

—— 研究助成報告 ——

小児交互性片麻痺は、*ATPIA3*遺伝子の 新生ミスセンス変異を原因とする

De novo missense mutation in the *ATPIA3* gene
causes alternating hemiplegia of childhood

石 井 敦 士, 廣 瀬 伸 一

要旨：小児交互性片麻痺（AHC）は生後早期の異常な眼球運動で発症することが多く、1歳半までに発作性の片麻痺を呈す。また、てんかんや多彩な不随意運動を随伴症状とする。AHC責任遺伝子を同定することを目的に、次世代シーケンサーでの全エクソーム解析をAHC患者8名に対して施行した。その結果、8名全員で*ATPIA3*遺伝子にミスセンス変異をヘテロ接合で認めた。両親に変異は存在せず、*ATPIA3*遺伝子のヘテロ接合での新生ミスセンス変異がAHCを引き起こすことが解明できた。48名中40名（83%）のAHC患者に対して*ATPIA3*遺伝子変異を同定した。全症例新生ミスセンス変異であった。D801N変異が35%、E815K変異が30%の頻度で同定された。E815K変異患者の表現型は有意に他の変異群より重症であり、6歳までにてんかん重積後に退行を認めた。また、塩酸フルナリジンを内服していた群では、てんかん重積が抑制され退行が阻止されていることが示された。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2015；26：77-82

Key Words : *ATPIA3*, ATP pump, Status epilepticus, Exome sequencing, Rapid onset dystonia parkinsonism

序論

小児交互性片麻痺（AHC）は100万人出生に1人の罹患とされる極めて稀な小児神経疾患である¹⁾。本邦で約50人と推定されている。月齢2～3頃に異常な眼球運動で発症することが多く、続いて月齢6～7頃に片麻痺、又は四肢麻痺や、ジストニアが出現する^{2,3)}。麻痺は数十分から数日続き、睡眠中は麻痺発作が改善することが特徴である。一般に意識レベルは保たれているが、軽度の障害をきたすこともある。不随意運動としてジストニアや舞踏アテトーゼ運動が発作間欠期に常時現れるようになる症例もある。けいれんは6歳頃に出現する症例が多く、強直

発作や強直間代性発作を来することが多い。これらの発作性のエピソードに伴って認知機能は低下する。最終的には重度の知的障害や麻痺の固定化による寝たきり状態に至る疾患である。血液・尿中のアミノ酸、血液・髄液に異常は見られない。また、多彩な症状や進行性の経過にも関わらず、画像上は脳病変を欠く奇異な特徴を有する。脳波は、発作間欠期には脳波異常を認めないことが多く、突発波は稀である。その臨床像は神経解剖学的に説明できず、病態は全く不明であった。治療においては、抗てんかん薬や鎮静薬が試みられるがほとんど有効性は見られない。しかし、経験的に塩酸フルナリジンが片麻痺発作の持続時間と程度を改善すると報告

されている⁴⁻⁶⁾。塩酸フルナリジンは電位依存性カルシウムイオンチャネルブロッカーであるが、電位依存性ナトリウムイオンチャネルにも作用する。

臨床的にAHCと症状が重なる片麻痺性片頭痛で電位依存性P/Q型Ca²⁺チャネルの $\alpha 1A$ サブユニットを構成するCACNA1A遺伝子⁷⁾とATP依存性Na⁺/K⁺ポンプの $\alpha 2$ サブユニットを構成するATPIA2遺伝子^{8,9)}での遺伝子変異が報告され、AHCでも検索されたが変異は見いだされなかった。常染色体優性遺伝形式をとる家族性小児交互性片麻痺の1家系で全罹患者にt(3;9)(p26;q34)の転座が報告され¹⁰⁾、この9q34には電位依存性P/Q型Ca²⁺チャネルの $\alpha 1B$ サブユニットを構成するCACNA1B遺伝子が座しているが検索の報告はなかった。

乳児期より発症し、神経解剖学的に特徴的な臨床像を呈するが、各種臨床検査に特異的異常がなく、チャネル作用薬に反応する、チャネル異常による類縁疾患の存在より何らかの遺伝子の異常が示唆されていた。そこで、AHCの責任遺伝子を同定する目的で、CACNA1A、ATPIA2、CACNA1B遺伝子とてんかんで広範に認める電位依存性Na⁺チャネルの $\alpha 1$ サブユニットを構成するSCN1A遺伝子に対して変異検索を実施した後、次世代シーケンサーによりエクソーム解析を行った。

