

— 研究助成報告 —

網羅的遺伝子解析によるアンジェルマン症候群および類縁疾患の てんかん発症機構の解明

Comprehensive genetic analyses on Angelman syndrome and related disorders:
toward the understanding of pathogenesis of epilepsy

齋 藤 伸 治

要旨：アンジェルマン症候群（AS）はUBE3A遺伝子の機能喪失により発症する疾患であり、遺伝性てんかん症候群のひとつである。私たちは、てんかん発症機構の解明を目的として、ASおよび類縁疾患を対象として網羅的遺伝子解析を実施した。その結果、AS 86例のうち35例（38%）を遺伝学的に診断することができた。内訳は、15番染色体父性片親性ダイソミー（UPD）3例、刷り込み変異3例、UBE3A変異19例であった。8名ではUPDか刷り込み変異かの判定ができなかった。遺伝学的にASと診断できなかった45例に対して、6個の遺伝子を含むシーケンスパネル解析を行ったところ、1例にMECP2の変異を同定し、Rett症候群と診断した。もう1例にCDKL5の変異を同定したが、稀な多型と判断した。網羅的遺伝子解析により臨床的にASが疑われた患者の約4割に確定診断が可能であった。

てんかん治療研究振興財団 研究年報 2016 ; 27 : 111-114

Key Words : Angelman症候群, UBE3A, ゲノムインプリンティング, MECP2, Rett症候群

【はじめに】

アンジェルマン症候群（AS）は重度知的障害、てんかん、失調性運動障害、容易に惹起される笑いに代表される行動特性を示す症候群である¹⁾。ASの約80%にてんかんを合併する。ASに合併するてんかんは全般発作を主体とし、時に非けいれん性てんかん重積やミオクロニー欠神重積を示すことが知られている。このように、ASは全般てんかんの遺伝学的モデル疾患のひとつと考えられている。ASの原因遺伝子UBE3Aはユビキチン蛋白リガーゼであり、中枢神経において標的蛋白の分解に関与している。UBE3Aの標的蛋白としてシナプス機能に関連する複数の蛋白が同定されており、てんか

んの分子機構の理解に貢献している²⁾。さらに、UBE3Aが位置する15q11-q13はゲノムインプリンティング領域であり、UBE3Aは神経細胞特異的インプリンティングを受け、母由来アレルのみが活性である。15q11-q13の遺伝子地図をFig. 1に示す。このように、遺伝子発現にエピジェネティクスが関係している。そのために、遺伝学的診断は複雑であり、体系的な解析が必要である。ASの分子遺伝学的分類をFig. 2に示す。15q11-q13の母性欠失が約70%と最も多い。次に、15番染色体父性片親性ダイソミー（UPD）約5%、刷り込み変異約5%、UBE3A変異約10%であり、約10%は原因が同定されない。また、ASと良く似た症状を示すが、遺伝学的に異なった疾患が複数報告されており、

名古屋市立大学大学院医学研究科新生児・小児医学分野
〔〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1〕

Shinji Saitoh

Department of Pediatrics and Neonatology, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences
〔Kawasumi 1, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, Japan〕

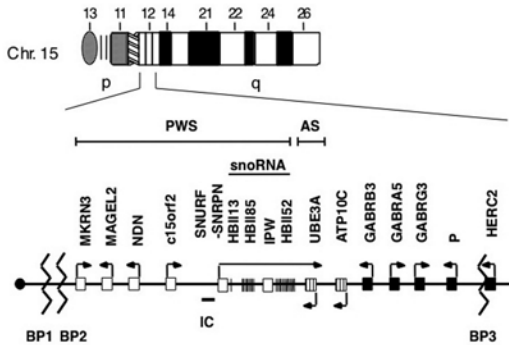


Fig. 1 15q11-q13の遺伝子地図

□は父性発現遺伝子、縦線は母性発現遺伝子、■は両親性発現遺伝子を示す。ジグザクの線は欠失の切断点を示す。BP1, BP2は近位切断点, BP3は遠位切断点を示す。ICは刷り込み中心 (imprinting center) を示し, SNURF-SNRPN遺伝子のプロモーター領域に相当する。

