

チャンネル遺伝子変異に合併する脳症に関する研究

研究分担者 石井 敦士 福岡大学医学部小児科・准教授

研究要旨

Dravet症候群は、乳幼児期発症の発達性およびてんかん性脳症の一つで、他のてんかんに比較して高率に急性脳症を発症することが知られている。約70%で電位依存性ナトリウムイオンチャンネル (NaV1.1) の α サブユニットをコードするSCN1A遺伝子に病的バリエーションをもつ。急性脳症においてもSCN1A遺伝子の異常や多型の関与が報告されており、遺伝子背景の関連性がみられる。今回、Dravet症候群を含むてんかん性脳症61に対して、ナトリウムイオンチャンネル、カリウムイオンチャンネル、カルシウムイオンチャンネル、GABA受容体といったチャンネル、トランスポーターを含む114種類のてんかん関連遺伝子の病的バリエーションを同定するため、次世代シーケンサーでパネルシーケンスを行った。その結果、合計6症例で病的バリエーションを同定した。また、てんかん性脳症と自然終息の新生児てんかんで認めるKCNQ2変異を検討し、バリエーションの有害性予測スコアとしてPAM30とPROVEANが有用であると証明した。

A. 研究目的

急性脳症に至る原因としていくつかの基礎疾患が知られている。Dravet症候群は、乳幼児期発症の発達性およびてんかん性脳症の一つである。他のてんかんに比較して高率に急性脳症を発症することが知られている。チャンネル遺伝子の急性脳症への関与を検証することを目的とした。また、カリウムイオンチャンネルをコードするKCNQ2遺伝子に注目した。KCNQ2遺伝子の病原性を示すバリエーションは、自然終息性家族性非家族性乳児てんかんと(Self limited Familial and non Familial Infantile Epilepsy: Self limited FIE)とKCNQ2発達性てんかん性脳症(KCNQ2 Developmental epileptic encephalopathy: KCNQ2 DEE)の原因となる。バリエーションの予測スコアの中で、二者または、非病原性のバリエーションを区別するような特徴があるスコアの検証を目的とした。

B. 研究方法

共同研究施設より遺伝子解析依頼を受けた、てんかん症例のうち臨床的にDravet症候群を含むてんかん性脳症61症例を抽出した。抹消リンパ球より抽出されたゲノムDNAを用いて、てんかん関連の114遺伝子のエクソンを含む領域にプローブを設計しライブラリを作成した。次世代シーケンサーMiseq(イルミナ社)でシーケンスを行い、fastq fileを参照ゲノム配列hg19を使用してバリエーションを抽出したvcf fileを作成した。AnnotationはANNOVARを使用し、1000 genome, ExAC, gnomADデータベースで新規バリエーションを

抽出し、SIFT、PolyPhen2、CADDスコアで有害性が予測されるバリエーションを候補とした。候補バリエーションに対して、両親のゲノムDNAでバリエーションの有無をPCRサンガー法で確認し、新生バリエーションを病的バリエーションとした。

KCNQ2遺伝子の病原性を示すバリエーションを当研究室のデータと2つのデータベース(RIKEE project, Epilepsygene)から集積する。非病原性のバリエーションは、幼少期に特に既往のない人の遺伝子配列を集めたThe Genome Aggregation Database(gnomAD)から集積する。バリエーションの病原性を予測する予測アルゴリズムでそれぞれ評価した。

(倫理面への配慮)

本研究は福岡大学医の倫理での承認のもと、書面で説明し、両親と患児代理として両親の同意を書面で得て実施した。

C. 研究結果

合計6症例で病的バリエーションを同定した。KCNQ2遺伝子PROVEANが最もAUCが高かった。PROVEANにおいてS3からHelix Aの領域は、Self limited FIEとKCNQ2 DEEは有意に、gnomADよりスコアが低かった。S1-S3において、PAM30のスコアがSelf limited FIEがKCNQ2 DEEより有意にスコアが低く、S3からHelix Aの領域では、KCNQ2 DEEが、Self limited FIEより有意にスコアが低かった。

D. 考察

今回 61 症例のてんかん性脳症のうち 6 症例のみに遺伝子異常を同定した。チャンネル遺伝子が関与するてんかん性脳症は期待されるほど多くは無かった。チャンネル以外の遺伝子異常によるてんかん性脳症とチャンネルによるてんかん性脳症を表現型から区別することは困難と考えられた。

KCNQ2 遺伝子異常を持つてんかんでは、変異の個所により表現型を分類することが可能であることが示唆される。有害性予測プログラムは疾病への関与の有無を予測することは差が見られないが、重症度予測においては PAM30、PROVEAN が使用可能なものだった。このことは、進化の過程での変異の導入で著しく性格の異なるアミノ酸であるほど重症になりうると考えられる。

E. 結論

パネルシーケンスではてんかん性脳症 61 症例中 6 例に変異を同定した。

限定された領域にはなるが、遺伝子解析において PROVEAN が新規の KCNQ2 遺伝子のバリエントが病原性か非病原性かを区別に参考になり、PAM30 は、KCNQ2 DEE か Self limited FIE を区別するのに有用である。

F. 健康危険情報

該当なし

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Shibata M, Ishii A, Goto A, Hirose S. Comparative characterization of PCDH19 missense and truncating variants in PCDH19-related epilepsy. *Journal of human genetics*. 2020.
2. Shibata A, Kasai M, Terashima H, Hoshino A, Miyagawa T, Kikuchi K, Ishii A, Matsumoto H, Kubota M, Hirose S, Oka A, Mizuguchi M. Case-control association study of rare nonsynonymous variants of SCN1A and KCNQ2 in acute encephalopathy with biphasic seizures and late reduced diffusion. *J Neurol Sci*. 2020;414:116808.
3. Kasai M, Shibata A, Hoshino A, Maezaki Y, Yamanouchi H, Takanashi JI, Yamagata T, Sakuma H, Okumura A, Nagase H, Ishii A, Goto T, Oka A, Mizuguchi M. Epidemiological changes of acute encephalopathy in Japan based on national surveillance for 2014-2017. *Brain & development*. 2020;42(7):508-14.
4. Hoshino H, Takayama K, Ishii A,

Takahashi Y, Kanemura H. Glucose transporter type 1 deficiency syndrome associated with autoantibodies to glutamate receptors. *Brain & development*. 2020;42(9):686-90.

5. Hirose S, Tanaka Y, Shibata M, Kimura Y, Ishikawa M, Higurashi N, Yamamoto T, Ichise E, Chiyonobu T, Ishii A. Application of induced pluripotent stem cells in epilepsy. *Mol Cell Neurosci*. 2020;108:103535.

2. 学会発表

該当なし

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