倫理

本研究は福岡大学病院と東京大学の倫理委員会にて承認を得て実施した。

方法

患者

全国の医療施設の主治医より、診断基準を満たすAHC患者の書面による同意のもと、血液検体と臨床情報の提供を得た。

DNAサンプル

患者由来末梢血リンパ球より、QIAamp DNA Blood Maxi Kit (Qiagen社) を使用し、プロトコルに従ってゲノムDNAを抽出した。キャピラリーシーケンサーによるサンガー法 CACNA1A、ATPIA2、CACNA1B、SCN1A、

ATPIA3遺伝子のコーディング配列内の全エクソンとイントロン内スプライシング領域を、ABI 3100 (Applied Biosystems社) でシーケンスを実施した。

エクソームシーケンス

ターゲットエクソンキャプチャーにSureSelect (Agilent社) を使用し、3 μ gのゲノムDNAからエクソン濃縮をした。イルミナHiseq2000 (Illumina社) でシーケンスした。1人につき平均1.3億塩基を得た。平均99.08%の塩基を参照ゲノム配列にマッピングした。平均カバレッジは182.8となった。

統計解析

全ての統計解析はSASソフトウェア (SAS Institute Inc.社) を使用した。表現型の頻度分布は、Fisherの正確検定で評価した。

結果

AHC症例8名に対して、候補チャネル、受容体として、CACNA1A、CACNA1B、SCN1A、ATPIA2遺伝子の全エクソンでの変異をキャピラリーシーケンサーによるサンガー法で探索したが有意な変異は同定できなかった。

次に、次世代シーケンサーで全エクソーム解析をAHC典型症例8名に対して行った。新生変異仮説を建て、バリエーションデータベースに登録されていない新規バリエーションと中枢神経発現遺伝子で責任遺伝子の選別を行った。一塩基置換での合計712,558個の全バリエーション、13,517個の遺伝子より発端者4人以上に共通したCNTN4、SYEN1、ATPIA3遺伝子の3個まで絞り込みを行った (Fig. 1)。これら変異に対してin silico解析を行い、何れのバリエーションもタンパク構造に大きく変化を与える変異であった。サンガー法での発端者に対するバリエーション確認と両親と健常者96名に対して同変異を探索した。CNTN4は偽陽性バリエーション、SYEN1のバリエーションは健常者にみられるものがあり多型と判断した。一方、ATPIA3は発端者8人全員にヘテロ接合でのミスセンスバリエーションを認めた。同定したバリエーションはG755C、D801N、E815K、C927Yの4つで、何れも種を超えて高度に保存されているアミノ酸の置換だった (Fig. 2)。同バリエーションは両親に存在せず、新

生変異であった (Fig. 3)。また、孤発患者2名をサンガーシーケンスで解析し新生ミスセンス変異をヘテロ接合で同定した。このことより、AHCが*ATPIA3*遺伝子の新生ミスセンス変異が原因であることを発見した¹¹⁾。

38名のAHC患者を加えた48名での*ATPIA3*遺伝子のシーケンスの結果、40名 (83%) で*ATPIA3*遺伝子の変異を同定した。全て、新生ミスセンス変異であった。同定した変異の中でD801N変異は14名 (35%)、E815K変異は12名 (30%) と高率に変異を認めた。