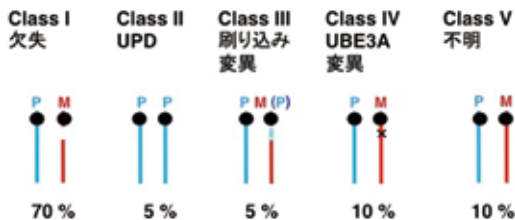


Fig. 2 ASの遺伝学的分類

UPDは片親性ダイソミー (uniparental disomy) を示す。それぞれの数字は頻度。M: 母由来15番染色体, P: 父由来15番染色体, M(P)は母由来15q11-q13の刷り込み状態が父由来となっていることを示している。

ASの診断が確定できない患者に対しては、これらの疾患の解析が望まれる。私たちは我が国においてASの分子遺伝学的診断の提供を通して、患者解析を行い、ASおよび類縁疾患におけるてんかん発症機構の解明を目的として研究を行った。

【対象と方法】

今回の解析においては研究期間3年間に於いて遺伝学的解析を実施した86例を対象とした。解析対象は臨床的にASが疑われ、FISH解析にて15q11-q13の欠失が否定された非欠失例である。末梢血由来ゲノムDNAを抽出して解析を

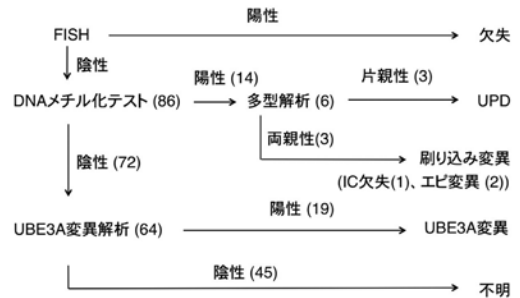


Fig. 3 体系的遺伝学的診断の流れと結果

遺伝学的解析の流れを示す。() 内は対応する患者数を示す。DNAメチル化テスト陰性72例のうち8例はUBE3A解析結果がまだ得られていないため、64例の解析結果となっている。

行った。解析方法は、SNURF-SNRPN遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化テストを全例に実施した。メチル化に異常がみられた場合は、両親の検体を用いた多型解析を行い、15番染色体の親由来を検討した。15番染色体は両親由来であるが、DNAメチル化異常を認める場合を刷り込み変異と診断した。刷り込み変異例に対しては、SNURF-SNRPN遺伝子上流の刷り込み中心 (imprinting center: IC) の微細欠失の有無をMLPA法にて解析した。メチル化テスト陰性例に対しては、UBE3A遺伝子の全コーディング領域をサンガー法にてシーケンスを行った。解析全体の流れと結果をFig. 3に示す。変異陰性例に対しては、ASと表現型が似ていることが報告されている、6個の遺伝子 (SLC9A6, TCF4, MBD5, CDKL5, MECP2, FOXP1) のコーディング領域を対象とするシーケンスパネルをAmpliSeq (Lifetechnologies) により作成し、Ion PGMを用いて解析した³⁾。

【結果】

AS 86例のうち、SNURF-SNRPNメチル化テストは14例 (16%) で陽性であった (Fig. 3)。そのうち、6例で両親解析ができ、3名が父性片親性ダイソミー、3名が刷り込み変異であった (Fig. 3)。刷り込み変異の3例のうち、1例に刷り込み中心にde novoの微細欠失を同定した。2例は刷り込み中心の欠失が存在せず、エピソード

異と判定した。メチル化テスト陰性64例に対してUBE3A遺伝子の変異解析をサンガー法で行い、19例（AS全体の22%）に変異を同定した（Fig. 3）。8例に対してはUBE3A変異解析を現在実施している。変異が陰性であった45例に対して、6個の遺伝子を含むシーケンスパネル解析を行ったところ、1例にMECP2のナンセンス変異（c.502C>T, p.Arg168*）を同定した。この例では両親の解析はできなかった。もう1例にCDKL5のミスセンス変異（c.1762C>T, p.Pro588Ser）を同定した。このCDKL5変異は症状のみられない父親にも存在し、稀な多型と判断した。

