

研究要旨

驚愕病は新生児期から、刺激による過度な驚愕反応と全身の筋硬直が起こり、驚愕反応は成人になっても持続する場合が多い。驚愕反応による二次障害で、頭部外傷などの致死的な合併症を引き起こすこともある。クロナゼパムが有効であることから、早期の診断により適切な治療を行うことが重要である。しかし、血液検査、画像検査、生理学的検査では特異的な異常を認めない。この疾患は常染色体優性遺伝あるいは劣性遺伝形式をとる疾患で、グリシン作動性神経伝達に関与する遺伝子異常により発症することから、確定診断を目的として、遺伝子解析を行った。調べた遺伝子は5つ（*GLRA1* 遺伝子、*GLRB* 遺伝子、*SLC6A5* 遺伝子、*SLC6A9* 遺伝子、*SLC32A1* 遺伝子）で、末梢血から DNA を抽出後、PCR 法で DNA を増幅させて、直接塩基配列決定法を行った。検査の同意が得られた 10 人の患者および家族の遺伝子解析を行ったところ、2 例に *GLRA1* 遺伝子変異を同定することができた。他の 8 例は遺伝子変異がなかったため、驚愕病を除外診断することができた。臨床症状から驚愕病が疑われる場合、遺伝子検査は確定診断および除外診断に有用であると思われた。

A. 研究目的

驚愕病（Hyperekplexia）は、グリシン作動性神経伝達に関与する遺伝子異常により、抑制性シナプス機能が障害されることによって発症する疾患である。新生児期から、刺激による過度な驚愕反応と全身の筋硬直が起こり、驚愕反応は成人になっても持続する場合が多い。驚愕反応による二次障害で、頭部外傷などの致死的な合併症を引き起こすことも報告されている。血液検査、MRI などの頭部画像検査、脳波や筋電図などの生理学検査では特異的な異常を認めないため、てんかん、ミオパチー、不安神経症などの他の疾患と間違われる患者が少なくない。したがって、この疾患の確定診断には遺伝子検査が有用と思われる。今回、我々は驚愕病の確定診断を目的として、グリシン作動性神経伝達に関与する遺伝子検査を行った。

B. 研究方法

対象は、症状などから驚愕病が疑われた患者とその家族 10 人。患者およびその家族から遺伝子検査の同意を得た後、ETDA 入り容器に末梢血 2-5ml を採取し各病院から当院まで冷蔵保存（4℃）して送付した。検体は検体管理と取り違えの面から平日の月曜日午前中から金曜日午前中までに当院に届くように宅配便を用いて送った。当院に到着した検体をすぐに DNA 抽出した

（DnaQuick II, DS Pharma）。遺伝子解析は、PCR 法およびサンガー法による直接塩基配列決定法で行った。PCR 溶液は、10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.001% (wt/vol) gelatin, 250 μM of each dNTP, 2.0 units of Taq polymerase (AmpliTaq Gold; Applied Biosystems), 10 pmol (forward and reverse primer) に DNA (50 ng) を入れて計 20 μl に調整した。PCR による DNA 増幅条件は DNA thermal cycler (Applied Biosystems) を用いて、以下の通り行った (35 サイクル: denature; 95°C for 30 sec, annealing; 55°C for 30 sec, and extension; 72°C for 1 min)。その後、PCR 産物を精製して、塩基配列は蛍光色素標識法 (Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, Applied Biosystems) を用いて行った。

検討した遺伝子はグリシン作動性神経伝達に関与する遺伝子である、*GLRA1* 遺伝子、*GLRB* 遺伝子、*SLC6A5* 遺伝子、*SLC6A9* 遺伝子、*SLC32A1* 遺伝子の 5 つである。それぞれのプライマーは表 1 に記載した。

C. 研究結果

今年度は 10 人の患者およびその家族の遺伝子検査を行った。遺伝子異常が認められたのは 2 例であった。いずれも、*GLRA1* 遺伝子変異 c.896 G>A (p.R 299 Q) が認められた。他の 8 人は *GLRA1* 遺

伝子、*GLRB* 遺伝子、*SLC6A5* 遺伝子、*SLC6A9* 遺伝子、*SLC32A1* 遺伝子に変異はなかった。

D. 考察

今回遺伝子変異を認めた 2 症例はいずれも、驚愕反応を認めること、新生児期から乳児期に全身の筋硬直があったことおよび Nose tapping test が陽性であることから臨床的に驚愕病の可能性が高かったため、遺伝子検査により確定診断することができた。また、今回検出された遺伝子変異はこれまでも報告されている異常であるため、また、*in silico* 解析 (mutation t@sting, Polyphen-2) でも病的変異として同定されているため、病的変異であると判断した。残りの 8 人は驚愕反応は認めていたが、他の症状が明らかではなかったこと、驚愕反応に対するクロナゼパムの有効性が明らかではなかったことから、今回の遺伝子検査において驚愕病ではないと鑑別することができた。

E. 結論

グリシン作動性神経伝達に関与する遺伝子解析は驚愕病の確定診断および除外診断に有用と思われた。

F. 健康危険情報

本研究を実施するにあたり、当該観点からは特に問題となることはない。

G. 研究発表

1. 論文発表

- * Saini AG, Taketani T, Sahu JK, Singhi P. Startles, Stiffness, and SLC6A5: Do You Know the Condition? *Pediatr Neurol*. 2018 Apr;81:49-50.