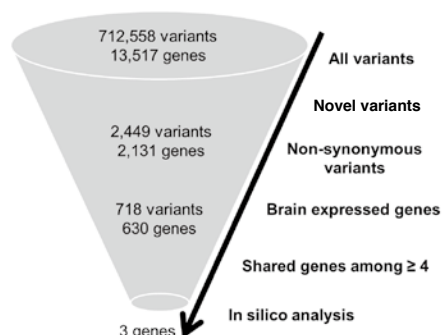


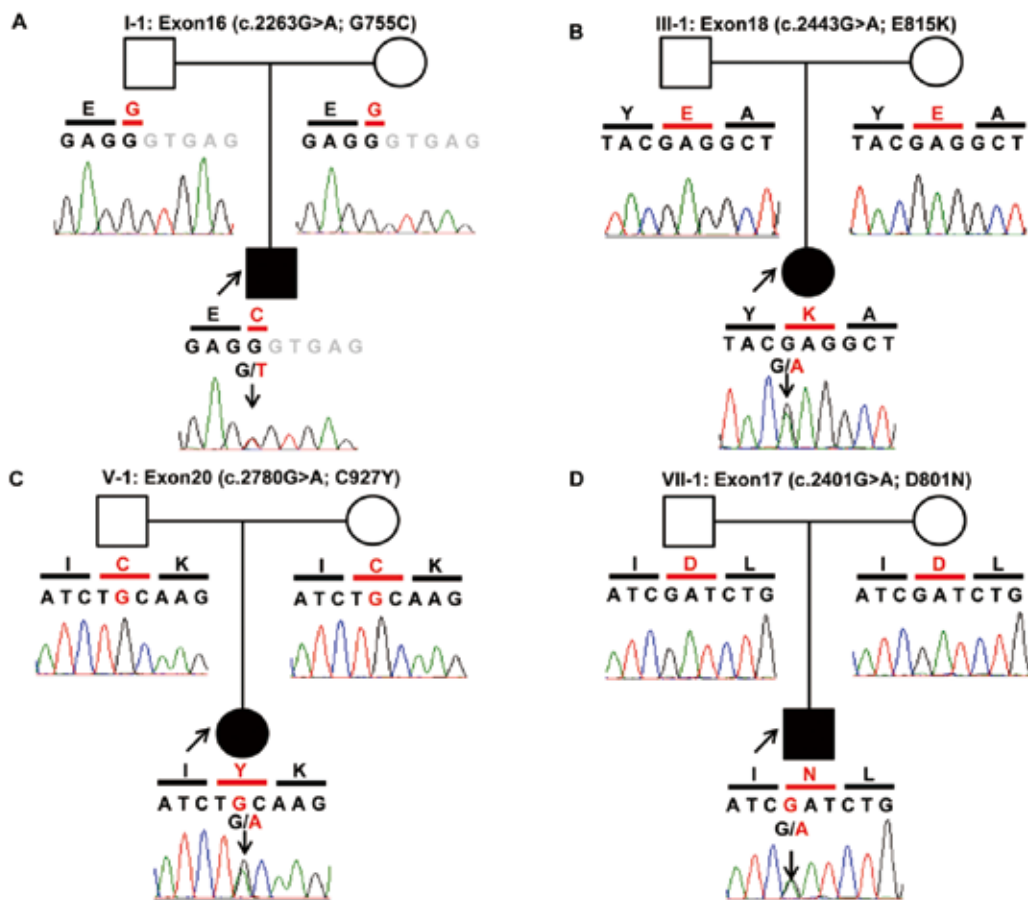
Fig. 1 Filtering for detection of pathogenic variants

表現型と遺伝子型での相関を、E815K変異12名、D801K変異10名、他の変異11名の33名で検討した¹²⁾。E815K変異を持つ症例では、初発発作は12名中11名で日齢7以内と他のグループに比べて新生児期の初発発作が有意に多かった ($p=0.0001$)。また、全例で月齢6以前の頸坐はなく発達の遅れを認めた。重度の認知機能障害や呼吸麻痺もあり、全例でてんかん重積を認めた。発達のピークはつかまり立ちで、5名で退行し、そのうち3名はてんかん重積を契機に退行し、4名は塩酸フルナリジンを退行前に断薬していた。D801N変異では、新生児期の発症は10名中2名であった。発達は中等度の遅滞があるが、月齢6までに頸坐が確認できた。退行を認めた症例はなかったが、全症例で塩酸フルナリジンを内服しており、4症例は10歳以降に断薬しているが退行はなかった。その他の変異群は、軽度の遅滞で、11名中7名は歩行可能であった。残り3名はつかまり立ち以降に退行した。全症例で塩酸フルナリジンを内服していたが、中断した5名中3名が、てんかん重積後に重度の退行を認めた。

