

稀少てんかんに関する調査研究

研究分担者 廣瀬伸一 福岡大学医学部 教授

研究概要

「稀少てんかんレジストリ」に疾患遺伝子変異情報を提供するため、Dravet症候群/*PCDH19*関連てんかん早期乳児てんかん性脳症の遺伝子解析を行った。キャプチャードエクソームシーケンスを109のてんかんで報告されている遺伝子の変異の有無を検索した。更に遺伝子変異同定が同定されなかった症例はエクソーム解析を行った。また、*PCDH19*関連てんかんのうちミスセンスとトランケーション変異の違いを検討した。研究方法は福岡大学医の倫理委員会で審議され承認されている。エキソーム解析を行ったDravet症候群の中に新しい遺伝子を含め新規遺伝子異常が発見された。*PCDH19*のトランケーション変異には分子内に不均等に分布し、重症度との関連が示唆された。結果は、今後の遺伝子診断からの症状予測や、てんかんの病態解明に貢献するものと期待される。

A．研究目的

「稀少てんかんレジストリ」に疾患遺伝子変異情報を提供して、その情報をもとに、また他のレジストリと連携しつつ、てんかんが主症状である23の指定難病および類縁疾患について診断基準、重症度分類、診療ガイドラインの策定・改訂を各学会と協力して行い、さらに、実態調査に基づいた包括的な難病医療ケア体制のサポート、関連研究基盤の整備、情報提供、教育・啓発活動を行う。このため、Dravet症候群/*PCDH19*関連さらに早期乳児てんかん性脳症の遺伝子解析を行う。

B．研究方法

Dravet症候群/*PCDH19*関連さらに早期乳児てんかん性脳症と診断された症例であった。と臨床診断された症例に対して、両親を含めたトリオ検体を収集した。

続いて次世代シーケンサを用いた、キ

ャプチャードエクソームシーケンスを実施した。具体的には発端者の検体に対しアジレントのハロプレックスを用いて、109のてんかんで報告されている遺伝子の変異の有無を検索した。109の遺伝子には、*KSCN1A*, *2A*, *8A*, *1B*等のNa⁺チャネル遺伝子、*GABRG2*等のGABA_A受容体関連の遺伝子、*CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A*, *PRRT2*, *PCDH19*, *KCNQ2*, *KCNQ3*, *KCNT1*等様々な候補遺伝子が含まれている。シーケンスの後、独自のバイオインフォマティクスにより作成されたパイプラインにより、レアバリエント、アミノ酸置換、スプライスバリエントを来すと予想されるバリエントを絞りこみ、加えて民族特異的なdatabaseにより、変異と思われるバリエントを絞り込んだ。続いてサンガー法によるPCRシーケンス法により、これらのバリエントの確認を行った。この後*in silico*分析を用いて、変異の病的効果を検討した。さらに、父母のDNAでこれらの変異の有無を検索して、遺伝

学的な意義づけを行った。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。更に遺伝子変異が、同定されなかった症例ではエクソーム解析を行った。

(倫理面への配慮)

研究対象者に対する人権擁護上の配慮のため、本研究方法による研究対象者に対する不利益、危険性の排除や説明と同意(インフォームド・コンセント)を十分行ったのち、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)人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(平成26年文部科学省・厚生労働省告示第3号)に基づき、すべての検体を匿名化された状態で遺伝子解析を行った。本研究は福岡大学医の倫理委員会で承認された方法により行われた。

C. 研究結果

福岡大学に寄せられたのは発端者数で、Dravet症候群/*PCDH19*関連てんかんの症例は180例を超え、てんかん脳症の症例は70例を超えた。

エクソーム解析を行ったDravet症候群の中に新しい遺伝子を含め新規遺伝子異常が発見された。*PCDH19*のトランケーション変異には分子内に不均等に分布し、重症度との関連が示唆された。

D. 考察

てんかんで報告されている109の遺伝子で変異の有無を検索したが、Dravet症候群/*PCDH19*関連てんかんが疑われる症例で遺伝子変異の同定率は高くなかった。

エクソーム解析の結果より、てんかん脳症の症例に係る遺伝子は多岐に亘り、また

臨床症状よりその遺伝子を推測することは困難であった。

PCDH19 遺伝子におけるトランケーション変異は2種類存在し、それぞれ、*PCDH19* 関連てんかんの病態に異なる影響を及ぼしている可能性が示唆された。

E. 結論

この結果は、今後の遺伝子診断からの症状予測や、てんかんの病態解明に貢献するものと期待される。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yoshitomi S, Takahashi Y, Imai K, Koshimizu E, Miyatake S, Nakashima M, Saito H, Matsumoto N, Kato M, Fujita T, Ishii A, Hirose S, Inoue Y. Different types of suppression-burst patterns in patients with epilepsy of infancy with migrating focal seizures (EIMFS). *Seizure*. 2019;65:118-23.