2. 学会発表

(国内)

- * 日野慶子、後藤智英、玉井眞一郎、寺澤佑哉、櫻井薫、福島康浩、山口順嗣、鷺坂省吾、竹谷健、森野道晴、山本直樹. 驚愕てんかんとして加療された驚愕症の症例. 第 51 回日本てんかん学会、京都、2017 年 11 月 3-5 日
- * 美根潤、松村美咲、東本和紀、堀口淳、山口修平、竹谷健. 驚愕病における全国調査(第一報)-遺伝子検査の重要性-. 第 51 回日本てんかん学会、京都、2017 年 11 月 3-5 日

- * 林田麻衣子、小池昌弘、三木啓之、長濱道治、橋岡禎征、和気玲、宮岡剛、木村正彦、竹谷健、堀口淳. 同一家系に生じた驚愕病の検討. 第 22 回日本精神医学会、東京、2017 年 10 月 14, 15 日

H. 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

表1 遺伝子解析に用いたプライマーの配列

GLRA1 遺伝子

GLRA1-1S	ACTACAAAGCACAAAGGACC
GLRA1-1-1A	CATTTCCATCAGAGCGATGT
GLRA1-2-1S	GGATCTGATCACAGCATGAG
GLRA1-2-1A	CCATGCTGCTTGCTGCTTTA
GLRA1-3-1S	TTCTGGGAATGAGTCCTACC
GLRA1-3-1A	GGAGACCAATGCAGAGGATA
GLRA1-4-1S	AAGCACCCAGGTCTCCAAA
GLRA1-4-1A	AGTCTATGCCCAGAAGGTAG
GLRA1-5A-1S	CCTATCCTGGGCAACTGATT
GLRA1-5A-1A	AATTTCTGCCTATCCCATGG
GLRA1-5B-1S	ACCCTAACCAATCCTGACAT
GLRA1-5B-1A	GTGTCTGAAATGACCTCTGG
GLRA1-6-1S	AGCCGAGGTTGTTCTAATCC
GLRA1-6-2A	CATAATGTTGAGTCTGGTGGA
GLRA1-7S	GTATATTCCCAGCCTGCTCA
GLRA1-7A	CCATGTTGATCCAGAAGGAG
GLRA1-8-1S	CCAAGGGAGTGCCTTGCGAG
GLRA1-9A	CCTCCCCAACCTTTCAGA

GLRB 遺伝子

GLRB-2F	CTTGTTCTCTCTTGATAGATCG
GLRB-2R	TGTGTGTCTTCATAAACCACC
GLRB-3F	CCTCCCAATGAGAATTACCC
GLRB-3R	GAATTGTTCTGAACTTAAGGAC
GLRB-4F	ATGAACATGTTATACTGAGACC
GLRB-4R	GTTACTTTCACTATCTCCTCTA
GLRB-5F	CATACACATGTGCACGCATG
GLRB-6R	CCCAGACATTTTAAACACTTTATT
GLRB-7F	AGAAGGTCTTATTTTCTTTCTTT
GLRB-7R	CTCTCCCCTTGGCTATGTAT
GLRB-8F	ACTTACCGTTTCCAGGTCTG
GLRB-8R	TATAATCTGTTCCCTGATGTGAC
GLRB-9F	GACCCCGAACATCTCATAG
GLRB-9R	GGGGGAAATGATTTTCATGGC
GLRB-10F	GAAGAGATGTGTTTCGTAAGTAG
GLRB-10R	GAAAGGAGTAGGTCACAATGAA

SLC6A5 遺伝子

SLC6A5-1A	GAATCTGCTTTCCCTGTCCC
SLC6A5-2A	GACACTGTGCGGGCGTAAT
SLC6A5-3A	CAGGCGGAAAGAGCGGAAAAG
SLC6A5-4A	GACAGAGTAAGAAAGGGCCTGA