【考察】

臨床的にASが疑われた例に対する体系的な遺伝学的診断システムを構築し、広く国内から検体を受け付けた。3年間の研究期間において、AS 86例の解析を行った。ASの70%を占める欠失例に対するFISH法は保険適応であるために、一般臨床において実施可能である。従って、FISH陰性例を解析の対象とした。ASは15,000出生に1人程度の発症率であるので、国内では、70名程度の新規患者の発症がみこまれる。欠失例はその70%であるので、私たちの解析の対象となる非欠失例は30%であり、年間20例ずつの新規発症と計算される。私たちの施設では、年間10例強の診断を確定しており、国内における非欠失例に対する遺伝子診断では一定の貢献ができていると考える。

メチル化テスト陽性は16%、UBE3A変異例が22%であり、遺伝学的に確定診断が得られたのは計38%であった。メチル化テスト陽性例をUPDと刷り込み変異に鑑別するためには、両親の検体が必要である。14例のメチル化テスト陽性のなかで、両親解析は6例にしかできていない。刷り込み変異例3例に対して刷り込み中

心の微細欠失解析を行い、1例に微細欠失を同定した。この例では微細欠失はde novoであったが、遺伝的な例も報告されている。そのために、遺伝カウンセリングの観点からはメチル化解析に停まらず、両親の検体を用いた解析が望まれる。

私たちはASに似た表現型を示すその他の遺伝子変異のスクリーニングとして6遺伝子を搭載したパネルを作成し、次世代シーケンサーでの解析系を確立した。変異陰性例の解析では、1例にMECP2変異、もう1例にCDKL5変異を同定した。MECP2の変異はナンセンス変異であり、病因と判断した。しかし、CDKL5変異は最終的には多型と判断した。MECP2はレット症候群の原因遺伝子であり、乳児期にASと共通した症状を示す。このようにAS疑い例には非AS例が含まれていることは明らかである。しかし、6遺伝子の解析での陽性率は2%程と診断率は低い。そのため、ASの遺伝学的解析陰性例に対する遺伝学的解析としては全エクソーム解析などの実施がより実践的と考えられる。

【参考文献】

- 1) Saitoh S. Clinical, molecular, and neurophysiological features in Angelman syndrome. *J Pediatr Epilepsy* 2015 ; 4 : 17-22.
- 2) Egawa K, Kitagawa K, Inoue K, Takayama M, Takayama C, Saitoh S et al. Decreased tonic inhibition in cerebellar granule cells causes motor dysfunction in a mouse model of Angelman syndrome. *Sci Transl Med* 2012 ; 4 : 163ra157.
- 3) Togawa T, Sugiura T, Ito K, Endo T, Aoyama K, Ohashi K, et al. Molecular genetic dissection and neonatal/infantile intrahepatic cholestasis using targeted next-generation sequencing. *J Pediatr* (in press)

Summary

Comprehensive genetic analyses on Angelman syndrome and related disorders: toward the understanding of pathogenesis of epilepsy

Shinji Saitoh

Angelman syndrome (AS) is a neurodevelopmental disorder caused by loss-of-function of the imprinted UBE3A gene located in 15q11-q13. Epilepsy is one of the main manifestations of AS, and thus AS represents one of the genetic epilepsy disorders. We have performed comprehensive genetic analyses for 86 patients suspected to have AS. In this study, we identified three patients with paternal uniparental disomy of chromosome 15, three patients with imprinting defects and 19 patients with UBE3A mutations. In total, 35 patients (38%) was molecular genetically diagnosed with AS. We further examined remaining 45 patients negative for AS molecular tests using a next generation sequencing panel containing 6 genes. We identified one patient with a MECP2 nonsense mutation, revealing a diagnosis of Rett syndrome. We also identified one patient with a CDKL5 missense mutation, but it turned out to be a benign variant because the same mutation was present in the phenotypically normal father. It is concluded that comprehensive molecular genetic analysis for AS-suspected patients would have the approximately 40% diagnostic yield.

Ann.Rep.Jpn.Epi.Res.Found. 2016 ; 27 : 111-114