2. Tanaka Y, Sone T, Higurashi N, Sakuma T, Suzuki S, Ishikawa M, Yamamoto T, Mitsui J, Tsuji H, Okano H, Hirose S. Generation of D1-1 TALEN isogenic control cell line from Dravet syndrome patient iPSCs using TALEN-mediated editing of the SCN1A gene. *Stem Cell Res*. 2018;28:100-4.

3. Tanaka Y, Higurashi N, Shirasu N, Yasunaga S, Moreira KM, Okano H, Hirose S. Establishment of a human induced stem cell line (FUi002-A) from Dravet syndrome patient carrying heterozygous

R1525X mutation in SCN1A gene. Stem Cell Res. 2018;31:11-5.

4. Okumura A, Maruyama K, Shibata M, Kurahashi H, Ishii A, Numoto S, Hirose S, Kawai T, Iso M, Kataoka S, Okuno Y, Muramatsu H, Kojima S. A patient with a GNAO1 mutation with decreased spontaneous movements, hypotonia, and dystonic features. Brain Dev. 2018;40(10):926-30.
5. Nakayama T, Ishii A, Yoshida T, Nasu H, Shimojima K, Yamamoto T, Kure S, Hirose S. Somatic mosaic deletions involving SCN1A cause Dravet syndrome. Am J Med Genet A. 2018;176(3):657-62.
6. Ito T, Narugami M, Egawa K, Yamamoto H, Asahina N, Kohsaka S, Ishii A, Hirose S, Shiraiishi H. Long-term follow up of an adult with alternating hemiplegia of childhood and a p.Gly755Ser mutation in the ATP1A3 gene. Brain Dev. 2018;40(3):226-8.
7. Hayashida T, Saito Y, Ishii A, Yamada H, Itakura A, Minato T, Fukuyama T, Maegaki Y, Hirose S. CACNA1A-related early-onset encephalopathy with myoclonic epilepsy: A case report. Brain Dev. 2018;40(2):130-3.
8. Hayashida T, Saito Y, Ishii A, Hirose S, Hiraiwa R, Maegaki Y, Ohno K. Further characterization of CAPOS/CAOS syndrome with the Glu818Lys mutation in the ATP1A3 gene: A case report. Brain Dev. 2018;40(7):576-81.
9. Bailey JN, de Nijs L, Bai D, Suzuki T, Miyamoto H, Tanaka M, Patterson C, Lin YC, Medina MT, Alonso ME, Serratosa JM, Duron RM, Nguyen VH, Wight

JE, Martinez-Juarez IE, Ochoa A, Jara-Prado A, Guilhoto L, Molina Y, Yacubian EM, Lopez-Ruiz M, Inoue Y, Kaneko S, Hirose S, Osawa M, Oguni H, Fujimoto S, Grisar TM, Stern JM, Yamakawa K, Lakaye B, Delgado-Escueta AV. Variant Intestinal-Cell Kinase in Juvenile Myoclonic Epilepsy. N Engl J Med. 2018;378(11):1018-28.

2. 学会発表

1. Genetic background of developmental and epileptic encephalopathies. Hirose S, KEC2018 23thKOREAN EPILEPSY CONGRESS (2018.6.15-16 韓国)
2. Precision medicine through stem cells. Hirose S, 12th Asian and Oceanian epilepsy congress (2018.6.28-7.1 Bali Indonesia)
3. Disease Modeling of Refractory Epilepsy using iPSCs. Hirose S, The 40th Annual Meeting of Japanese Society of Biological Psychiatry The 61st Annual Meeting of the Japanese Society for Neurochemistry(2018.9.6-9.8 神戸)
4. Genes in Focal Epilepsy. Hirose S, ANZCNS 7th Annual Scientific Meeting (2018.9.12-9.18 Perth, Western Australia)
5. Application of Genetics to Epilepsy after Gene-Hunting. Hirose S, Anzcns 7th Annual Scientific Meeting (2018.9.12-9.18 Perth, Western Australia)
6. Pathogenesis and genetic substrate of tuberous sclerosis. Hirose S, 19th International symposium on severe

infantile epilepsies: old and new treatments. (2018.9.20-22 ローマ)

7. Regional specificity of *KCNQ2* missense variants causing benign or epileptic encephalopathy phenotypes. Goto A, Ihii A, Shibata M, Ihara Y, Moreira K, Hirose S, The 63rd Annual Meeting of the Japan Society of Human Genetics (2018.10.10-13 横浜)
8. ドラベ症候群類似症としての KCNA2-related epileptic encephalopathy (KCNA2-related epileptic encephalopathy as a mimic of Dravet syndrome) 岸高正、石井敦士、石川暢恒、小林裕行、谷博雄、廣瀬伸一 第52回日本てんかん学会学術集会(横浜) (2018.10.25-27)

9. HCN1 遺伝子バリエーションの早期乳児てんかん性脳症の1例 (A case of early infantile epileptic encephalopathy of HCN1 gene variant) 久保田弘樹、矢野珠巨、高橋勉、石井敦士、柴田磨己、廣瀬伸一 第52回日本てんかん学会学術集会(横浜) (2018.10.25-27)

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

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