	G755C		E815K
ジャイアントパンダ	GVEE G RLLF	ジャイアントパンダ	SLAY E AAES
チャネルキャットフィッシュ	GVEE G RLLF	ウシ	SLAY E AAES
ゼブラフィッシュ	GVEE G RLLF	ドブネズミ	SLAY E AAES
二枚貝綱	GVEE G RLLF	マウス	SLAY E AAES
線虫類	GVEE G RLLF	ニワトリ	SLAY E AAES
ヒル綱	GVEE G RLLF	アフリカツメガエル	SLAY E AAES
花クラゲ目	GVEE G RLLF	トラフグ属	SLAY E AAES
海産ゴカイ	GVEE G RLLF	チャネルキャットフィッシュ	SLAY E AAES
日本住血吸虫	G I EE G RLLF	ヨーロッパウナギ	SLAY E AAES
トウモロコシ	GVEE G RLLF	ゼブラフィッシュ	SLAY E AAES
	C927Y		D801N
ジャイアントパンダ	DLII C KTRR	ジャイアントパンダ	ILC I DLGTD
ウシ	DLII C KTRR	ウシ	ILC I DLGTD
ドブネズミ	DLII C KTRR	ドブネズミ	ILC I DLGTD
マウス	DLII C KTRR	マウス	ILC I DLGTD
ニワトリ	DLII C KTRR	ニワトリ	ILC I DLGTD
アフリカツメガエル	DLII C KTRR	ダチョウ	ILC I DLGTD
ドチザメ	DLII C KTRR	アフリカツメガエル	ILC I DLGTD
タイ科	DLII C KTRR	ヨーロッパウナギ	ILC I DLGTD
チャネルキャットフィッシュ	DLII C KTRR	ミドリフグ	ILC I DLGTD
ゼブラフィッシュ	DLII C KTRR	ゼブラフィッシュ	ILC I DLGTD

Blue letter: altering-protein by mutation, Red letter: Differential protein with human.

Fig. 2 Homology of altering amino acid.



Chromatograms of four mutations *de novo* heterozygous non-synonymous of *ATP1A3* are shown. All data were obtained by Sanger sequencing in the reconfirming processes. Black letters show exonic nucleotide sequences. Gray letters show intronic nucleotide sequences. Amino acids are shown in a single letter notation. Amino acid in red indicate mutations occurred.

Fig. 3 Chromatogram of four *de novo* missense mutations in *ATP1A3*.

考察

エクソーム解析よりAHCが*ATP1A3*遺伝子の新生ミスセンス変異を原因とすることを解明した。*ATP1A3*遺伝子は $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseポンプの $\alpha 3$ サブユニットをコードし、植物から霊長類まで高い相同性をもつ。この $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPaseポンプはATP依存性に Na^+ を細胞外に K^+ を細胞内に取り込むことによりイオンバランスと電荷の恒常性を保つことが知られている。また、中枢神経内では β サブユニットと結合し細胞膜に存在している。

*ATP1A3*遺伝子は2004年に青年期から成人

で発症するRapid onset dystonia parkinsonism (RDP) の責任遺伝子として同定されている¹³⁾。RDPはジストニアやパーキンソンニズムの突発性の発作を特徴とする常染色体優性遺伝の神経疾患である¹⁴⁻¹⁷⁾。発作は数分から数日に及ぶ。RDPで同定された変異は蛋白発現量の低下によるハプロ不全をもたらすことが知られている¹³⁾。

遺伝子型と表現型の解析では、E815K変異を持つ症例は他の変異をもつ症例に比べて、重症な表現型を呈していた。また、てんかん重積後に退行を示し、塩酸フルナリジンの内服継続した症例では、てんかん重積を軽減し、退行を阻

止することが示唆された。Ca²⁺ブロッカーである塩酸フルナリジンがどのような機序でてんかん重積に関与しているかは現時点では不明である。

48名のAHC患者に対して*ATPIA3*遺伝子変異を探索し83%の検出となった。また、E815K変異とD801N変異が65%を占めていた。その結果、感度の高い遺伝子検査として臨床現場に提供することにより、正確な確定診断が可能となった。また、表現型と遺伝子型に相関を導き、一定の変異での予後の予測が可能となった。