SLC6A5-5A	AGAATACACACACCTAAAGCAGG
SLC6A5-6A	CACCTCTGGTCTGCAAATTGA
SLC6A5-7A	CTGGGTGTCTCACAGCTTTCT
SLC6A5-8A	CCCCAGGGCTGGTTATAGAT
SLC6A5-9A	TTCTTCTGTCCCACTCACCAG
SLC6A5-10A	GGAGCTTGTGACATGAGCCT
SLC6A5-11A	GCATGGGATAGAGACTGAGG
SLC6A5-12A	CCACCCCAAGCCTGTGCCTA
SLC6A5-13A	CATGAATGCCTTACCGACACT
SLC6A5-14A	ACGTATGCAAGGTGCTGTCTG
SLC6A5-15A	GGAATTGGGAGGGAAAGAAGT
SLC6A5-16A	AAATGGGAGGAGAGCTATGGAA
SLC6A5-1S	CTGCCGGTTTCGGTTTAGTA
SLC6A5-2S	TAAAAGCTGTTGTGACTTTGTTTT
SLC6A5-3S	GGCCTGCTTGTGGACCTACT
SLC6A5-4S	CCTCCTAGGGCTCTCACTCC
SLC6A5-5S	TAAGATGGAATGAACCCCTGG
SLC6A5-6S	TGCAGAGAGACAAATCTCTGTTTT
SLC6A5-7S	CCTTCTTTCTATCACTCCCCC
SLC6A5-8S	CACTCTGCAGGGCTGCTTCT
SLC6A5-9S	CAGTCTCCTTCATGGGTCTTG
SLC6A5-10S	CCAAGCACACCTAATGGAAAA
SLC6A5-11S	GAAGAGCAGCCTTGAGTAGGG
SLC6A5-12S	TACCTCCTGGGTGGTACAATTT
SLC6A5-13S	CAGGACGCATTTGATATTGGT
SLC6A5-14S	CTCACCTTCTGCTACTGTGC
SLC6A5-15S	GAATAATTCACGCCACCACC
SLC6A5-16S	AGGTGCACTACTTCTGTGACCA

SLC6A9 遺伝子

SLC6A9 ex1F	TAGGCAGAGCTTCGGGAGGA
SLC6A9 ex1R	CTTGCTTGCTGGCTGTGCCT
SLC6A9 ex2F	GCCACCAGCTCAGTCCTGCA
SLC6A9 ex2R	AGCTAGCTACACTGCCCATG
SLC6A9 ex3F	GCACAAATGCCTTGCTGATG
SLC6A9 ex3R	TATCTGGAGTGGGTCTGTGC
SLC6A9 ex4F	CTGGGTCCTACCCAATCGCG
SLC6A9 ex4R	ACAGAGGTCAGCCATGTTTG
SLC6A9 ex5F	GAAATTATTAACCTCACCTC
SLC6A9 ex5R	CTTTGTCTTCAGATGGTTG
SLC6A9 ex6F	GGGAATTTGTTGCTGGGCAG
SLC6A9 ex6R	TGCAATACACACATAACCCA
SLC6A9 ex7.8F	GGGCTGGTGGTGATTAGGGA
SLC6A9 ex7.8R	TGGCTGCACTGGAGCTGAGA
SLC6A9 ex9F	GTGTCTCCATGTCTCCTCTT
SLC6A9 ex9R	CTGCCCTTGTTCCCTGTC
SLC6A9 ex10F	GACAGGAACAAGGGGCAG
SLC6A9 ex10R	TTCCCTGCACGTCCTGGCAA
SLC6A9 ex11・12F	TTGCCAGGACGTGCAGGGAA
SLC6A9 ex11・12R	GGTCCCAAGAGATGGACACA
SLC6A9 ex13F	AACCAGAGAGGAAAGGGTGC

SLC6A9 ex13R
SLC6A9 ex14F
SLC6A9 ex14R

CCTCCCATTTTGCCTGGCTA
TAGCCAGGCAAAATGGGAGG
TCTGCCTCACCAGTCTCTGC

SLC32A1 遺伝子

SLC32A1 ex1-1F
SLC32A1 ex1-1R
SLC32A1 ex1-2F
SLC32A1 ex1-2R
SLC32A1 ex2-1F
SLC32A1 ex2-1R
SLC32A1 ex2-2F
SLC32A1 ex2-2R
SLC32A1 ex2-3F
SLC32A1 ex2-3R
SLC32A1 ex2-4F
SLC32A1 ex2-4R
SLC32A1 ex2-5F
SLC32A1 ex2-5R

TTCTTGCATCGCGTTCCCCG
CTCGCTGATAATGGATGTCT
TGCAGATGGACATCCTGAAA
AGATCACCGGGCGACTGTGG
AATTCTCAGTGTCTTAGCG
ATGATCTGCGCTACGTTTAC
TACGAGGAGAATGAAGACGG
AATGGAGATGGGGAACCTTCT
GGTCATAGCCTACTGTCTAT
AAAGAATGGCAGAGGATAGG
TGGTCAACATCTTTCTGGTG
ACTTGGTGCCACAGCAGCTT
TTGCTGCCCAGCCTCTTTCA
AAACTAGGAACCAGAGATGT