文献

- 1) BG Neville, Ninan M. The treatment and management of alternating hemiplegia of childhood. *Developmental medicine and child neurology* 2007 ; **49**(10) : 777-780.
- 2) M Bourgeois, Aicardi J, Goutieres F. Alternating hemiplegia of childhood. *The Journal of pediatrics* 1993 ; **122**(5 Pt 1) : 673-679.
- 3) MT Sweney, Silver K, Gerard-Blanluet M, Pedespan JM, Renault F, Arzimanoglou A, et al. Alternating hemiplegia of childhood: early characteristics and evolution of a neurodevelopmental syndrome. *Pediatrics* 2009 ; **123**(3) : e534-541.
- 4) P Casaer, Azou M. Flunarizine in alternating hemiplegia in childhood. *Lancet* 1984 ; **2**(8402) : 579.
- 5) P Casaer. Flunarizine in alternating hemiplegia in childhood. An international study in 12 children. *Neuropediatrics* 1987 ; **18**(4) : 191-195.
- 6) LI Caers, De Beukelaar F, Amery WK. Flunarizine, a calcium-entry blocker, in childhood migraine, epilepsy, and alternating hemiplegia. *Clinical neuropharmacology* 1987 ; **10**(2) : 162-168.
- 7) A Ducros, Denier C, Joutel A, Vahedi K, Michel A, Darcel F, et al. Recurrence of the T666M calcium channel *CACNA1A* gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia. *American journal of human genetics* 1999 ; **64**(1) : 89-98.
- 8) M De Fusco, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al. Haploinsufficiency of *ATPIA2* encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nature genetics* 2003 ; **33**(2) : 192-196.
- 9) KR Vanmolkot, Kors EE, Hottenga JJ, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WA, et al. Novel mutations in the Na⁺, K⁺-ATPase pump gene *ATPIA2* associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Annals of neurology* 2003 ; **54**(3) : 360-366.
- 10) MA Mikati, Maguire H, Barlow CF, Ozelius L, Breakefield XO, Klauck SM, et al. A syndrome of autosomal dominant alternating hemiplegia: clinical presentation mimicking intractable epilepsy; chromosomal studies; and physiologic investigations. *Neurology* 1992 ; **42**(12) : 2251-2257.
- 11) A Ishii, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, et al. Identification of *ATPIA3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PloS one* 2013 ; **8**(2) : e56120.
- 12) M Sasaki, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, et al. Genotype-phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* 2014 ; **82**(6) : 482-490.
- 13) P de Carvalho Aguiar, Sweadner KJ, Penniston JT, Zaremba J, Liu L, Caton M, et al. Mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase alpha3 gene *ATPIA3* are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* 2004 ; **43**(2) : 169-175.
- 14) A Brashear, DeLeon D, Bressman SB, Thyagarajan D, Farlow MR, Dobyns WB. Rapid-onset dystonia-parkinsonism in a second family. *Neurology* 1997 ; **48**(4) : 1066-1069.
- 15) WB Dobyns, Ozelius LJ, Kramer PL, Brashear A, Farlow MR, Perry TR, et al. Rapid-onset dystonia-parkinsonism. *Neurology* 1993 ; **43**(12) : 2596-2602.
- 16) G Linazasoro, Indakoetxea B, Ruiz J, Van

Blercom N, Lasa A. Possible sporadic rapid-onset dystonia-parkinsonism. Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society 2002 ; **17**(3) : 608-609.

Hardiman MO, Brett F, et al. Rapid-onset dystonia-parkinsonism: a clinical and genetic analysis of a new kindred. Neurology 2000 ; **55**(7) : 991-995.

17) SJ Pittock, Joyce C, O'Keane V, Hugle B,

Summary

***De novo* missense mutation in the *ATPIA3* gene causes alternating hemiplegia of childhood**

Atsushi Ishii, Shinichi Hirose

Alternating hemiplegia of childhood (AHC) is a rare neurological disorder that presents during the first year and a half of life with abnormal eye movements and paroxysmal hemiplegia. In addition, AHC has associated symptoms including epilepsy and a variety of involuntary movements. Currently, the cause of AHC is unknown, so we performed exome sequencing on eight patients with typical AHC to identify a contributing gene. Our results show that each patient harbors a heterozygous missense *ATPIA3* mutation. These mutations were not found in their parents. We propose that a *de novo* heterozygous missense mutation in the *ATPIA3* gene to be a cause of AHC. A total of 40 patients out of 48 (83 %) were identified to have a *de novo* missense mutation in *ATPIA3*. 14 patients of the 40 (35%) were found to have a D801N mutation and 12 patients (30%) were found to have a E815K mutation. In addition, the phenotype of patients with the E815K mutation was significantly more severe than those with other mutations. The patients with the E815K mutation showed regression in development triggered by status epilepticus until the age of 6 years old. Patients who took oral flunarizine hydrochloride to inhibit status epilepticus were able to stop developmental regression.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2015 ; 26 : 77-82